

LUCAS CAVALCANTE DA COSTA

**ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE PLANTAS DE ARROZ
EM RESPOSTA À ELEVADA CONCENTRAÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Dimas Mendes Ribeiro

Coorientador: Agustín Zsögön

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2019**

LUCAS CAVALCANTE DA COSTA

**ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE PLANTAS DE ARROZ
EM RESPOSTA À ELEVADA CONCENTRAÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 23 de agosto de 2019.

Lucas Cavalcante da Costa
Autor

Dimas Mendes Ribeiro
Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus, senhor e autor de nossas vidas.

Aos meus pais Ivan e Cristina, pelo apoio incondicional durante essa caminhada acadêmica.

Aos meus queridos avós Carmelita Mendes Cavalcante (*in memoriam*), José Ferreira e Elijanete Gomes, pelos ensinamentos e incentivos diante das dificuldades ao longo dessa jornada.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal pela oportunidade de realização desse curso.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

Ao meu orientador, professor Dimas Ribeiro, pela paciência, amizade e orientação durante esses anos de trabalho.

Ao professor Agustin Zsögön, pela coorientação.

A todos os professores que fizeram parte da minha formação, em especial os professores Adriano Nunes Nesi, Fábio DaMatta, Wagner Araújo, Humberto Ramos, Denise Bazzolli, Fernando Finger, Mário Puiatti, Vicente Casali e Paulo Cecon.

Aos membros da banca examinadora, os professores Wagner Araújo, Wagner Otoni, Leandro Elias e a Dra. Paula Fonseca, pela disponibilidade e colaboração.

Aos amigos do Laboratório de Crescimento e Desenvolvimento de Plantas, Rafael, Thaline, Juliane, Nilo, Fred, Fabrício, Lúbia, Fernando e Taís, pela ajuda e incentivos durante a realização dos experimentos.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Vegetal, Luciene, Gabriel, Toninho, Mercês e Geraldo, pelo importante suporte durante a execução da pesquisa.

Aos amigos do 4º andar, Rodrigo e Kleiton, pelos momentos de descontração e confraternização.

À minha namorada Luana Moraes, pelo companheirismo e apoio incondicional durante essa jornada.

A todos os colegas do curso de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal e à todos os meus familiares e amigos que, mesmo longe, contribuíram de alguma forma para a realização desta etapa.

Muito obrigado!

RESUMO

COSTA, Lucas Cavalcante da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2019. **Aspectos morfofisiológicos e bioquímicos de plantas de arroz em resposta à elevada concentração de dióxido de carbono.** Orientador: Dimas Mendes Ribeiro. Coorientador: Agustín Zsögön.

O aumento da concentração atmosférica de dióxido de carbono [(CO₂)] esperado para os próximos anos tem despertado crescente interesse no conhecimento da função deste gás como um sinal do ambiente envolvido na regulação do crescimento e desenvolvimento de plantas. Ao passo que os efeitos gerais do CO₂ sobre o metabolismo são bastante explorados, o mecanismo de alteração no crescimento e no metabolismo de plantas sob elevada [CO₂] é, ainda, pouco compreendido. Nesse contexto, o presente estudo avaliou as respostas morfofisiológicas e metabólicas de plantas de arroz cultivadas sob elevada [CO₂]. Em adição, testou-se a hipótese de que o etileno é o principal hormônio modulador do crescimento e das principais alterações no metabolismo de plantas de arroz crescendo sob elevada [CO₂]. Os dados evidenciaram que a limitação na atividade fotossintética em plantas de arroz sob elevada [CO₂] é de natureza difusiva e que está relacionada com as alterações observadas na anatomia e nos parâmetros biofísicos da folha. Por outro lado, demonstrou-se que o crescimento de plantas de arroz sob elevada [CO₂] é acompanhado por alterações na regulação de expressão de genes associados à expansão celular e ao metabolismo hormonal. Observou-se também que a elevada [CO₂] e o etileno, isoladamente, induzem o alongamento da parte aérea e inibem o alongamento da raiz primária em plântulas de arroz. Tais modificações são acompanhadas pelo aumento no número de raízes adventícias, o que foi observado em plântulas de arroz crescendo sob elevada [CO₂]. Por fim, observou-se que a elevada [CO₂] estimula a biossíntese de etileno de maneira dependente da idade da planta e que essa regulação contribui para maior ganho de biomassa durante o crescimento vegetativo. Essa descoberta reforça, portanto, a hipótese de que não somente os maiores níveis, mas também a regulação temporal da biossíntese de etileno contribui para o desenvolvimento de plantas de arroz sob elevada [CO₂].

Palavras-chave: *Oryza sativa*. Crescimento. Metabolismo primário. Etileno.

ABSTRACT

COSTA, Lucas Cavalcante da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2019. **Morphophysiological and biochemical aspects of rice in response to elevated carbon dioxide concentration.** Advisor: Dimas Mendes Ribeiro. Co-adviser: Agustín Zsögön.

The increase in atmospheric carbon dioxide concentration ($[CO_2]$) expected for the next few years has raised the interest of plant researchers in understanding the function of this gas as an environmental signal involved in the plant growth and development regulation. However, while the overall effects of CO_2 on metabolism are well explored, the mechanism underlying changes in plant growth and metabolism at elevated $[CO_2]$ is still poorly understood. In this context, the present study evaluated the morphophysiological and metabolic responses of rice at elevated $[CO_2]$ as well as exploited the role of ethylene in the growth and metabolism in such environmental condition. It has been demonstrated that the limitation of photosynthesis in rice plants at elevated $[CO_2]$ is caused by a diffusive instead of a biochemical limitation. It has also been shown that the growth of rice plants at elevated $[CO_2]$ is accompanied by changes in the expression of genes associated with cell expansion and hormone metabolism. In addition, the results indicated that either elevated $[CO_2]$ or ethylene induce shoot elongation and inhibit primary root growth. Moreover, elevated $[CO_2]$ and ethylene also interact to coordinate adventitious roots development in rice seedlings. Finally, it was evidenced that elevated $[CO_2]$ stimulates the biosynthesis of ethylene in an age dependent-manner and such event contributes to the higher biomass gain. These data suggest that not only the higher levels of ethylene but also its temporal biosynthesis regulation contributes to the development of rice plants at elevated $[CO_2]$.

Keywords: *Oryza sativa*. Growth. Primary metabolism. Ethylene.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- A = taxa de assimilação líquida de CO_2
- BR = brassinosteróides
- AFE = área foliar específica
- C_i = concentração intercelular de CO_2
- CoCl_2 = cloreto de cobalto
- DE = densidade estomática
- E = transpiração foliar
- ETR = taxa de transporte de elétrons
- F_0 = fluorescência inicial
- F_m = fluorescência máxima
- FSII = fotossistema II
- F_v = fluorescência variável
- F_v/F_m = eficiência fotoquímica máxima do FSII
- GA = giberelina
- IAA = auxina
- J_{\max} = taxa máxima de transporte de elétrons
- NPQ = coeficiente de extinção não-fotoquímico
- P_R = taxa de fotorrespiração da rubisco
- q_P = coeficiente de extinção fotoquímico
- R_d = taxa de respiração no escuro
- TCR = taxa de crescimento relativo
- TPU = utilização de triose fosfato
- V_{cmax} = velocidade máxima de carboxilação

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	9
REFERÊNCIAS.....	11
 CAPÍTULO I - ALTERAÇÕES NO CRESCIMENTO E NO METABOLISMO PRIMÁRIO DE PLANTAS DE ARROZ CULTIVADAS SOB ELEVADA CONCENTRAÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO	
RESUMO	14
INTRODUÇÃO	15
MATERIAL E MÉTODOS	16
<i>Material vegetal e condições de crescimento.....</i>	16
<i>Análise de crescimento vegetal.....</i>	17
<i>Anatomia foliar.....</i>	17
<i>Medições de parâmetros fotossintéticos.....</i>	18
<i>Determinação dos níveis de metabólitos.....</i>	20
<i>Análise de RT-qPCR.....</i>	21
<i>Análise estatística.....</i>	21
RESULTADOS.....	22
<i>Crescimento de plantas de arroz sob elevada [CO₂].....</i>	22
<i>Alterações na anatomia foliar em plantas de arroz sob elevada [CO₂].....</i>	22
<i>Parâmetros fotossintéticos em plantas de arroz sob elevada [CO₂].....</i>	23
<i>Alterações no metabolismo primário em plantas de arroz sob elevada [CO₂].....</i>	28
<i>Alterações na expressão de genes relacionados ao metabolismo hormonal e à expansão celular em plantas de arroz crescendo sob elevada [CO₂].....</i>	30
DISCUSSÃO.....	31
CONCLUSÕES	34
REFERÊNCIAS	34

**CAPÍTULO II - ALTERAÇÕES NO CRESCIMENTO E NO
METABOLISMO PRIMÁRIO DE PLANTAS DE ARROZ EM RESPOSTA
À AÇÃO DO ETILENO E À ELEVADA CONCENTRAÇÃO DE DIÓXIDO
DE CARBONO**

RESUMO	42
INTRODUÇÃO	43
MATERIAL E MÉTODOS	44
<i>Material vegetal e condições gerais.....</i>	44
<i>Quantificação de etileno.....</i>	45
<i>Análise de crescimento das plântulas.....</i>	45
<i>Análises de crescimento de plantas</i>	45
<i>Medições de parâmetros fotossintéticos.....</i>	46
<i>Determinação dos níveis de metabólitos.....</i>	47
<i>Análise estatística.....</i>	47
RESULTADOS.....	48
<i>Alterações no crescimento de plântulas de arroz em resposta ao etileno e à elevada [CO₂]</i>	48
<i>Alterações na arquitetura da raiz de plântulas de arroz em resposta ao etileno e à elevada [CO₂]</i>	49
<i>Alterações no crescimento de plantas de arroz em resposta aos níveis de etileno e à elevada [CO₂].....</i>	52
<i>Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em plantas de arroz em resposta ao etileno e à elevada [CO₂].....</i>	55
<i>Alterações no metabolismo primário de plantas de arroz em resposta aos níveis de etileno e à elevada [CO₂].....</i>	56
DISCUSSÃO.....	59
CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS.....	62
CONCLUSÕES GERAIS.....	67

INTRODUÇÃO GERAL

O grande desafio da agricultura para este século é encontrar uma maneira de dobrar a produção mundial de alimentos para atender às demandas do crescimento populacional esperado (Cohen, 2003; Parfitt et al., 2010; Alexandratos e Bruinsma, 2012; Long et al., 2015). Somado a essa expectativa, as mudanças climáticas têm tornado esse objetivo ainda mais desafiador (Reddy et al., 2010; Furbank e Sage, 2016). Nesse contexto, o rápido e contínuo aumento na concentração atmosférica de dióxido de carbono ($[CO_2]$) tem sido apontado com um dos principais agentes envolvidos nas alterações no clima global (Qaderi e Reid, 2009; IPCC, 2013; NASA, 2014). Desde o período pré-industrial, por exemplo, a $[CO_2]$ aumentou mais de 40%, excendendo o nível de 400 ppm nos dias atuais, com projeção de alcançar 670 ppm nos próximos 30 anos (IPCC, 2013). Por outro lado, o CO_2 também constitui o principal substrato da atividade fotossintética, sendo, por sua vez, um importante fator envolvido na produção global de alimentos (Long et al., 2004; Ainsworth e Long, 2005; Leahey et al., 2009). Dessa forma, tendo por objetivo aumentar a produção de alimentos diante de um cenário de mudanças climáticas globais, é importante compreender as consequências do aumento da $[CO_2]$ sobre o crescimento e o metabolismo das principais culturas agrícolas.

Como principal enzima envolvida na fotossíntese, a Ribulose - 1,5 - bisfosfato carboxilase/oxigenase (RubisCO) é bastante sensível ao aumento da $[CO_2]$ (Ainsworth e Long, 2005). Por possuir atividade tanto carboxilase (CO_2) quanto oxigenase (O_2), o produto final da RubisCO é dependente das concentrações de CO_2 e O_2 no sítio catalítico da enzima (Ainsworth et al., 2008). Nesse contexto, apesar da RubisCO apresentar maior afinidade por CO_2 do que por O_2 , a concentração atual de O_2 é cerca de 500 vezes maior (21%) do que a concentração de CO_2 (0,04%) (IPCC, 2013), o que limita grandemente a atividade carboxilase (Ainsworth e Long, 2005). Dessa forma, por suplementar com o substrato concorrente ao O_2 , a elevada $[CO_2]$ inibe competitivamente a atividade oxigenase, aumentando, portanto, a atividade carboxilase da RubisCO (DaMatta et al., 2016; Liu et al., 2016). A atividade oxigenase da Ribulose-1,5-bisfosfato pela RubisCO é denominada de fotorrespiração e envolve grande perda de esqueleto de carbono (Walker et al., 2016). Esse evento é observado em plantas do metabolismo tipo C3, as quais não possuem mecanismo concentrador

de CO₂, e, portanto, estão diretamente acopladas às variações da [CO₂] (Kimball, 2016). Assim, considerando tais observações, espera-se que a fotossíntese de plantas C3 responda positivamente ao aumento da [CO₂], favorecendo maior ganho de biomassa e taxa de crescimento relativo (Makino e Mae, 1999; Ainsworth et al., 2008).

O efeito da elevada [CO₂] sobre a fotossíntese não é suficiente para explicar totalmente as respostas observadas no crescimento e desenvolvimento de plantas sob tal condição atmosférica (Taylor et al., 2001; Thilakarathne et al., 2015). Nesse sentido, diversos estudos têm mostrado alterações no crescimento e fenologia em plantas sob elevada [CO₂], principalmente como resultado de mudanças na atividade dos meristemas apicais e laterais (Pritchard et al., 1999; Drake et al., 1997; Miller et al., 1998; Ainsworth et al., 2002; Kimball, 2016). Aliado à essas mudanças, os hormônios vegetais parecem desempenhar papel fundamental na coordenação do desenvolvimento de plantas sob elevada [CO₂] (Wei et al., 2013). Teng et al. (2006) investigaram os efeitos da elevada [CO₂] na biossíntese de hormônios usando como modelo *Arabidopsis thaliana* e observaram que houve incremento significativo na concentração de ácido indol-3-acético, ácido giberélico e citocinina sob elevada [CO₂]. Além disso, genes relacionados à síntese e transporte de auxinas, citocininas e giberelinas foram positivamente regulados sob elevada [CO₂] (De Souza et al., 2008; Gupta et al., 2005; Taylor et al., 2005; Wei et al., 2013). Diferentemente, estudos recentes demonstraram que o crescimento de plantas de tomate (Gasparini et al., 2019) e *Arabidopsis thaliana* (Ribeiro et al., 2012) sob elevada [CO₂] ocorre independentemente dos níveis de giberelinas nas plantas. Por outro lado, em plantas de arroz, a elevada [CO₂] aumentou os níveis de etileno em relação aos níveis observados em plantas sob [CO₂] ambiente (Seneweera et al., 2003). No entanto, apesar da evidência de que a elevada [CO₂] aumenta os níveis de etileno em plantas de arroz, o papel desse hormônio nas alterações observadas no desenvolvimento sob elevada [CO₂] é, ainda, pouco explorado.

Assim, com o objetivo de compreender a exata natureza das alterações no crescimento e no metabolismo de plantas sob elevada [CO₂], o presente estudo avaliou as respostas morfofisiológicas e bioquímicas de plantas arroz crescendo sob atmosfera enriquecida de dióxido de carbono, por meio do monitoramento dos níveis de metabólitos, da expressão gênica e de parâmetros anatômicos e biométricos da

folha. Além disso, testou-se a hipótese de que o etileno está envolvido nas principais alterações no crescimento e no metabolismo de plantas de arroz cultivadas sob elevada [CO₂].

REFERÊNCIAS

Ainsworth EA, Davey PA, Bernacchi CJ (2002) A meta-analysis of elevated [CO₂] effects on soybean (*Glycine max*) physiology, growth and yield. *Global Change Biology* **8**: 695-709

Ainsworth EA, Long SP (2005) What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. *New Phytologist* **165**: 351-372

Ainsworth EA, Rogers A, Leakey ADB (2008) targets for crop biotechnology in a future high-CO₂ and high-O₃ World. *Plant Physiology* **147**: 13-19

Alexandratos N, Bruinsma, J (2012) World agriculture towards 2030/2050: **The 2012 revision**. In *ESA Working paper No* (pp. 12– 03). Rome: FAO.

Cato SC, Macedo WR, Peres LEP (2013) Sinergism among auxins, gibberellins and cytokinins in tomato cv. Micro-Tom. *Horticultura Brasileira* **31**: 549-553.

Cohen JE (2003) Human population: the next half century. *Science* **302**: 1172-1175

De Souza AP, Gaspar M, Da Silva EA, Ulian EC, Waclawovsky AJ, Dos Santos, RV, Buckeridge MS (2008) Elevated CO₂ increases photosynthesis, biomass and productivity, and modifies gene expression in sugarcane. *Plant, Cell & Environment* **31**: 1116-1127

Drake BG, González-Meler MA, Long SP (1997) More efficient plants: a consequence of rising atmospheric CO₂? *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 609-639

Furbank RT, Sage RF (2016) Editorial overview: Physiology and metabolism: CO₂ concentrating mechanisms in photosynthetic organisms: Evolution, efficiency and significance for crop improvement. *Current Opinion in Plant Biology* **31**: 4-7

Gamage D, Thompson M, Sutherland M, Hirotsu N, Makino A, Seneweera S (2018) New insights into the cellular mechanisms of plant growth at elevated atmospheric carbon dioxide. *Plant, Cell & Environment* **41**:1233-1246

Gasparini K, Costa, L, Brito FAL, Pimenta, TM, Cardoso, FB, Araújo WL, Zsögön A, Ribeiro DM (2019) Elevated CO₂ induces age-dependent restoration of growth and metabolism in gibberellin-deficient plants. *Planta* (**in press**) doi: 10.1007/s00425-019-03208-0

Gupta P, Duplessis S, White H, Karnosky D, Martin F, Podila G (2005) Gene

expression patterns of trembling aspen trees following long-term exposure to interacting elevated CO₂ and tropospheric O₃. *New Phytologist* **167**: 129-142

IPCC (2013) "Summary for Policymakers," in *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, eds T. Stocker F, Qin D, Plattner GK, Tignor M, Allen SK, Boschung J., et al. (New York, NY: Cambridge University Press).

Kimball BA (2016) Crop responses to elevated CO₂ and interactions with H₂O, N, and temperature. *Current Opinion in Plant Biology* **31**: 36-43

Leakey AD, Ainsworth EA, Bernacchi CJ, Rogers A, Long SP, Ort D R (2009) Elevated CO₂ effects on plant carbon, nitrogen, and water relations: Six important lessons from FACE. *Journal of Experimental Botany* **60**: 2859-2876

Long SP, Ainsworth EA, Rogers A, Ort DR (2004) Rising atmospheric carbon dioxide: plants FACE in the future. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 591- 628

Long SP, Marshall-Colon A, Zhu XG (2015) Meeting the global food demand of the future by engineering crop photosynthesis and yield potential. *Cell* **161**: 56-66

Makino A, Mae T (1999) Photosynthesis and plant growth at elevated levels of CO₂. *Plant and Cell Physiology* **40**: 999-1006

Miller JE, Heagle AS, Pursley WA (1998) Influence of ozone stress on soybean response to carbon dioxide enrichment: II. Biomass and development. *Crop Science* **38**: 122-128

NASA (2014) *Global Climate Change: Vital Signs of the Planet*. Disponível em: <http://climate.nasa.gov/400ppmquotes>

Parfitt J, Barthel M, Macnaughton S (2010) Food waste within food supply chains: quantification and potential for change to 2050. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **465**: 3065-3081

Pritchard S, Rogers H, Prior SA, Peterson C (1999) Elevated CO₂ and plant structure: A review. *Global Change Biology* **5**: 807-837

Qaderi MM, Reid DM (2009) Crop responses to elevated carbon dioxide and temperature. In *Climate change and crops* (pp. 1-18). Springer.

Reddy AR, Rasineni GK, Raghavendra AS (2010) The impact of global elevated CO₂ concentration on photosynthesis and plant productivity. *Current Science* **99**: 46-57

Ribeiro DM, Araujo WL, Fernie AR, Schippers J, Mueller-Roeber B (2012) Action of gibberellins on growth and metabolism of *Arabidopsis thaliana* plants associated with high concentration of carbon dioxide. *Plant Physiology* **160**: 1781-1794

Seneweera S, Aben SK, Basra AS, Jones B, Conroy JP (2003) Involvement of ethylene in the morphological and developmental response of rice to elevated atmospheric CO₂ concentrations. *Plant Growth Regulation* **39**: 143-153

Seneweera S, Makino A, Hirotsu N, Norton R, Suzuki Y (2011) New insight into photosynthetic acclimation to elevated CO₂: The role of leaf nitrogen and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase content in rice leaves. *Environmental and Experimental Botany* **71**: 128-136

Taylor G, Ceulemans R, Ferris R, Gardner S, Shao B (2001) Increased leaf area expansion of hybrid poplar in elevated CO₂. From controlled environments to open-top chambers and to FACE. *Environmental Pollution* **115**: 463-472.

Taylor G, Street NR, Tricker PJ, Sjödin A, Graham L, Skogström O, Jansson S (2005) The transcriptome of *Populus* in elevated CO₂. *New Phytologist* **167**: 143-154.

Teng N, Wang J, Chen T, Wu X, Wang Y, Lin J (2006) Elevated CO₂ induces physiological, biochemical and structural changes in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **172**: 92-103.

Thilakarathne CL, Tausz-Posch S, Cane K, Norton RM, Fitzgerald GJ, Tausz M, Seneweera S (2015) Intraspecific variation in leaf growth of wheat (*Triticum aestivum*) under Australian Grain Free Air CO₂ Enrichment (AGFACE): Is it regulated through carbon and/or nitrogen supply? *Functional Plant Biology* **42**: 299-308

Thilakarathne CL, Tausz-Posch S, Cane K, Norton RM, Tausz M, Seneweera S (2013) Intraspecific variation in growth and yield response to elevated CO₂ in wheat depends on the differences of leaf mass per unit area. *Functional Plant Biology* **40**: 185-194.

Walker BJ, VanLoocke A, Bernacchi CJ, Ort DR (2016) The costs of photorespiration to food production now and in the future. *Annual Review of Plant Biology* **67**: 107-129

Wei H, Gou J, Yordanov Y, Zhang H, Thakur R, Jones W, Burton A (2013) Global transcriptomic profiling of aspen trees under elevated [CO₂] to identify potential molecular mechanisms responsible for enhanced radial growth. *Journal of Plant Research* **126**: 305-320.

CAPÍTULO I

ALTERAÇÕES NO CRESCIMENTO E NO METABOLISMO PRIMÁRIO DE PLANTAS DE ARROZ CULTIVADAS SOB ELEVADA CONCENTRAÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO

RESUMO

O aumento da concentração atmosférica de dióxido de carbono [CO_2] esperado para os próximos anos tem despertado crescente interesse no conhecimento da função deste gás como um sinal do ambiente envolvido na regulação do crescimento e desenvolvimento de plantas. Entretanto, enquanto os efeitos gerais do CO_2 sobre o metabolismo são bastante explorados, o mecanismo de alteração no crescimento e no metabolismo de plantas sob elevada [CO_2] é, ainda, pouco compreendido. Assim, o presente estudo avaliou a regulação metabólica e a modulação das trocas gasosas em resposta as alterações no crescimento de plantas de arroz imposta pela elevada [CO_2]. Demonstrou-se que a limitação na atividade fotossintética em plantas de arroz sob elevada [CO_2] é de natureza difusiva e que está relacionada com as alterações observadas na anatomia e nos parâmetros biofísicos da folha. Além disso, evidenciou-se que o crescimento de plantas de arroz sob elevada [CO_2] é acompanhado por alterações na regulação da expressão de genes associados a expansão celular e ao metabolismo hormonal.

INTRODUÇÃO

O aumento da concentração atmosférica de dióxido de carbono ($[CO_2]$) tem despertado crescente interesse no conhecimento da função desse gás como um sinal do ambiente envolvido na regulação do crescimento e da produtividade vegetal (Reddy et al., 2010; Furbank and Sage, 2016; Gamage et al., 2018a). Nesse contexto, a elevada $[CO_2]$ favorece aumentos na taxa fotossintética em diversas culturas, contribuindo para maior taxa de crescimento relativo e biomassa total (Leakey et al., 2009b; Reddy et al., 2010). Entretanto, parâmetros relacionados à produtividade, tais como rendimento de grãos e índice de colheita, não têm sido associados às maiores taxas de assimilação de carbono nessa condição (Zhu et al., 2015a). Assim, é possível sugerir que não somente a alteração no metabolismo, mas também a alteração no crescimento e na distribuição da biomassa nos diferentes órgãos (Kush, 2001) afeta a produtividade de plantas sob elevada $[CO_2]$.

O controle do crescimento de plantas envolve alterações na divisão e na expansão celular (Schopfer, 2006). A expansão celular é dependente da biossíntese de proteínas específicas, como as expansinas (*EXPs*) (Li et al., 2003), que agem como uma das principais reguladoras do crescimento vegetal (Lee and Kende, 2001). Por sua vez, as *EXPs* apresentam regulação em nível transcricional (Choi et al., 2003), onde elementos *cis* de regulação da transcrição são especificamente responsivos à giberelina (GA), auxina (IAA), ácido abscísico (ABA) e etileno (Lee et al., 2001), sob condições de $[CO_2]$ ambiente. Por outro lado, sob elevada $[CO_2]$, a expressão dos genes *EXPs* foi regulada positivamente durante o crescimento de *Arabidopsis thaliana* independentemente dos níveis de GA na planta (Ribeiro et al., 2012), sugerindo que a regulação das *EXPs* sob elevada $[CO_2]$ pode ser diferente da observada sob $[CO_2]$ ambiente.

O crescimento de plantas é também dependente da disponibilidade de carbono e nitrogênio em seu tecido (Smith e Stitt, 2007; Pantin et al. 2011). Nesse sentido, tem sido observado que plantas sob elevada $[CO_2]$ apresentam aumento expressivo nas concentrações de carboidratos não estruturais totais, incluindo glicose, frutose, sacarose e amido (Vicente et al., 2016), mas não nas concentrações de carboidratos estruturais (Markelz et al., 2014). Por outro lado, a elevada $[CO_2]$ pode reduzir as concentrações de nitrogênio orgânico e inorgânico totais livres nas folhas (Xu et al.,

2015a), limitando o crescimento sob essa condição (Vicente et al., 2016). Embora os efeitos gerais do CO₂ sobre o metabolismo serem bastante explorados, o mecanismo envolvido nas alterações observadas no crescimento e no metabolismo de plantas sob elevada [CO₂] é, ainda, pouco entendido. Assim, o presente estudo avaliou a regulação metabólica e a modulação das trocas gasosas em resposta às alterações no crescimento de plantas de arroz impostas pela elevada [CO₂].

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições de crescimento

Sementes de arroz (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. 'Oochikara') foram esterilizadas em NaOCl 10% (v/v) por 2 min, lavadas em água desionizada por 3 min e, posteriormente, transferidas para papel *germitest* (Fisher Scientific, Co Pittsburgh). A germinação ocorreu em câmara de crescimento (Forma Scientific, Inc., EUA) sob fotoperíodo de 12/12 h (dia/noite), temperatura 28/22 °C (dia/noite), umidade relativa de 65±5% e intensidade luminosa de 150 μmol fótons m⁻²s⁻¹. Após 7 dias, as plântulas foram transferidas para vasos de plástico contendo 6 L de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), constituída de KNO₃ (1,0 mM), NH₄H₂PO₄ (0,25 mM), NH₄Cl (0,1 mM), MgSO₄·7H₂O (0,5 mM), Ca(NO₃)₂·4H₂O (1,0 mM), CuSO₄·5H₂O (0,30 μM), ZnSO₄·7H₂O (0,33 μM), H₃BO₃ (11,5 μM), MnCl₂·4H₂O (3,5 μM), (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O (0,1 μM), FeSO₄·7H₂O (25 μM) e ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) dissódico, com pH ajustado para 6,5. Após 3 dias, as plantas foram transferidas para câmaras de topo aberto, as quais foram suplementadas com 400 μmol CO₂ mol⁻¹ ar (ambiente) e 750 μmol CO₂ mol⁻¹ ar (elevada). A solução foi renovada diariamente. As plantas foram avaliadas quanto aos parâmetros de crescimento, trocas gasosas e metabolismo aos 42 dias de idade (35 dias após o transplantio). Para análise de expressão gênica, as amostras foram coletadas em plantas com 28 dias de idade (21 dias após o transplantio), conforme estabelecido pela interpretação da curva de crescimento (Figura S1). As médias foram obtidas a partir de dois experimentos independentes.

Análise de crescimento vegetal

A altura de plantas, o comprimento do colmo e o comprimento da raiz foram determinados a cada dois dias. O número de perfilhos, número de folhas e área foliar total (Li-Cor Model 3100 Area Meter, Lincoln, NE, USA) foram determinados ao final do experimento, quando também a massa seca dos órgãos (raízes, colmo e folhas) foi quantificada. A taxa de crescimento relativo (TCR) e a área foliar específica (AFE) foram determinadas conforme descrito por Hunt (1982). Além disso, a razão raiz/parte aérea foi determinada.

Anatomia foliar

A folha bandeira das plantas de arroz com 42 dias de idade foi coletada para esta análise. Tecido foliar foi retirado da região central da lamina foliar, fixado em FAA (formaldeído, ácido acético glacial, 50% etanol, 1:1:18, volume-volume) por 48h (Johansen, 1940) e armazenado em 70% de etanol. O tecido vegetal foi incluído em metacrilato (Historesin-Leica), de acordo com as recomendações do fabricante. Cortes transversais (5 μ m) foram realizados com o uso de um micrótomo automatizado (modelo RM2155, Leica Microsystems, Inc., Deerfield, EUA). Os cortes foram então corados com azul de toluidina e as espessuras da folha e do mesofilo foram determinadas. Para determinação da densidade estomática, os fragmentos de folhas foram clarificados com 95% de metanol por 48 h seguido por 100% de ácido láctico (Zsögön et al., 2015). Os dados foram apresentados como número de estômatos por unidade de área foliar. As imagens foram obtidas em microscópio de luz (modelo AX-70 TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) acoplado a uma câmera fotográfica digital (modelo AxioCam HRc, Zeiss, Göttinger, Alemanha) e a um microcomputador com programa de captura de imagens Axio Vision. Para determinação das características anatômicas na seção transversal e na superfície epidérmica, as imagens foram digitalizadas e analisadas por meio do uso do software Image Pro-Plus® (Versão 4.1, Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, EUA). A absorvância, refletância e transmitância da folha bandeira foram medidas no espectrômetro Sistema Jaz (Ocean Optics, Inc., Dunedin, FL, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A absorvância foi calculada conforme descrito por Gorton et al. (2010).

Medições de parâmetros fotossintéticos

A taxa de assimilação líquida de carbono (A), a condutância estomática (g_s), a concentração intercelular de dióxido de carbono (C_i) e a transpiração (E) foram determinadas com um analisador de gás a infravermelho (LI-Cor 6400XT, LI-COR, Lincoln, NE, EUA) em folhas bandeira crescendo sob ambiente e elevada [CO_2]. As medições foram conduzidas com fornecimento de 400 ou 750 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ de ar com radiação fotossinteticamente ativa de 1000 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (aproximadamente o valor de intensidade luminosa máxima no interior da casa de vegetação) sob 50-60% de umidade relativa e temperatura 26-32 °C. A taxa de respiração mitocondrial no escuro (R_d) foi medida em folhas adaptadas ao escuro por pelo menos 2 horas após o término do período de luz. Em complemento, a respiração mitocondrial em luz (R_L) foi estimada como a metade da R_d (Pinelli e Loreto, 2003; Centritto et al., 2009). A taxa fotorrespiratória da Rubisco (R_p) foi estimada de acordo com Valentini et al. (1995), como $R_p = 1/2 [ETR - 4 (A + R_L)]$. Todos os parâmetros apresentados por unidade de área foliar foram transformados em unidade de massa, sendo considerada a área foliar específica em cada condição de crescimento (0,033 $\text{g}^{-1} \text{ m}^2$ para plantas crescidas sob [CO_2] ambiente e 0,028 $\text{g}^{-1} \text{ m}^2$ para plantas crescidas sob [CO_2] elevada).

Curvas de resposta fotossintética foram determinadas pela variação da radiação fotossinteticamente ativa de 0 a 1400 $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fornecida por uma fonte de luz (lâmpada de halogênio com refletor de 50W). Para determinação das curvas de resposta de A em função da variação nas concentrações de C_i (A/C_i), uma fonte de suplementação de CO_2 foi utilizada, a qual variou a concentração de gás de 0 a 1500 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ar. Correções para a perda de CO_2 e vapor de água para fora da câmara do analisador foram realizadas de acordo com Rodeghiero et al. (2007). A partir da curva A/C_i , a velocidade máxima de carboxilação ($V_{\text{Cmax-C}_i}$), taxa máxima de transporte de elétrons ($J_{\text{max-C}_i}$), utilização de triose fosfato (TPU_{C_i}) foram calculadas por meio do modelo mecanístico de assimilação de CO_2 proposto por Farquhar et al. (1980), utilizando a dependência da temperatura nos parâmetros cinéticos da Rubisco (Bernacchi, 2002). As constantes de Michaelis-Menten utilizadas para os cálculos foram $K_c = 268 \mu\text{bar}$, $K_o = 194000 \mu\text{bar}$ e $\Gamma^* = 31,5 \mu\text{bar}$, como determinado anteriormente por Seneweera et al. (2011). Os procedimentos de ajuste de curva foram detalhados por Martins et al. (2013). Posteriormente, os parâmetros

fotossintéticos V_{cmax} , J_{max} e TPU foram normalizados para 25 °C por meio das equações de resposta à temperatura propostas por Sharkey et al. (2007).

A concentração de CO₂ nos cloroplastos (C_c) e condutância mesofílica (g_m) foram estimadas conforme proposto por Martins et al. (2013). Utilizando dados de C_c , curvas A/C_c foram elaboradas e os valores da velocidade máxima de carboxilação ($V_{\text{cmax-Cc}}$), taxa máxima de transporte de elétrons ($J_{\text{max-Cc}}$), utilização de triose fosfato (TPU_{C_c}) em base C_c foram estimados. As limitações fotossintéticas observadas foram estimadas com base no método descrito por Grassi e Magnani (2005). Esse método utiliza valores de A , g_s , g_m , $V_{\text{cmax-Cc}}$, Γ^* , C_c , $K_m = K_c (1 + O/K_o)$ e permite a partição de componentes funcionais que limitam a fotossíntese, tais como a limitação estomática (LE), limitação mesofílica (LM) e limitação bioquímica (LB). A eficiência do uso da água foi estimada como a razão entre fotossíntese e a taxa de transpiração (Zhang et al., 2013).

Medições da fluorescência da clorofila foram realizadas com o mesmo analisador de gás anteriormente mencionado, equipado com uma câmara de fluorescência integrada (LI-6400, LI-COR). A fluorescência inicial (F_0) foi medida a partir da iluminação das folhas adaptadas ao escuro com feixes de luz fraca modulada ($0,03 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Posteriormente, pulsos de luz branca saturada ($8000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 0,8 s foram aplicados para a obtenção da fluorescência máxima (F_m), a partir da qual a eficiência fotoquímica máxima do PSII foi calculada: $F_v/F_m = [(F_m - F_0)/F_m]$. Em folhas adaptadas à luz, o rendimento de fluorescência no estado estacionário (F_s) foi medido antes da aplicação de um pulso de luz branca saturada ($8000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 0,8 s) para o acesso da fluorescência máxima adaptada à luz (F_m'). A luz actínica foi então desligada e um pulso de luz no comprimento de onda vermelho distante ($2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foi aplicado para medir a fluorescência inicial adaptada à luz (F_0'). A eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do fotossistema II (PSII) (F_v'/F_m') foi estimada conforme descrito por Logan et al. (2007), enquanto que o rendimento quântico do transporte de elétrons (ϕ_{PSII}) foi estimado como $\phi_{\text{PSII}} = (F_m' - F_s)/F_m'$ (Genty et al., 1989). Os coeficientes de extinção fotoquímico (qP), extinção não-fotoquímico (NPQ) e taxa de transporte de elétrons (ETR) foram determinados como descrito anteriormente por Martins et al. (2013).

Determinação dos níveis de metabólitos

Para avaliar os efeitos da [CO₂] sobre o metabolismo central das plantas de arroz, as concentrações de glicose, frutose, sacarose, amido, malato, fumarato, nitrato, aminoácidos totais e proteínas totais foram quantificados. Amostras de folhas, colmos e raízes de plantas com 42 dias de idade foram coletadas ao final do dia (FD) e ao final do da noite (FN), imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C, até análise. Uma fração das amostras frescas (~ 50 mg) foi utilizada para extração etanólica, conforme descrito por Geigenberger et al. (1996). Na fração solúvel em etanol determinou-se glicose, frutose e sacarose usando um ensaio enzimático contínuo, como descrito por Cross et al. (2006). Para determinação do amido, o precipitado da extração etanólica foi solubilizado por aquecimento a 95°C em NaOH à concentração de 0,1 M. Em seguida, 70 µL de solução de ácido acético (1 M) foram adicionados às amostras, e o teor de amido foi determinado como equivalentes de glicose (Hendriks, 2003).

Malato e fumarato foram quantificados como descrito por Nunes-Nesi et al. (2007). A reação enzimática foi iniciada com a adição de 30 µL do extrato a um volume de reação de 200 µL constituído de tricina/100 mM KOH (pH 9,0), metanossulfato de fenazina 0,12 mM, NAD 3 mM e Triton X 100 a 0,5% (v/v). A quantificação de malato e fumarato foi realizada em leitor de microplacas (Molecular Devices Sunny Valle, EUA) a 570 nm após a adição de 1U de malato desidrogenase (para determinação do malato) até estabilização da absorbância seguida da adição de 1U fumarase (para determinação do fumarato).

A quantificação do nitrato foi realizada conforme descrito por Mori (2000). A reação enzimática foi iniciada pela adição de uma alíquota de 5 µL do extrato etanólico em um volume de reação de 150 µL, consistindo de 0,1 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,5), 0,25 mM de NADPH e 0,005 U de nitrato redutase. Após 30 min de incubação, à temperatura ambiente, 20 µL de metanossulfato de fenazina (5 mM) foram adicionados à reação e as microplacas foram incubadas por mais 10 min no escuro. Em seguida, 30 µL de sulfamilamida 2% (p/v) foi dissolvida em H₃PO₄ (2 mM) e 30 µL de diidrocloreto de *N*- (1-naftil) etilenediamino 0,04% (p/v) foram adicionados à reação. O nitrato foi quantificado em leitor de microplacas (Molecular Devices Sunny Valley, EUA) a 540 nm.

Os aminoácidos totais foram determinados como descrito por Gibon et al. (2006). Proteínas totais foram quantificadas seguindo o protocolo de Bradford (1976), com algumas modificações. Uma série de solução de albumina sérica bovina (BSA) diluída com o mesmo tampão de extração foi utilizada como padrão para a quantificação de proteínas. A quantificação de proteínas foi realizada em um leitor de microplacas (Molecular Devices Sunny Valley, EUA) a 595 nm. Por fim, as concentrações de clorofilas foram determinadas conforme descrito por Arnon (1949), com 30 μL do extrato diluído em 120 μL de etanol a 98%.

Análise RT-qPCR

Aproximadamente 100 mg de material vegetal coletados de plantas com 28 dias de idade foram utilizadas para extração de RNA total com o uso do RNAeasy Plant Mini Kit (Qiagen® Inc.), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, 4 μg de RNA total foram tratados com DNase I (Invitrogen®, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos). O RNA foi então utilizado para a síntese de cDNA com a adição da transcriptase reversa Superscript™ III (Invitrogen®, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos), de acordo com as instruções do fabricante. A quantidade do RNA isolado foi determinada via espectrofotômetro NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, Estados Unidos). As reações de RT-qPCR foram realizadas em um sistema de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) em tempo real StepOne™ (Applied Biosystems®) utilizando 4 nM dos *primers* (Tabela S1) com SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®). Os níveis de expressão dos genes-alvos foram expressos relativos à expressão dos genes constitutivos *actina* e *ubiquitina* e calculados utilizando o método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, de acordo com Livak e Schmittgen (2001).

Análise estatística

Para o crescimento das plantas, o delineamento experimental inteiramente casualizado foi adotado. Para análise de parâmetros de crescimento das plantas, a unidade experimental foi composta por quatro plantas com 10 repetições por tratamento. Para avaliação dos parâmetros fotossintéticos, dez plantas foram avaliadas. A unidade experimental para análise de metabólitos foi composta por 50 mg de material vegetal, por reação, com seis repetições por tratamento. Os

experimentos de determinação da expressão gênica tiveram a unidade experimental composta por 2 µg do RNA total, com três repetições. As características morfoanatômicas das folhas foram avaliadas em cinco repetições amostradas em dez plantas diferentes. A análise de variância ($P < 0,05$) foi feita para determinar o efeito entre os tratamentos. Quando a análise de variância (ANOVA) apresentou efeitos significativos, as diferenças entre as médias foram examinadas pelo teste *t*. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa R versão 3.4.4 (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria).

RESULTADOS

Crescimento de plantas de arroz sob elevada [CO₂]

A elevada [CO₂] aumentou significativamente a altura de plantas de arroz (Figura 1). Associada à essa resposta, a elevada [CO₂] aumentou em 31% a biomassa da folha, 30% a biomassa do colmo, 30% a biomassa da raiz, 30% a biomassa total, 28% o número de folhas, 25% a área foliar total, 38% o número de perfilhos, 14% a taxa de crescimento relativo, 9% o comprimento da folha bandeira e 8% o comprimento do colmo principal (Figura 2A-J). Por outro lado, o comprimento da raiz principal diminuiu em 12% em plantas cultivadas sob elevada [CO₂] quando comparadas às plantas mantidas sob [CO₂] ambiente (Figura 2K). Não houve diferença significativa na razão raiz/parte aérea quando plantas crescidas sob [CO₂] elevada foram comparadas com plantas mantidas sob [CO₂] ambiente (Figura 2L).

Alterações na anatomia foliar em plantas de arroz crescendo sob elevada [CO₂]

Diferenças significativas na anatomia da folha bandeira foram observadas entre plantas crescendo sob ambiente e elevada [CO₂] (Figura 3A, B). A elevada [CO₂] aumentou em 5% a espessura total das folhas e em 8% a espessura do mesófilo quando comparadas ao controle (Figura 4A, B). Esses resultados foram acompanhados por uma redução significativa na área foliar específica (16%) bem como na capacidade de transmissão da luz (17%) e reflectância (6%) na folha bandeira de plantas cultivadas sob elevada [CO₂], em comparação ao controle (Figura 4C-E). Por outro lado, a elevada [CO₂] aumentou a absorção de luz (4%) e a área foliar (11%) (Figura 4F, G). Não houve diferença significativa na densidade de

estômatos da face abaxial da folha, mas a densidade estomática adaxial reduziu significativamente em plantas sob elevada $[\text{CO}_2]$ em comparação com plantas controle (Figura 4H, I).



Figura 1. Fenótipo de plantas de arroz com 42 dias de idade cultivadas sob ambiente ou elevada $[\text{CO}_2]$ (A). Barra de escala: 20cm.

Parâmetros fotossintéticos em plantas de arroz crescendo sob elevada $[\text{CO}_2]$

Com o objetivo de entender como a modificação do crescimento e do desenvolvimento da folha pode afetar as trocas gasosas, os parâmetros fotossintéticos de plantas mantidas sob ambiente e elevada $[\text{CO}_2]$ foram analisados. Plantas de arroz cultivadas sob elevada $[\text{CO}_2]$ apresentaram redução de 20% e 16% em A sob concentração de referência de CO_2 de 400 e 750 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ de ar, respectivamente, em comparação ao controle (Tabela 1). Associado à essa resposta, uma redução em V_{cmax} (31%) e J_{max} (24%) em base C_i ($V_{\text{cmax-Ci}}$ e $J_{\text{cmax-Ci}}$) foi verificada em plantas crescidas sob elevada $[\text{CO}_2]$ quando comparadas as plantas sob $[\text{CO}_2]$ ambiente (Tabela 1). No entanto, não houve diferença significativa em C_i , g_s e P_r ,

quando plantas crescidas sob ambiente e elevada $[\text{CO}_2]$ foram comparadas (Tabela 1). Em adição, a elevada $[\text{CO}_2]$ causou redução de 21% e 27% em C_c , além de 39% e 45% em g_m sob concentração de referência de CO_2 de $400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ de ar e $750 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ de ar, respectivamente (Tabela 1).

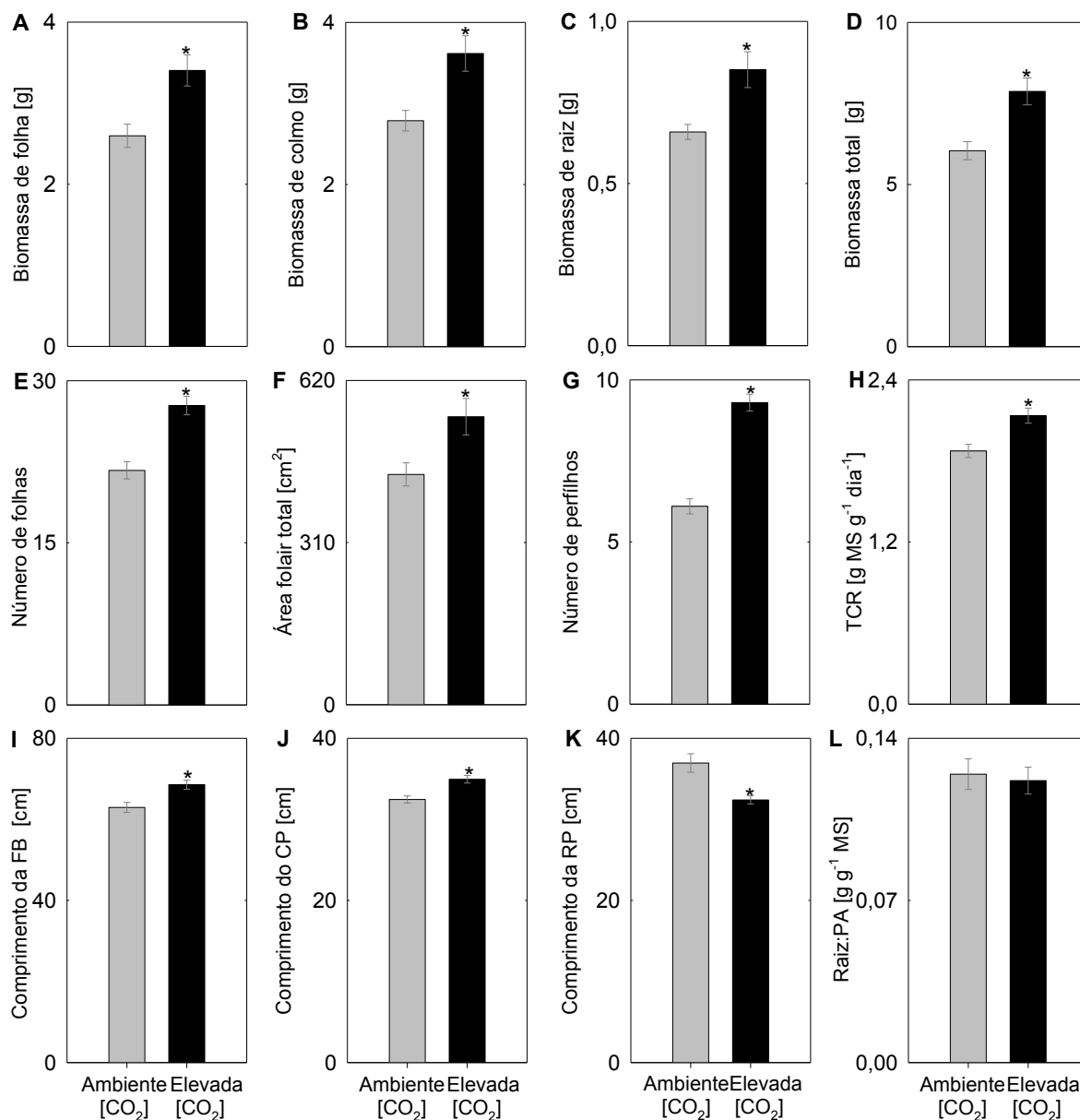


Figura 2. Parâmetros de crescimento em plantas de arroz com 42 dias de idade e cultivadas sob ambiente ou elevada $[\text{CO}_2]$. Biomassa de folha (A). Biomassa de colmo (B). Biomassa de raiz (C). Biomassa total (D). Número de folhas (E). Área foliar total (F). Número de perfilhos (G). Taxa de crescimento relativo (TCR) (H). Comprimento da folha bandeira (FB) (I). Comprimento do colmo principal (CP) (J). Comprimento da raiz principal (K). Razão raiz/parte aérea (L). Médias indicadas por asterisco diferem estatisticamente do controle (plantas sob $[\text{CO}_2]$ ambiente), em nível de 5% pelo teste *t*. Os valores representam as médias \pm erro padrão de 10 repetições.

Plantas cultivadas sob elevada $[\text{CO}_2]$ não apresentaram alterações significativas em V_{cmax} e J_{max} em base C_c , apresentando apenas diminuição significativa em TPU em ambas as bases - C_i e C_c (Tabela 1). Assim, para identificarmos qual componente funcional poderia estar limitando a fotossíntese sob elevada $[\text{CO}_2]$, uma análise de partição desses componentes foi realizada. Plantas sob elevada $[\text{CO}_2]$ apresentaram maior limitação mesofílica (42%) e menor limitação bioquímica (39%) em relação às aquelas sob $[\text{CO}_2]$ ambiente (Tabela 1). Além disso, não foi verificada diferença significativa na limitação estomática em plantas mantidas tanto sob ambiente quanto elevada $[\text{CO}_2]$. A elevada $[\text{CO}_2]$ também causou aumento de 12% e 8% em qP e de 53% e 30% em NPQ sob concentração de referência de CO_2 de $400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ de ar e $750 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ de ar, respectivamente, sendo acompanhados por incremento significativo na concentração de clorofila (Tabela 1). Por outro lado, nenhuma alteração foi observada em $Fv:Fm$, $Fv':Fm'$ e $\phi PSII$ tanto em plantas sob ambiente e elevada $[\text{CO}_2]$ em resposta as duas concentrações de CO_2 de referência utilizada durante a análise. Além disso, a elevada $[\text{CO}_2]$ não afetou E e WUE em ambas às concentrações de referência de CO_2 .

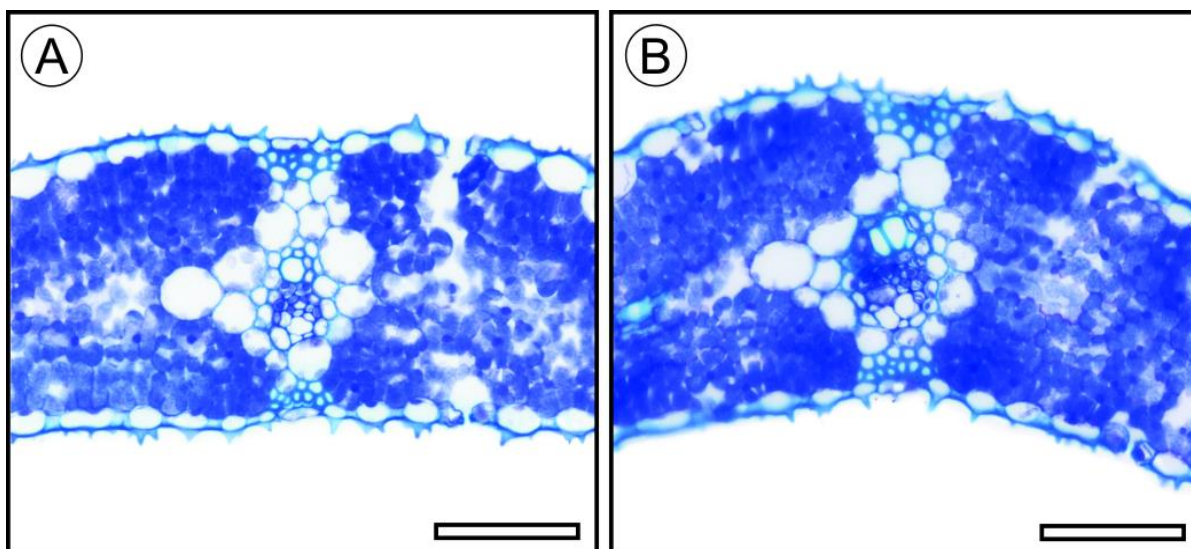


Figura 3. Seção transversal de folha bandeira de plantas de arroz com 42 dias de idade cultivadas sob ambiente (A) ou elevada $[\text{CO}_2]$ (B) (barra de escala: $50\mu\text{m}$).

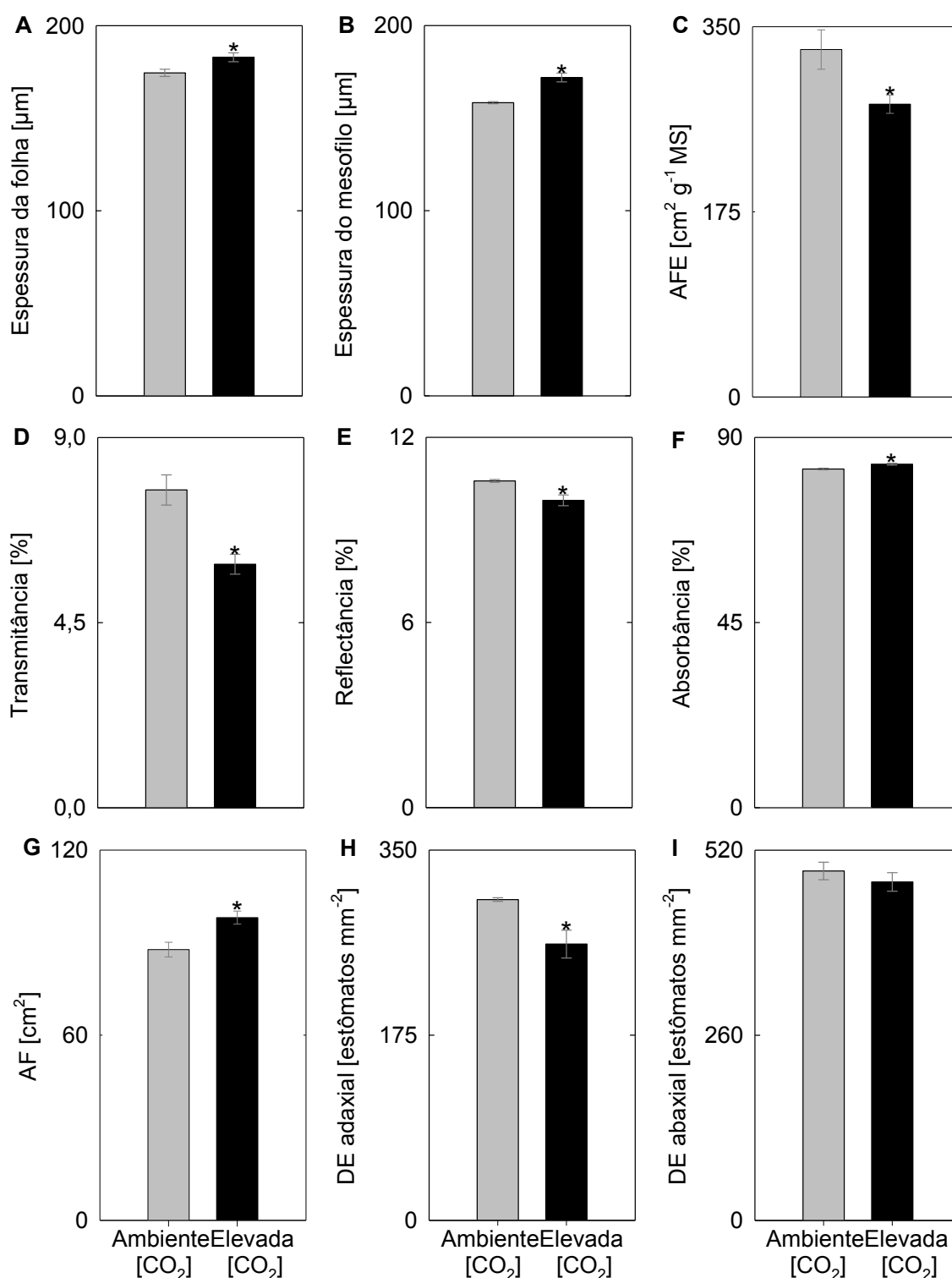


Figura 4. Efeitos da elevada [CO₂] na anatomia e nos parâmetros biofísicos em folhas de plantas de arroz com 42 dias de idade e cultivadas sob ambiente ou elevada [CO₂]. Espessura total da folha (A). Espessura do mesofilo (B). Área foliar específica da folha bandeira (AFE) (C). Transmitância da folha bandeira (D) Reflectância (E). Absorbância (F). Área foliar (G). Densidade estomática (DE) na face abaxial (H) e adaxial (I). Médias indicadas por asterisco diferem estatisticamente do controle (plantas sob [CO₂] ambiente), em nível de 5% pelo teste *t*. Os valores representam as médias \pm erro padrão de 6 repetições.

Tabela 1. Alterações nas trocas gasosas, parâmetros de fluorescência e níveis de clorofila em plantas de arroz com 42 dias de idade e cultivadas sob ambiente ou elevada [CO₂]. Médias indicadas em negrito diferem estatisticamente do controle (plantas sob [CO₂] ambiente), em nível de 5% pelo teste *t*. Os valores representam as médias ± erro padrão de 10 repetições.

Parâmetros	Ambiente [CO ₂]	Elevada[CO ₂]	<i>P</i> valor
<i>A</i> ₄₀₀ (μmol g ⁻¹ MS s ⁻¹)	0,709 ± 0,05	0,564 ± 0,02	0,016
<i>A</i> ₇₅₀ (μmol g ⁻¹ MS s ⁻¹)	0,991 ± 0,07	0,829 ± 0,03	0,047
<i>ETR</i> ₄₀₀ (μmol g ⁻¹ MS s ⁻¹)	5,545 ± 0,30	4,982 ± 0,19	0,130
<i>ETR</i> ₇₅₀ (μmol g ⁻¹ MS s ⁻¹)	5,858 ± 0,31	5,187 ± 0,12	0,070
<i>C</i> _{i400} (μmol CO ₂ mol ⁻¹ air)	314,5 ± 4,03	312,2 ± 2,85	0,654
<i>C</i> _{i750} (μmol CO ₂ mol ⁻¹ air)	619,2 ± 8,93	590,5 ± 12,1	0,074
<i>P</i> _{R750} (μmol g ⁻¹ MS s ⁻¹)	0,156 ± 0,01	0,154 ± 0,01	0,916
<i>V</i> _{cmax-Ci} (μmol g ⁻¹ MS s ⁻¹)	3,683 ± 0,33	2,540 ± 0,10	<0,001
<i>V</i> _{cmax-Cc} (μmol g ⁻¹ MS s ⁻¹)	4,432 ± 0,44	4,455 ± 0,15	0,950
<i>J</i> _{max-Ci} (μmol g ⁻¹ MS s ⁻¹)	5,346 ± 0,34	4,074 ± 0,13	0,005
<i>J</i> _{max-Cc} (μmol g ⁻¹ MS s ⁻¹)	5,568 ± 0,35	4,927 ± 0,20	0,132
<i>TPU</i> _{Ci}	0,396 ± 0,03	0,298 ± 0,01	0,004
<i>TPU</i> _{Cc}	0,397 ± 0,03	0,290 ± 0,01	0,004
<i>R</i> _L (μmol CO ₂ g ⁻¹ MS s ⁻¹)	0,019 ± 0,00	0,013 ± 0,00	0,001
<i>R</i> _d (μmol CO ₂ g ⁻¹ MS s ⁻¹)	0,039 ± 0,00	0,027 ± 0,00	0,001
<i>g</i> _{s 400} (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	629,4 ± 34,5	569,0 ± 30,5	0,207
<i>g</i> _{s 750} (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	385,3 ± 31,9	319,9 ± 23,4	0,117
<i>g</i> _{m400} (mol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	264,0 ± 11,9	161,9 ± 10,1	<0,001
<i>g</i> _{m750} (mol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	207,2 ± 15,2	113,1 ± 7,15	<0,001
<i>E</i> ₄₀₀ (mmol H ₂ O g ⁻¹ MS s ⁻¹)	251,2 ± 16,5	215,9 ± 19,3	0,181
<i>E</i> ₇₅₀ (mmol H ₂ O g ⁻¹ MS s ⁻¹)	197,2 ± 19,0	154,8 ± 10,8	0,072
<i>EUA</i> ₄₀₀ (μmol CO ₂ mol H ₂ O ⁻¹)	2,923 ± 0,24	2,738 ± 0,16	0,537
<i>EUA</i> ₇₅₀ (μmol CO ₂ mol H ₂ O ⁻¹)	5,231 ± 0,34	5,556 ± 0,35	0,514
<i>Fv:Fm</i> ₄₀₀	0,789 ± 0,01	0,787 ± 0,01	0,901
<i>Fv:Fm</i> ₇₅₀	0,789 ± 0,01	0,788 ± 0,01	0,842
<i>Fv':Fm'</i> ₄₀₀	0,616 ± 0,01	0,620 ± 0,01	0,738
<i>Fv':Fm'</i> ₇₅₀	0,648 ± 0,00	0,634 ± 0,01	0,130
<i>φ</i> _{PSII400}	0,392 ± 0,01	0,416 ± 0,01	0,152
<i>φ</i> _{PSII750}	0,412 ± 0,01	0,435 ± 0,01	0,130
<i>qP</i> ₄₀₀	0,637 ± 0,02	0,715 ± 0,02	0,020
<i>qP</i> ₇₅₀	0,636 ± 0,02	0,686 ± 0,01	0,040
<i>NPQ</i> ₄₀₀	1,048 ± 0,11	1,601 ± 0,08	<0,001
<i>NPQ</i> ₇₅₀	0,801 ± 0,06	1,039 ± 0,04	0,004
Clorofila (mg g ⁻¹ MF)	2,225 ± 0,21	3,188 ± 0,18	0,006
Limitação estomática	0,173 ± 0,00	0,183 ± 0,01	0,505
Limitação mesofílica	0,256 ± 0,01	0,422 ± 0,01	<0,001
Limitação bioquímica	0,571 ± 0,02	0,395 ± 0,01	<0,001

Alterações no metabolismo primário em plantas de arroz sob elevada [CO₂]

A fim de investigar os efeitos da [CO₂] no metabolismo primário de plantas de arroz, os níveis de glicose, frutose, amido, malato, fumarato, nitrato, aminoácidos e proteína total em folhas, caules e raízes no final do dia (FD) e no final da noite (FN) foram quantificados. No FN, plantas de arroz sob elevada [CO₂] apresentaram maior concentração de glicose (69%) na folha e no colmo (47%) em comparação ao controle (Tabela 2). Por outro lado, não houve diferença significativa na concentração de glicose na raiz no FD e no FN quando plantas sob ambiente e elevada [CO₂] foram comparadas. As concentrações de frutose no colmo tanto no FD (33%) quanto no FN (28%) exibiram redução significativa sob elevada [CO₂] quando comparado com as plantas mantidas sob [CO₂] ambiente. A elevada [CO₂] também promoveu aumento na concentração de sacarose nas folhas de 21% e 42% e nas raízes de 43% e 189% no FD e FN, respectivamente, em relação às plantas mantidas sob [CO₂] ambiente (Tabela 2). A elevada [CO₂] não afetou a concentração de sacarose no colmo tanto no FD e no FN em comparação com as plantas sob [CO₂] ambiente. Ademais, a concentração de amido na folha, colmo e raiz não foi alterada, quando plantas sob ambiente e elevada [CO₂] foram comparadas tanto no FD quanto no FN.

Como o metabolismo do carbono é acoplado ao metabolismo dos ácidos orgânicos, os níveis de malato e fumarato na folha, colmo e raiz tanto no FD quanto no FN foram avaliados. Essas análises demonstraram que a concentração de malato reduziu significativamente nas raízes de plantas de arroz crescendo sob elevada [CO₂] no FN em comparação com as plantas mantidas sob [CO₂] ambiente (Tabela 2). A elevada [CO₂] diminuiu (74%) a concentração de fumarato nas folhas no FD, em relação as plantas sob [CO₂] ambiente (Tabela 2). As plantas cultivadas sob elevada [CO₂] não apresentaram alterações significativas na concentração de malato nas folhas e colmo e na concentração de fumarato no colmo e nas raízes no FD e FN, em comparação com as plantas cultivadas sob [CO₂] ambiente. No FN, houve diminuição significativa na concentração de malato nas folhas de plantas cultivadas tanto sob ambiente quanto sob elevada [CO₂] quando comparado com as plantas no FD (Tabela 2).

A concentração de nitrato nas folhas, colmo e raízes não foi significativamente alterada, tanto no FD quanto no FN, em plantas cultivadas sob elevada [CO₂], em relação às plantas sob [CO₂] ambiente (Tabela 2). Por outro lado, a elevada [CO₂]

Tabela 2. Alterações nos níveis de metabólitos plantas de arroz com 42 dias de idade e cultivadas sob ambiente ou elevada [CO₂]. Os metabólitos foram quantificados em amostras de folha, colmo e raiz coletadas no final do dia (FD) e no final da noite (FN) de plantas de arroz com 42 dias de idade, cultivadas sob 400 ou 750 μmol de CO₂ mol⁻¹ ar. Médias indicadas em negrito diferem estatisticamente dos respectivos controles (plantas sob [CO₂] ambiente no FD ou FN, em nível de 5% pelo teste *t*. Os valores representam as médias ± erro padrão de 6 repetições.

Metabólitos	Orgão	Ambiente [CO ₂]		Elevada[CO ₂]	
		FD	FN	FD	FN
Glicose (μmol g ⁻¹ MF)	Folha	0,76±0,10	0,50±0,06	0,77±0,08	0,83±0,09
	Colmo	2,21±0,22	2,54±0,32	2,19±0,29	1,36±0,08
	Raiz	1,20±0,07	0,96±0,05	1,26±0,14	0,99±0,12
Frutose (μmol g ⁻¹ MF)	Folha	1,28±0,12	2,09±0,38	1,36±0,14	2,26±0,26
	Colmo	3,35±0,31	3,66±0,11	2,23±0,18	2,64±0,28
	Raiz	0,29±0,11	0,20±0,03	0,21±0,06	0,22±0,03
Sacarose (μmol g ⁻¹ MF)	Folha	30,6±2,10	17,5±1,17	37,0±3,28	25,0±1,67
	Colmo	13,6±0,88	6,42±0,28	15,7±1,34	6,53±0,54
	Raiz	1,31±0,15	0,28±0,03	1,87±0,17	0,82±0,20
Amido (mg g ⁻¹ MF)	Folha	1,85±0,15	1,38±0,16	1,86±0,27	1,29±0,16
	Colmo	2,31±0,25	2,66±0,12	2,32±0,13	2,57±0,10
	Raiz	2,25±0,24	2,21±0,07	2,25±0,11	2,30±0,06
Malato (μmol g ⁻¹ MF)	Folha	9,23±0,35	3,89±0,31	9,11±0,54	3,67±0,41
	Colmo	3,51±0,12	2,81±0,27	3,71±0,41	2,84±0,36
	Raiz	1,40±0,09	1,60±0,07	1,32±0,08	1,12±0,06
Fumarato (μmol g ⁻¹ MF)	Folha	0,67±0,14	1,28±0,22	0,17±0,05	1,29±0,14
	Colmo	0,51±0,12	0,23±0,04	0,66±0,07	0,30±0,07
	Raiz	0,11±0,01	0,08±0,03	0,12±0,01	0,08±0,01
Nitrato (μmol g ⁻¹ MF)	Folha	2,76±0,15	3,77±0,12	2,79±0,21	3,81±0,22
	Colmo	4,81±0,28	4,71±0,27	4,79±0,44	4,83±0,47
	Raiz	6,08±0,37	6,09±0,23	6,20±0,76	5,95±0,45
Aminoácidos (μmol g ⁻¹ MF)	Folha	18,9±0,62	17,0±1,05	23,3±0,41	16,0±0,66
	Colmo	10,7±1,29	11,5±0,63	14,7±0,85	15,3±1,03
	Raiz	8,69±0,58	8,51±0,62	14,3±2,01	9,18±0,55
Proteínas (mg g ⁻¹ MF)	Folha	38,9±1,41	45,6±2,79	42,7±0,48	48,6±2,15
	Colmo	14,2±1,69	14,2±0,79	14,0±1,44	15,1±2,01
	Raiz	11,1±0,61	13,6±1,24	11,3±0,50	13,9±1,46

promoveu aumento na concentração de aminoácidos no colmo de 37% e 33% tanto no FD quanto no FN, respectivamente, em relação às plantas mantidas sob [CO₂] ambiente. Ademais, a concentração de proteína aumentou significativamente nas

folhas no FD em plantas sob elevada $[CO_2]$ em comparação às plantas sob $[CO_2]$ ambiente.

Alterações na expressão de genes relacionados ao metabolismo hormonal e à expansão celular em plantas crescendo sob elevada $[CO_2]$

Para investigar os efeitos da elevada $[CO_2]$ sobre o padrão de expressão de genes envolvidos com o crescimento de plantas, os níveis de transcritos que codificam proteínas da via de biossíntese ou catabolismo de hormônios bem como envolvidas com a expansão e rearranjo da parede celular foram avaliados (Figura 5).

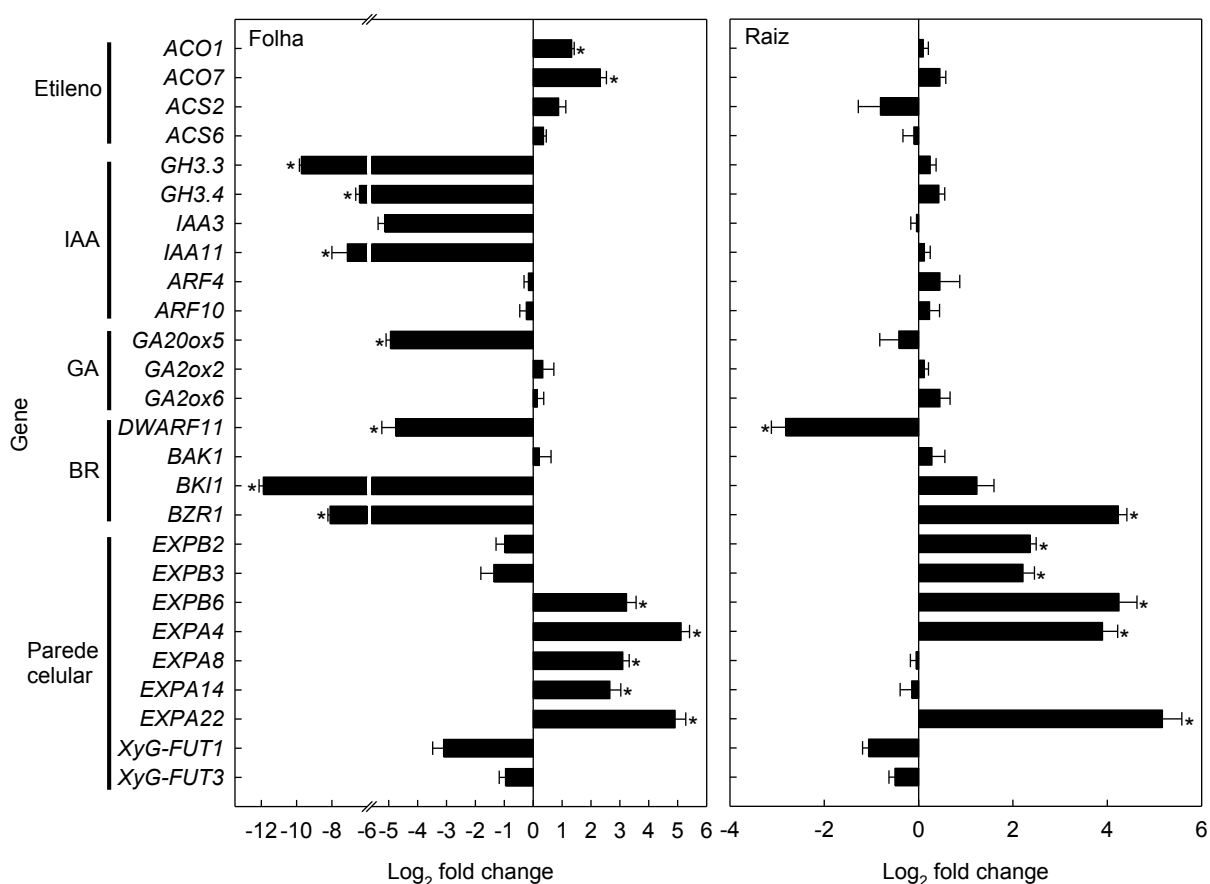


Figura 5. Alterações na expressão gênica em folhas e raízes de plantas de arroz com 28 dias de idade e cultivadas sob elevada $[CO_2]$. Os dados foram normalizados em relação à resposta média obtida no tratamento $[CO_2]$ ambiente (controle). As sequências dos *primers* utilizados estão apresentadas na Tabela S1. Médias indicadas por asterisco diferem estatisticamente do controle (plantas sob $[CO_2]$ ambiente), em nível de 5% pelo teste *t*. Os valores representam as médias \pm erro padrão de 3 repetições.

Nas folhas, a elevada $[CO_2]$ aumentou significativamente a expressão dos genes envolvidos com a biossíntese de etileno (*ACO1* e *ACO7*) e *EXPs* (*EXPB6*,

EXPA4, *EXPA8*, *EXPA14* e *EXPA22*) (Figura 5A). Por outro lado, a expressão dos genes envolvidos com a sinalização/resposta auxina (*GH3.3*, *GH3.4*, *IAA3* e *IAA11*) e brassinosteróides (*BKI1* e *BZR1*) foi significativamente reduzida nas folhas de plantas de arroz cultivadas sob elevada [CO₂] (Figura 5A). Além disso, diminuição na expressão de *GA20ox5*, enzima envolvida na via de biossíntese de GA, e *DWARF11*, relacionado à via de biossíntese de BR, também foi observada nas folhas de plantas mantidas sob elevada [CO₂] (Figura 5A).

A elevada [CO₂] não afetou de forma significativa a expressão dos genes *ACS2*, *ACS6*, *ARF4*, *ARF10*, *GA2ox2*, *GA2ox6*, *BAK1*, *EXPB2*, *EXPB3*, *XyG-FUT1* e *XyG-FUT3* nas folhas de plantas de arroz (Figura 5A). Por outro lado, na raiz, houve aumento significativo na expressão de *BZR1* bem como de *EXPB2*, *EXPB3*, *EXPB6*, *EXPA4* e *EXPA22* em resposta à elevada [CO₂] (Figura 5B), sem alteração significativa na expressão de *ACO1*, *ACO7*, *ACS2*, *ACS6*, *GH3.3*, *GH3.4*, *IAA3*, *IAA11*, *ARF4*, *ARF10*, *GA20ox5*, *GA2ox2*, *GA2ox6*, *BAK1*, *BKI1*, *EXPA8*, *EXPA14*, *XyG-FUT1* e *XyG-FUT3* (Figura 5B). Diferentemente, *DWARF11* foi negativamente regulado em raiz de plantas sob elevada [CO₂] (Figura 5B).

DISCUSSÃO

O crescimento de plantas de arroz sob elevada [CO₂] ocorre por meio da regulação positiva de expansinas de forma distinta da então observada sob [CO₂] ambiente

O controle do crescimento de plantas envolve alterações na divisão e na expansão celular (Schopfer, 2006). As expansinas (*EXPs*), nesse sentido, são uma classe de proteínas que participam do processo de expansão celular, agindo efetivamente como reguladoras positivas do crescimento de plantas (Lee et al., 2001; Lee and Choi, 2005; Schmidt et al., 2013). Sua expressão é positivamente regulada por auxina (AIA), brassinosteróides (BR) e negativamente regulada por ácido abscísico (ABA) e citocinina (CK) (Schmidt et al., 2013). No presente estudo, a elevada [CO₂] regulou positivamente a expressão de *EXPs* na folha (Figura 5), o que foi acompanhado pelo aumento na biomassa desse órgão (Figura 2). Entretanto, a elevada [CO₂] regulou negativamente genes envolvidos com a biossíntese de AIA, BR e GA e positivamente genes relacionados com a biossíntese de etileno (*ACO1* e *ACO7*) na folha (Figura 5). Esses dados evidenciam que a elevada [CO₂] coordena o

crescimento de plantas de arroz alterando múltiplas rotas hormonais em nível transcricional. Além disso, é possível sugerir que a regulação da expressão de *EXPs* sob elevada $[CO_2]$ ocorre de forma distinta da então observada sob $[CO_2]$ ambiente, a qual responde principalmente a IAA, BR e GA.

O crescimento e desenvolvimento do sistema radicular de plantas necessita de uma regulação coordenada de sinais endógenos, sendo intimamente relacionadas aos fitohormônios (Müssig et al., 2003). Nesse sentido, tem sido sugerido que BR é um dos reguladores positivos do crescimento da raiz em plantas arroz por regular negativamente o fator de transcrição MULTIPASS (R2R3-type MYB transcription factor), um repressor de *EXPs* (Schmidt et al., 2013). No presente estudo, a elevada $[CO_2]$ regulou positivamente *BZR1* na raiz (Figura 5), o que também foi associado ao aumento significativo na transcrição de *EXPB2*, *EXPB3*, *EXPB6*, *EXPA4* e *EXPA22* nesse órgão (Figura 3). Com efeito, sugere-se que BR coordena o crescimento da raiz em plantas de arroz sob elevada $[CO_2]$ via regulação positiva da expressão de *EXPs*. Em consonância com essa hipótese, a expressão de *DWARF11* foi significativamente reduzida em raiz de plantas sob elevada $[CO_2]$ (Figura 3B), sugerindo um possível *feedback* negativo ao acúmulo de BR no tecido (Tanaka et al., 2005; Tanabe et al., 2005).

A limitação da fotossíntese em plantas de arroz sob elevada $[CO_2]$ é causada por limitação difusiva em detrimento da limitação bioquímica

Como componente do metabolismo primário, a fotossíntese (A) é um processo fundamental para o crescimento e desenvolvimento das plantas (Ainsworth e Rogers, 2007). No presente estudo, A diminuiu significativamente em plantas cultivadas sob elevada $[CO_2]$ quando comparadas às plantas mantidas sob $[CO_2]$ ambiente (Tabela 1). Essa diminuição foi associada à diminuição em $V_{cmax-Ci}$ (Tabela 1). Tem sido relatado, nesse contexto, que a diminuição em V_{cmax} em plantas crescendo sob elevada $[CO_2]$ está relacionada à diminuição da disponibilidade de nitrogênio e, mais precisamente, ao teor de ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) (Evans, 1989; Makino and Osmond, 1991; Gamage et al., 2018b). Entretanto, as concentrações de proteína e nitrato nas folhas de plantas crescendo sob elevada $[CO_2]$ não foram alteradas (Tabela 2) tanto no FD quanto no FN, sugerindo que a limitação fotossintética demonstrada no presente estudo (Tabela 1) não está

associada ao metabolismo do nitrogênio. Por outro lado, sabe-se que algumas alterações na anatomia da folha pode afetar a difusão do CO_2 até o sítio de carboxilação da Rubisco (Tholen e Zhu, 2011). Neste sentido, a análise da condutância mesofílica (g_m) e da concentração cloroplastídica de CO_2 (C_c) tem sido uma abordagem importante para investigar a alteração do fluxo de CO_2 na folha. No presente trabalho, tanto g_m quanto C_c reduziram significativamente em plantas cultivadas sob ambiente e elevada $[\text{CO}_2]$. Consistente com esses resultados, a análise de partição de componentes funcionais que podem limitar a fotossíntese demonstrou que plantas crescendo sob elevada $[\text{CO}_2]$ apresentam maior limitação mesofílica quando comparadas às plantas crescendo sob $[\text{CO}_2]$ ambiente (Tabela 1). Esse dado indica que a limitação da fotossíntese em plantas de arroz sob elevada $[\text{CO}_2]$ é causada por limitação difusiva em detrimento da limitação bioquímica. Ademais, é possível especular que tal limitação está associado com as alterações observadas na anatomia (Figura 2, Figura 3) e nos aspectos biofísicos da folha, como as alterações na reflectância e transmitância (Figura 3D,E).

Como órgão dreno, a raiz está diretamente envolvida com o efluxo de carbono das folhas como fonte de energia ou como componente da parede celular, estimulando o crescimento (Kircher e Schopfer, 2012). Nesse contexto, tem sido demonstrado que a aplicação de açúcar estimula o crescimento de raízes em plantas de *Arabidopsis* (Takahashi et al., 2003) e milho (Ogawa et al., 2009). Por outro lado, sabe-se também que o metabolismo do carbono está intrinsecamente associado ao metabolismo do nitrogênio (Araya et al., 2006; Sienkiewicz-Porzucek et al. 2010). O ciclo dos ácidos tri-carboxílicos participa do balanço C/N fornecendo esqueleto de carbono para a síntese de aminoácidos (Nunes-Nesi et al., 2007). No presente estudo, a elevada $[\text{CO}_2]$ aumentou significativamente a concentração de sacarose nas raízes tanto no FD quanto no FN, bem como aumentou significativamente as concentrações de aminoácido no FD (Tabela 2). Consistente com o papel dos ácidos orgânicos na síntese de aminoácidos, diminuição nos níveis de malato também foi verificado no FN (Tabela 2). Coletivamente, esses dados sugerem que a elevada $[\text{CO}_2]$ promove alterações no metabolismo da raiz que favorecem um maior crescimento (Figura 2), via maiores níveis de sacarose e, possivelmente, maior biossíntese de aminoácidos (Schmidt et al., 2013).

CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que ganhos no crescimento de plantas de arroz sob elevada [CO₂] são acompanhados pelo aumento da expressão de genes envolvidos com a expansão celular via alteração de múltiplas rotas hormonais em nível transcricional. Em adição, evidenciou-se que a regulação positiva de expansinas em plantas de arroz sob elevada [CO₂] ocorre de maneira diferente da observada sob [CO₂] ambiente. Por outro lado, apesar do maior ganho de biomassa, plantas de arroz sob elevada [CO₂] apresentam limitação difusiva na fotossíntese, o que pode estar relacionado às alterações na anatomia e nas características biofísicas da folha. Por fim, evidenciou-se que a elevada [CO₂] favorece maior crescimento da raiz via alterações no metabolismo primário, refletido por maior acúmulo de sacarose e aminoácidos.

REFERÊNCIAS

- Ainsworth EA, Rogers A** (2007). The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO₂]: Mechanisms and environmental interactions. *Plant, Cell & Environment* **30**: 258-270.
- Araya T, Noguchi K, Terashima I** (2006) Effects of carbohydrate accumulation on photosynthesis differ between sink and source leaves of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Cell Physiology* **47**:644-652
- Atkin OK, Tjoelker MG** (2003) Thermal acclimation and the dynamic response of plant respiration to temperature. *Trends in Plant Science* **8**: 343-351
- Bernacchi CJ** (2002) Temperature response of mesophyll conductance. implications for the determination of rubisco enzyme kinetics and for limitations to photosynthesis *in vivo*. *Plant Physiology* **130**: 1992-1998
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**:248-254
- Centritto M, Lauteri M, Monteverdi MC, Serraj R** (2009) Leaf gas exchange, carbon isotope discrimination, and grain yield in contrasting rice genotypes subjected to water deficits during the reproductive stage. *Journal of Experimental Botany* **60**: 2325-2339
- Choi D** (2003) Regulation of expansin gene expression affects growth and development in transgenic rice plants. *Plant Cell* **15**:1386-98.
- Cross JM, von Korff M, Altmann T, Bartzetko L, Sulpice R, Gibon Y, Palacios N,**

Stitt M (2006) Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 arabidopsis accessions growing in carbon-limited conditions. *Plant Physiology* **142**: 1574-1588

Evans JR (1989) Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants. *Oecologia* **78**:9-19

Farquhar GD, Caemmerer S Von, Berry JA (1980) A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C3 species. *Planta* **90**: 78-90

Furbank RT, Sage RF (2016) Editorial overview: Physiology and metabolism: CO₂ concentrating mechanisms in photosynthetic organisms: Evolution, efficiency and significance for crop improvement. *Current Opinion in Plant Biology* **31**:1

Gamage D, Thompson M, Sutherland M, Hirotsu N, Makino A, Seneweera S (2018) New insights into the cellular mechanisms of plant growth at elevated atmospheric carbon dioxide. *Plant, Cell & Environment* **41**:1233-1246

Geigenberger P, Lerchl J, Stitt M, Sonnewald U (1996) Phloem-specific expression of pyrophosphatase inhibits long-distance transport of carbohydrates and amino acids in tobacco plants. *Plant, Cell & Environment* **19**: 43-55

Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica and Biophysica Acta* **990**: 87-92

Gibon Y, Usadel B, Blaesing OE, Kamlage B, Hoehne M, Trethewey R, Stitt M (2006) Integration of metabolite with transcript and enzyme activity profiling during diurnal cycles in *Arabidopsis* rosettes. *Genome Biology* **7**(8): R76.

Gorton HL, Brodersen CR, Williams WE, Vogelmann TC (2010) Measurement of the optical properties of leaves under diffuse light. *Photochemistry and Photobiology* **86**: 1076-1083

Grassi G, Magnani F (2005) Stomatal, mesophyll conductance and biochemical limitations to photosynthesis as affected by drought and leaf ontogeny in ash and oak trees. *Plant, Cell & Environment* **28**: 834-849

Hendriks JHM (2003) ADP-Glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of arabidopsis and other plant species. *Plant Physiology* **133**: 838-849

Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station* **347**: 1-32

Hunt R (1982) Plant growth analysis: Second derivatives and compounded second derivatives of splined plant growth curves. *Annals of Botany* **50**: 317-328

Johansen DA (1940) *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill, New York, 523

Kircher S, Schopfer P (2012) Photosynthetic sucrose acts as cotyledon-derived long-distance signal to control root growth during early seedling development in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

America **109**: 11217-11221

Kush GS (2001) Green revolution: the way forward. *Nature Reviews Genetics* **2**: 815–822

Leakey ADB, Ainsworth EA, Bernacchi CJ, Rogers A, Long SP, Ort DR (2009) Elevated CO₂ effects on plant carbon, nitrogen, and water relations: Six important lessons from FACE. *Journal of Experimental Botany* **60**: 2859-2876

Leakey ADB, Xu F, Gillespie KM, McGrath JM, Ainsworth E, Ort DR (2009) Genomic basis for stimulated respiration by plants growing under elevated carbon dioxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 3597-602

Lee Y, Choi D (2005) Biochemical properties and localization of the beta-expansin *OsEXPB3* in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecule and Cells* **20**: 119-126

Lee Y, Choi D, Kende H (2001) Expansins: Ever-expanding numbers and functions. *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 527-532

Lee Y, Kende H (2001) Expression of beta-expansins is correlated with internodal elongation in deepwater rice. *Plant Physiology* **127**: 645-654

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} Method. *Methods* **25**: 402-408

Li Y, Jones L, McQueen-Mason S (2003) Expansins and cell growth. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 603-610

Logan BA, Adams WW, Demmig-Adams B (2007) Avoiding common pitfalls of chlorophyll fluorescence analysis under field conditions. *Functional Plant Biology* **34**: 853-859

Makino A, Osmond B (1991) Effects of nitrogen nutrition on nitrogen partitioning between chloroplasts and mitochondria in pea and wheat. *Plant Physiology* **96**:355-62

Markelz RJC, Lai LX, Vosseler LN, Leakey ADB (2014) Transcriptional reprogramming and stimulation of leaf respiration by elevated CO₂ concentration is diminished, but not eliminated, under limiting nitrogen supply. *Plant, Cell & Environment* **37**: 886-898

Martins SCV, Galmés J, Molins A, DaMatta FM (2013) Improving the estimation of mesophyll conductance to CO₂: On the role of electron transport rate correction and respiration. *Journal of Experimental Botany* **64**: 3285-3298

Mori H (2000) Direct determination of nitrate using nitrate reductase in a flow system. *Journal of Health Sciences* **46**: 385-388

Mussig C, Shin GH, Altmann T (2003) Brassinosteroids promote root growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **133**: 1261-1271.

Nunes-Nesi A, Carrari F, Gibon Y, Sulpice R, Lytovchenko A, Fisahn J, Graham

J, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR (2007) Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *Plant Journal* **50**: 1093-1106

Ogawa A, Ando F, Toyofuku K, Kawashima C (2009) Sucrose metabolism for the development of seminal root in maize seedlings. *Plant Production Science* **12**: 9-16

Pantin F, Simonneau T, Rolland G, Dauzat M, Muller B (2011) Control of leaf expansion: a developmental switch from metabolics to hydraulics. *Plant Physiology* **156**: 803- 815.

Pinelli P, Loreto F (2003) $^{12}\text{CO}_2$ emission from different metabolic pathways measured in illuminated and darkened C3 and C4 leaves at low, atmospheric and elevated CO_2 concentration. *Journal of Experimental Botany* **54**: 1761-1769

R Core Team (2016) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

Reddy AR, Rasineni GK, Raghavendra AS (2010) The impact of global elevated CO_2 concentration on photosynthesis and plant productivity. *Current Science* **99**: 46-57

Ribeiro DM, Araujo WL, Fernie AR, Schippers J, Mueller-Roeber B (2012) Action of gibberellins on growth and metabolism of *Arabidopsis thaliana* plants associated with high concentration of carbon dioxide. *Plant Physiology* **160**: 1781-1794

Rodeghiero M, Niinemets Ü, Cescatti A (2007) Major diffusion leaks of clamp-on leaf cuvettes still unaccounted: How erroneous are the estimates of Farquhar et al. model parameters? *Plant, Cell & Environment* **30**: 1006-1022

Schmidt R, Schippers JHM, Mieulet D, Obata T, Fernie AR, Guiderdoni E, Mueller-Roeber B (2013) MULTIPASS, a rice R2R3-type MYB transcription factor, regulates adaptive growth by integrating multiple hormonal pathways. *Plant Journal* **76**: 258-273

Schopfer P (2006) Biomechanics of plant growth. *American Journal of Botany* **93**: 1415-1425

Seneweera S, Aben SK, Basra AS, Jones B, Conroy JP (2003) Involvement of ethylene in the morphological and developmental response of rice to elevated atmospheric CO_2 concentrations. *Plant Growth Regulation* **39**: 143-153

Seneweera S, Makino A, Hirotsu N, Norton R, Suzuki Y (2011) New insight into photosynthetic acclimation to elevated CO_2 : The role of leaf nitrogen and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase content in rice leaves. *Environment and Experimental Botany* **71**: 128-136

Sharkey TD, Bernacchi CJ, Farquhar GD, Singaas EL (2007) Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C3 leaves. *Plant, Cell & Environment* **30**: 1035-1040

Scienkiewicz-Porzucek A, Nunes-Nesi A, Sulpice R, Lisec J, Centeno DC, Carillo P, Leisse A, Urbanczyk-Wochniak E, Fernie AR (2008) Mild reductions in

mitochondrial citrate synthase activity result in a compromised nitrate assimilation and reduced leaf pigmentation but have no effect on photosynthetic performance or growth. *Plant Physiology* **147**: 115-127

Smith AM, Stitt M (2007) Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant, Cell & Environment* **30**: 1126-1149

Takahashi F, Sato-Nara K, Kobayashi K, Suzuki M, Suzuki H (2003) Sugar-induced adventitious roots in *Arabidopsis* seedlings. *Journal of Plant Research* **116**:83-91

Tanabe S, Ashikari M, Fujioka S, Takatsuto S, Yoshida S, Yano M, Yoshimura A, Kitano H, Matsuoka M, Fujisawa Y, Kato H, Iwasaki Y (2005) A novel cytochrome P450 is implicated in brassinosteroid biosynthesis via the characterization of a rice dwarf mutant, *dwarf11*, with reduced seed length. *Plant Cell* **17**: 776-790.

Tanaka K, Asami T, Yoshida S, Nakamura Y, Matsuo T, Okamoto S (2005) Brassinosteroid homeostasis in *Arabidopsis* is ensured by feedback expressions of multiple genes involved in its metabolism. *Plant Physiology* **138**: 1117-1125

Tholen D, Zhu X-G (2011) The mechanistic basis of internal conductance: A theoretical analysis of mesophyll cell photosynthesis and CO₂ diffusion. *Plant Physiology* **156**: 90-105

Valentini R, Epron D, Angelis P, Matteucci G, Dreyer E (1995) In situ estimation of net CO₂ assimilation, photosynthetic electron flow and photorespiration in Turkey oak (*Q. cerris* L.) leaves: diurnal cycles under different levels of water supply. *Plant, Cell & Environment* **18**: 631-640

Vicente R, Pérez P, Martínez-Carrasco R, Feil R, Lunn JE, Watanabe M, Arrivault S, Stitt M, Hoefgen R, Morcuende R (2016) Metabolic and transcriptional analysis of durum wheat responses to elevated CO₂ at low and high nitrate supply. *Plant Cell and Physiology* **57**: 2133-2146

Xu Z, Jiang Y, Zhou G (2015) Response and adaptation of photosynthesis, respiration, and antioxidant systems to elevated CO₂ with environmental stress in plants. *Frontiers in Plant Science* **6**: 701

Zhang G, Sakai H, Tokida T, Usui Y, Zhu C, Nakamura H, Yoshimoto M, Fukuoka M, Kobayashi K, Hasegawa T (2013) The effects of free-air CO₂ enrichment (FACE) on carbon and nitrogen accumulation in grains of rice. *Journal of Experimental Botany* **64**: 3179-3188

Zhu C, Xu X, Wang D, Zhu J, Liu G (2015a) An indica rice genotype showed a similar yield enhancement to that of hybrid rice under free air carbon dioxide enrichment. *Scientific Reports* **5**: 1-9

Zhu C, Xu X, Wang D, Zhu J, Liu G, Seneweera S (2015b) Elevated atmospheric [CO₂] stimulates sugar accumulation and cellulose degradation rates of rice straw. *GCB Bioenergy* **8**: 579-587.

Zsögön A, Negrini ACA, Peres LEP, Nguyen HT, Ball MC (2015). A mutation that

eliminates bundle sheath extensions reduces leaf hydraulic conductance, stomatal conductance and assimilation rates in tomato (*Solanum lycopersicum*). *New Phytologist* **205**: 618–26.

Material suplementar

Tabela S1. Sequência dos primers utilizados para as análises de PCR em tempo real (qRT-PCR)

	Nome	Sequências	
		Forward	Reverse
Os01g13030	<i>IAA3</i>	ACAAGGATGGTGA CTGGATGCTG	GCAAGAGTCGGTGAACATCTCC
Os03g43400	<i>IAA11</i>	AGCAGCTGAAGGAGAGCAATAAGC	TGCACGACTCGACGAACATCTC
Os01g70270	<i>ARF4</i>	TCGACGAGGAGTTGTACAAAGGTC	ATCCACAGATCTGCCAAGTGCAAC
Os04g43910	<i>ARF10</i>	CAGCATTGGCAGCGATGAACTG	ATTTACGAACGCGCAGAATGG
Os01g12160	<i>GH3.3</i>	TTCAACGAGGAGCTCGTCAAGTC	TTCTCCACCGGAAACTCCCTGTTG
Os05g42150	<i>GH3.4</i>	GCAACAAGCAGTGGATCAGCAG	AGCCAAGCTATCACAGGTCTGTC
Os04g39430	<i>DWARF11</i>	TGAGGTTCTCAGTCTCATGC	AAACACCCTCCCATACCTGGAG
Os04g38480	<i>BAK1</i>	TCGCATCACGATTGCGAGAG	AGCGCAATCCGAGTTCTTGTTG
Os09g28550	<i>BKI1</i>	CTCCTCAAAGCAAACCAGCAC	TCTTGGCCTTGTACTCCCTGTC
Os07g39220	<i>BZR1</i>	TCCCGTACCTGTCATGTGCATC	GGTACGTCAAAGCGATCATGCC
Os10g40710	<i>EXPB2</i>	CAACCAGTACCCGTTTCATGTCC	GTTGTTGGTGCACCGTATCTGG
Os10g40720	<i>EXPB3</i>	TGCGGGTTCAAGAACAACAACC	GGGTGGTTGACGCATCTTATCTGG
Os10g40700	<i>EXPB6</i>	GCTACCAGATCAGGTGCAACAAG	TGATCACCGTCTCGATGTTGCC
Os05g39990	<i>EXPA4</i>	TTGTACCGGAGTGATGGCCTTG	ACAGCCGCTAGCTACGACAAAG
Os01g14650	<i>EXPA8</i>	TACACCTCCTCGGCTCAGTTCTAC	TGCCACGTCGATCAAAGCATAAC
Os02g16780	<i>EXPA14</i>	CCCGGTTATCTACCAAAGGGTTCC	AGTCGTGCCCGTTAATGGTAAAC
Os02g02686	<i>EXPA22</i>	CCCGTCATCTACCAAAGGGTTCC	TGAGTTGGAGCCCATCACATCC
Os06g10950	<i>XyG-FUT1</i>	ATGTGGTGTCAACGTCGTGCTC	AAGGCGTTGACGGAGCTAATCC
Os06g10960	<i>XyG-FUT2</i>	TGCTTCTCCTTACGGATGTTACCG	CGCATGGTTACCACGGTTATCG
Os02g52630	<i>XyG-FUT3</i>	CTTTGTCATGGCGACGGTCTTC	TCGATTTATCGTCGGAACCTCGAC
Os09g27820	<i>ACO1</i>	TGGAGCAGCTGGATGATGCTTG	AGATGCCGTGGTTCAGGATCTC
Os01g39860	<i>ACO7</i>	ATCGTCGTGTAGTACGCAGGGTTC	AGTTACCGTGATAACCACCCAACC
Os04g48850	<i>ACS2</i>	TTTGGCGCCTTGACGGCCTC	AAAGGGAGCGCACCATGGCC
Os06g03990	<i>ACS6</i>	CCGGGCGACACGTTTCAGCTT	ACAGCGCGAACGGGTTCCAG
Os01g22920	<i>GA2ox2</i>	ATGCCACCATCTGCACAACAGC	ACCACCATGGCGTTAATGTTGC
Os04g44150	<i>GA2ox6</i>	CGTCAACATCGGCGATCTGTTTC	TGGCGTTGGCCACCACTTTATG
Os03g42130	<i>GA20ox5</i>	AAGAACGTCAGGGACTGGAAGG	TCCTCCATTGCCTCCCTGAATC
Os03g50885	<i>ACTIN</i>	TGGATTGGAGGATCCATCTTGCC	CCTTGGCAATCCACATCTGCTG
Os01g03410	<i>UBIQUITIN</i>	CTCCTACGAGCCGTGCTTCT	CCACCGACACCATGTTTCATC

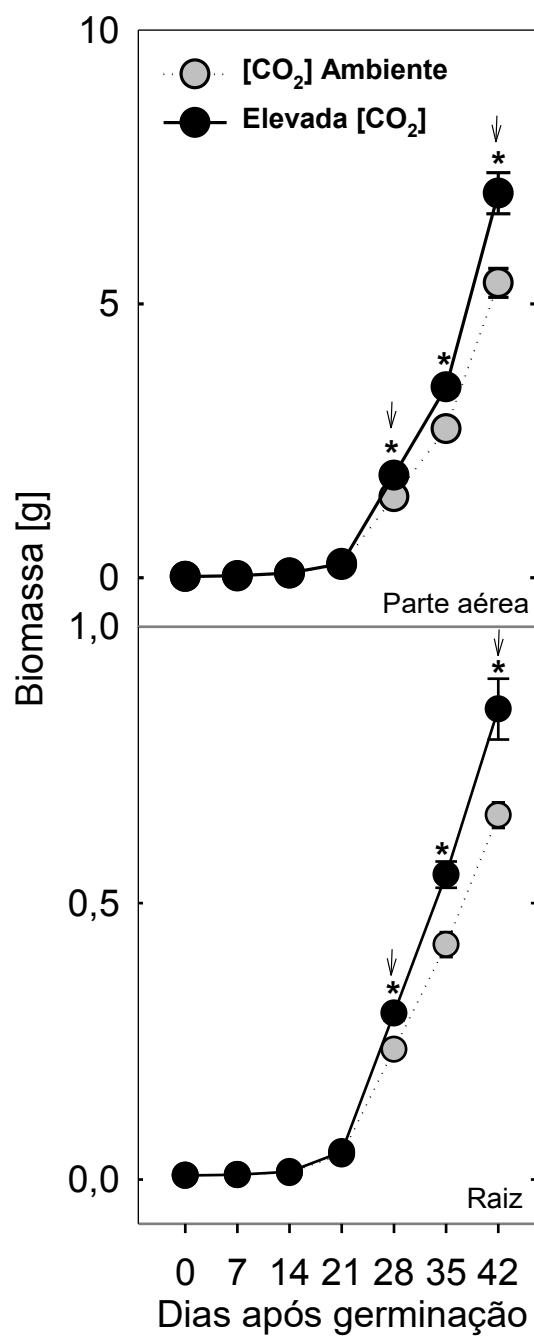


Figura S1. Efeito da elevada [CO₂] na biomassa de plantas de arroz ao longo de 42 dias de cultivo. Médias indicadas por asterisco diferem estatisticamente do controle (plantas sob [CO₂] ambiente), em nível de 5% pelo teste *t*. Os valores representam as médias ± erro padrão de 5 repetições.

CAPÍTULO II

ALTERAÇÕES NO CRESCIMENTO E NO METABOLISMO PRIMÁRIO DE PLANTAS DE ARROZ EM RESPOSTA À AÇÃO DO ETILENO E À ELEVADA CONCENTRAÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO

RESUMO

Incrementos na taxa de crescimento relativo, biomassa e produtividade têm sido frequentemente atribuídos aos efeitos da elevada concentração de CO₂ ([CO₂]) atmosférico. Entretanto, a exata natureza da alteração do crescimento vegetal em resposta à elevada [CO₂] é ainda desconhecida. Assim, o presente estudo investigou o papel do etileno em coordenar as alterações no crescimento e no metabolismo de plantas de arroz sob elevada [CO₂]. Evidenciou-se que a elevada [CO₂] e o etileno, isoladamente, induzem o alongamento da parte aérea e inibem o alongamento da raiz primária, estimulando, assim, o surgimento de raízes adventícias. Em adição, observou-se que a elevada [CO₂] estimula a biossíntese de etileno de maneira dependente da idade da planta, o que parece refletir no maior ganho de biomassa durante o crescimento vegetativo. Assim, com base em tais resultados, sugere-se que não somente os maiores níveis, mas também a regulação temporal da biossíntese de etileno contribui para o desenvolvimento de plantas de arroz sob elevada [CO₂].

INTRODUÇÃO

O aumento da concentração de dióxido de carbono ($[CO_2]$) na atmosfera previsto para as próximas décadas poderá afetar economicamente setores que dependem diretamente de recursos naturais, como a agricultura, pesca e energia (IPCC, 2013). A este respeito, faz-se necessário entender, portanto, como a elevada $[CO_2]$ poderá impactar o crescimento e desenvolvimento de plantas, uma vez que esses organismos constituem o principal meio para o fornecimento de alimentos, matéria-prima, fibra e combustível à população em nível global (IPCC, 2013). Nesse contexto, o arroz, que alimenta mais de 3 bilhões de pessoas ao redor do mundo, poderá ter o seu rendimento afetado diante de um cenário de mudanças climáticas globais (Zhu et al., 2014; Zhu et al., 2015; Wang et al., 2016). No entanto, apesar de diversos estudos explorarem os efeitos gerais promovidos pela elevada $[CO_2]$ (Long et al., 2004; Ainsworth e Long, 2005; Leakey et al., 2009), o entendimento a respeito das vias que conectam a maior assimilação de carbono ao controle do crescimento das plantas sob elevada $[CO_2]$ é, ainda, bastante fragmentado.

O etileno participa de processos importantes do ciclo de vida da planta, incluindo a regulação do desenvolvimento foliar e radicular, a senescência, o amadurecimento e a germinação (Dubois et al., 2018). Além disso, sabe-se que as respostas geradas pelo etileno no crescimento e desenvolvimento de plantas dependem do órgão, do estágio de desenvolvimento, do tecido e da espécie (Khanna et al., 2007; Vandenbussche et al., 2007). Nesse contexto, foi relatado que o etileno estimula a expansão foliar em *Poa alpine* e *Poa compressa* (Fiorani et al., 2002), bem como favorece o surgimento de folhas primárias em girassol (Lee e Reid, 1997). Por outro lado, plantas de *Arabidopsis thaliana* com maior sensibilidade ao etileno apresentaram menor área foliar (Feng et al., 2015). Em arroz, plântulas exibiram maior alongamento do coleótilo, maior crescimento de mesocótilo e inibição do crescimento da raiz primária em resposta a superexpressão da via de sinalização do etileno (Ma et al., 2013). Em contraste, plantas de arroz com 28 dias de idade apresentaram menor crescimento e alongamento das folhas, sugerindo, assim, que a sensibilidade ao etileno pode ser regulada de maneira dependente da idade da planta (Ma et al., 2013).

Sabe-se também que o etileno atua em resposta a vários sinais do ambiente, como alta temperatura (Savada et al., 2017), danos por metais pesados (Thao et al.,

2015), salinidade do solo (Zhang et al., 2016; Silva et al., 2018), baixo pH do solo (Brito et al., 2018; Ribeiro et al., 2018) e deficiência hídrica (Dubois et al., 2017), permitindo desenvolver respostas aclimatativas a tais condições. Embora alguns estudos demonstrem que a elevada [CO₂] aumenta os níveis de etileno em várias espécies de plantas, tais como girassol (Dhawan et al., 1981; Finlayson e Reid, 1994; Finlayson e Reid, 1996), tabaco (Meir et al., 1989), tomate (Woodrow e Grodzinski, 1993) e arroz (Seneweera et al., 2003), o entendimento da interação entre o etileno e a elevada [CO₂] é, ainda, incipiente. Assim, considerando a participação do etileno nas respostas aclimatativas de plantas às diferentes condições do ambiente, o presente estudo testou a hipótese de que esse hormônio modula o crescimento de plantas de arroz sob elevada [CO₂]. Além disso, os impactos da alteração nos níveis de etileno sobre o metabolismo primário foram também investigados.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições gerais

Sementes de arroz *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. 'Oochikara' foram esterilizadas em NaOCl 10% (v/v) por 2 min, enxaguadas em água desionizada por 3 min e, posteriormente, transferidas para papel *germitest* (Fisher Scientific, Co Pittsburgh). A germinação ocorreu em câmara de crescimento (Forma Scientific, Inc., EUA) sob fotoperíodo de 12/12 h (dia/noite), temperatura 28/22 °C (dia/noite), umidade relativa de 65±5% e intensidade luminosa de 150 μmol fótons m⁻² s⁻¹. Sementes com radícula de 2 cm de comprimento foram transplantadas para vasos de isopor (18 plântulas por vaso) contendo 2L de solução de Hoagland ½ força apenas (controle) ou solução de Hoagland ½ força em conjunto com ethephon (Et) 10 μM, CoCl₂ 10 μM (Co²⁺) ou CoCl₂ + ethephon (Co²⁺ + Et), com pH ajustado para 6,5. A solução foi renovada todos diariamente. Após 14 dias, as plantas foram transferidas para vasos de plástico contendo 6 L de solução nutritiva de Hoagland com 100% da força, juntamente com os tratamentos acima descritos. Os vasos foram mantidos em câmaras de topo aberto desde o primeiro dia do transplântio, as quais foram suplementadas com dióxido de carbono às concentrações de 400 μmol⁻¹ CO₂ mol⁻¹ ar (ambiente) e 750 μmol⁻¹ CO₂ mol⁻¹ ar (elevada). As plantas de arroz foram coletadas

após 7 e 21 dias de crescimento nas condições citadas. As médias foram obtidas a partir de dois experimentos independentes.

Quantificação de etileno

Amostras de folhas e raízes de plantas com 7 ou 21 dias de idade foram colocadas em frascos Erlenmeyer de 25 mL contendo 1 mL de água desionizada. Os frascos selados, contendo o material vegetal, foram colocados em câmara de crescimento (Forma Scientific Inc., Ohio, EUA) por 8 h. O etileno acumulado na atmosfera dos frascos Erlenmeyer foi quantificado conforme descrito por Silva et al. (2014). A atmosfera dos frascos foi então homogeneizada, de onde uma amostra de 1,0 mL foi coletada. As amostras foram injetadas em um cromatógrafo a gás Hewlett Packard 5890, série II (EUA), equipado com um detector de ionização de chama e uma coluna de aço inoxidável (1,0 m x 6,0 mm), empacotada com Porapak-N (80-100 mesh). O gás de arraste foi o nitrogênio em fluxo de 30 mL min⁻¹; os fluxos de hidrogênio e ar sintético foram mantidos a 30 e 320 mL min⁻¹, respectivamente. As temperaturas da coluna, do injetor e do detector foram mantidas em 60, 110 e 150 °C, respectivamente. A determinação do etileno foi realizada comparando as áreas de pico das amostras com áreas de pico de uma mistura padrão de etileno de concentração conhecida por meio do uso do *software* PeakSimple (Peak Simple, Versão 3.92).

Análise de crescimento das plântulas

O comprimento e a biomassa da parte aérea e da raiz foram avaliados após 7 dias de incubação nas soluções/tratamento. Para análise do sistema radicular, a raiz foi imediatamente armazenada em etanol 30% (v/v). O sistema radicular foi então digitalizado, utilizando um scanner de mesa, o qual foi analisado utilizando o *software* de processamento de imagens WinRhizo Pro (Regent Instruments Inc; Québec, Canadá), como descrito por Zhu et al. (2005). O sistema radicular foi avaliado quanto ao comprimento, número de raízes laterais e número de raízes adventícias.

Análises de crescimento em plantas com 21 dias de idade

A altura das plantas, o comprimento do colmo e o comprimento da raiz foram determinados a cada dois dias. O número de perfilhos, número de folhas e área foliar total foram determinados ao final do experimento, quando também a massa seca dos

órgãos (raiz, colmo e folha) foi quantificada. A taxa de crescimento relativo (TCR) e a área foliar específica (AFE) foram determinadas conforme descrito por Hunt (1982). Além disso, a razão raiz/parte aérea foi determinada.

Medições de parâmetros fotossintéticos

A taxa de assimilação líquida de carbono (A), a condutância estomática (g_s), a concentração intercelular de dióxido de carbono (C_i) e a transpiração (E) foram determinadas com um analisador de gás a infravermelho (LI-Cor 6400XT, LI-COR, Lincoln, NE, EUA) em folhas bandeira de plantas de arroz após 21 dias crescendo nas soluções tratamentos sob ambiente e elevada $[CO_2]$. As medições foram conduzidas com fornecimento de 400 ou 750 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$ com radiação fotossinteticamente ativa de 1000 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (aproximadamente a intensidade máxima de luz na casa de vegetação) sob 50-60% de umidade relativa e temperatura 26-32 °C. A taxa de respiração mitocondrial no escuro (R_d) foi medida em folhas adaptadas ao escuro por pelo menos 2 horas após o término do período de luz. Em complemento, a respiração mitocondrial em luz (R_L) foi estimada como a metade da R_d (Pinelli e Loreto, 2003; Centritto et al., 2009). A taxa fotorrespiratória da Rubisco (R_p) foi estimada de acordo com Valentini et al. (1995), como $R_p = 1/12 [ETR - 4 (A + R_L)]$. Os valores foram ajustados pela aérea da folha exposta na câmara de análise.

Medições da fluorescência da clorofila foram realizadas com o mesmo analisador de gás anteriormente mencionado, equipado com uma câmara de fluorescência integrada (LI-6400, LI-COR). A fluorescência inicial (F_0) foi medida a partir da iluminação das folhas adaptadas ao escuro com feixes de luz fraca modulada ($0,03 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Posteriormente, pulsos de luz branca saturada ($8000 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) por 0,8 s foram aplicados para a obtenção da fluorescência máxima (F_m), a partir da qual a eficiência fotoquímica máxima do PSII foi calculada: $F_v/F_m = [(F_m - F_0)/F_m]$. Em folhas adaptadas à luz, o rendimento de fluorescência no estado estacionário (F_s) foi medido antes da aplicação de um pulso de luz branca saturada ($8000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 0,8 s) para o acesso da fluorescência máxima adaptada à luz (F_m'). A luz actínica foi então desligada e um pulso de luz no comprimento de onda vermelho distante ($2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) foi aplicado para medir a fluorescência inicial adaptada à luz (F_0'). A eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do fotossistema II (PSII) (F_v'/F_m') foi estimada conforme descrito Logan et al. (2007),

enquanto que o rendimento quântico do transporte de elétrons (ϕ_{PSII}) foi estimado como $\phi_{PSII} = (F_m' - F_s)/F_m'$ (Genty et al., 1989). Os coeficientes de extinção fotoquímico (qP), não-fotoquímico (NPQ) e taxa de transporte de elétrons (ETR) foram determinados como descrito anteriormente por Martins et al. (2013b).

Determinação dos níveis de metabólitos

Amostras de folhas e raízes de plantas com 21 dias crescendo nas soluções-tratamento sob ambiente e elevada $[CO_2]$, foram coletadas ao final do período luminoso e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a $-80^\circ C$ até análise. Uma fração das amostras frescas (40 mg) foi utilizada para extração etanólica, conforme descrito por Geigenberger et al. (1996). Na fração solúvel em etanol determinou-se glicose, frutose e sacarose usando um ensaio enzimático contínuo, como descrito por Cross et al. (2006). Para determinação do amido, o precipitado da extração etanólica foi solubilizado por aquecimento a $95^\circ C$ em NaOH à concentração de 0,1 M. Em seguida, 70 μL de solução de ácido acético (1 M) foram adicionados às amostras, e o teor de amido foi determinado como equivalentes de glicose (Hendriks, 2003).

Os aminoácidos totais foram determinados como descrito por Gibon et al. (2006), enquanto a concentração de proteínas foi quantificada seguindo o protocolo de Bradford (1976), com algumas modificações (Ramaglis e Rodriguez 1985). Uma série de solução de albumina sérica bovina (BSA) diluída com o mesmo tampão de extração foi utilizada como padrão para a quantificação de proteínas. A quantificação de proteínas foi realizada em um leitor de microplacas (Molecular Devices Sunny Valley, EUA) a 595 nm. As concentrações de clorofilas foram determinadas conforme descrito por Arnon (1949), com 3 μL do extrato diluído em 120 μL de etanol a 98%.

Análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. Para análise de parâmetros de crescimento a unidade experimental foi composta 10 plântulas com 5 repetições por tratamento. Para plantas com 21 dias de idade, a unidade experimental foi composta por 4 plantas com 10 repetições por tratamento. Para avaliação dos parâmetros fotossintéticos, dez plantas foram avaliadas. A unidade experimental para análise de metabólitos foi composta por 40 mg de material vegetal, por reação, com

seis repetições por tratamento. A análise de variância ($P < 0,05$) foi feita para determinar o efeito entre os tratamentos. Quando a análise de variância (ANOVA) apresentou efeitos significativos, as diferenças entre as médias foram examinadas pelo teste t ($P < 0,05$). Todas as análises foram realizadas utilizando o programa R versão 3.4.4 (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria).

RESULTADOS

Alterações no crescimento de plântulas de arroz em resposta ao etileno e à elevada [CO₂]

Sob [CO₂] ambiente, Et aumentou em 54% o comprimento da parte aérea e diminuiu em 17% o comprimento da raiz primária de plântulas de arroz em comparação ao controle (Figura 1, Figura 2A). Em contraste com o efeito do Et, o comprimento da parte aérea foi reduzido em 20% em resposta a aplicação de Co²⁺ 10 µM, sendo acompanhado por aumento de 28% no comprimento da raiz primária sob [CO₂] ambiente. Ademais, Co²⁺ + Et promoveu aumento de 20% no comprimento da parte aérea sob [CO₂] ambiente (Figura 1, Figura 2A). Sob [CO₂] ambiente, as plântulas tratadas com Co²⁺ + Et não apresentaram alterações significativas no comprimento da raiz. O Et aumentou significativamente a biomassa da parte aérea e diminuiu significativamente a biomassa da raiz sob [CO₂] ambiente; enquanto Co²⁺ + Et diminuiu significativamente a biomassa da raiz sob a mesma [CO₂] (Figura 2C).

Sob elevada [CO₂], plântulas tratadas com Et não apresentaram diferença significativa no comprimento da parte aérea em comparação às plantas controle sob mesma [CO₂] (Figura 1, Figura 2A). Entretanto, o Et reduziu em 16% o comprimento da raiz sob elevada [CO₂]. Por outro lado, o Co²⁺ reduziu em 28% o comprimento da parte aérea e aumentou em 19% o alongamento da raiz de plantas cultivadas sob elevada [CO₂]. O Co²⁺ + Et promoveu aumento de 18% no comprimento da raiz, mas não afetou o desenvolvimento da parte aérea de plantas mantidas sob elevada [CO₂]. As alterações no crescimento tanto na parte aérea quanto na raiz foram acompanhadas por diferentes concentrações de etileno no tecido (Figura 2B). O Co²⁺ diminuiu significativamente a biomassa da parte aérea e aumentou significativamente a biomassa da raiz em plântulas mantidas sob elevada [CO₂] (Figura 2C).

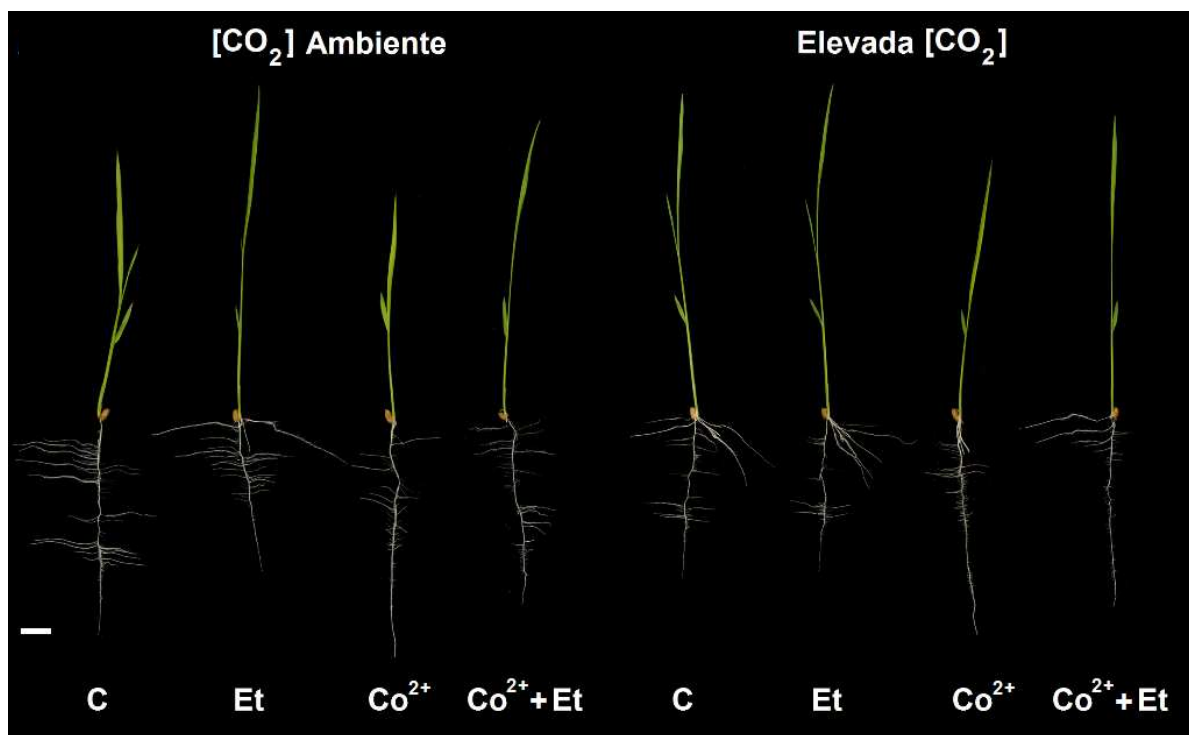


Figura 1. Alterações fenotípicas promovidas pelos tratamentos com Ethephon, CoCl_2 e Ethephon + CoCl_2 em plântulas de arroz crescendo sob ambiente ou elevada $[\text{CO}_2]$ (A). A barra da escala representa 20 mm.

Alterações na arquitetura da raiz de plântulas de arroz em resposta ao etileno e à elevada $[\text{CO}_2]$

A aplicação de Et diminuiu o número (49%) e o comprimento total (12%) de raízes laterais e aumentou (131%) significativamente o número de raízes adventícias das plântulas sob $[\text{CO}_2]$ ambiente (Figura 3, Figura 4A-C). Por outro lado, a aplicação de Co^{2+} sob $[\text{CO}_2]$ ambiente não afetou o número de raízes laterais e de raízes adventícias, mas reduziu (53%) significativamente o comprimento de raízes laterais (Figura 3, Figura 4A-C). Sob $[\text{CO}_2]$ ambiente, $\text{Co}^{2+} + \text{Et}$ reduziu em 35% e 26% o número e o comprimento de raízes laterais, respectivamente, enquanto $\text{Co}^{2+} + \text{Et}$ não afetou o número de raízes adventícias quando comparado ao controle (Figura 3, Figura 4A-C).

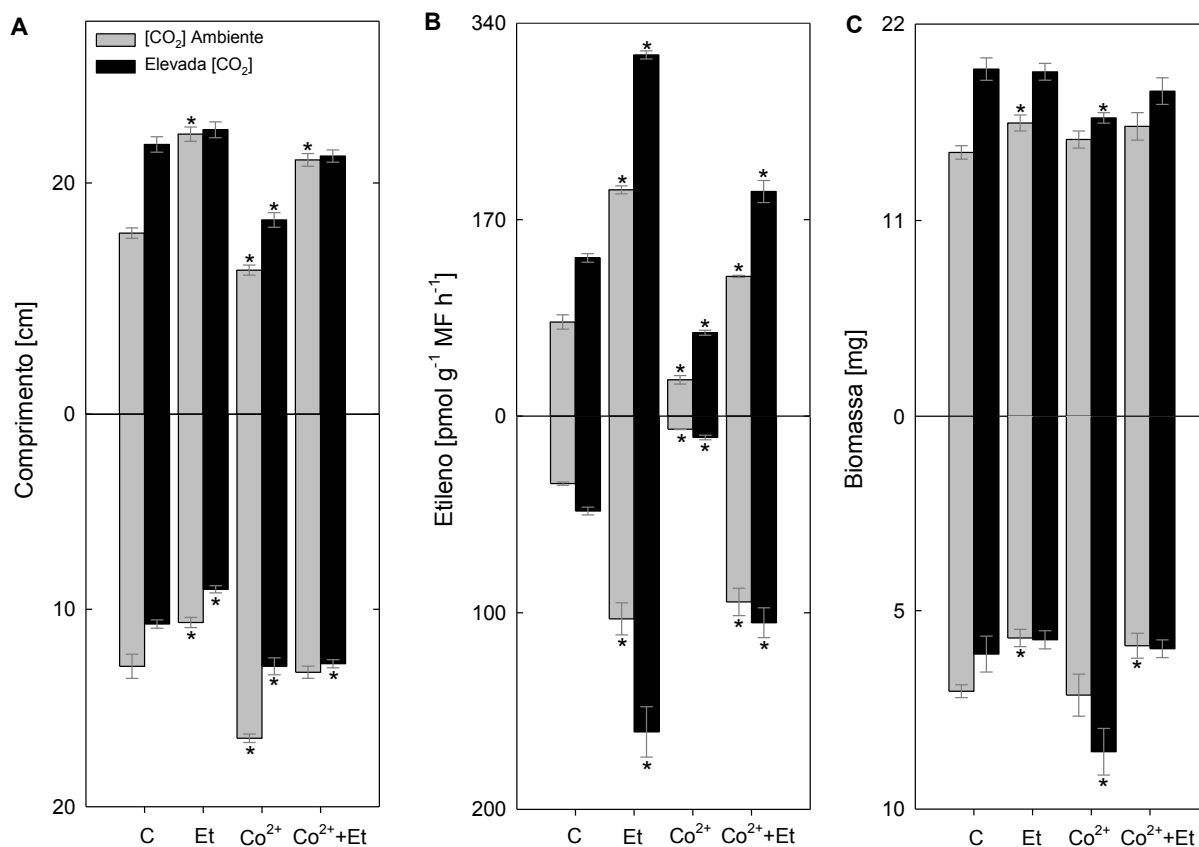


Figura 2. Alterações no crescimento de plântulas de arroz promovidas pelos tratamentos com Ethephon, CoCl_2 e Ethephon + CoCl_2 , crescendo sob ambiente ou elevada $[\text{CO}_2]$. Comprimento da parte aérea e da raiz de plântulas de arroz (A). Taxa de produção de etileno na parte aérea e na raiz (B). Biomassa total da parte aérea e da raiz (C). Médias indicadas por asterisco diferem estatisticamente dos respectivos controles, em nível de 5% pelo teste *t*. Os valores representam as médias \pm erro padrão de quatro experimentos separados, com cinco repetições cada.

Sob elevada $[\text{CO}_2]$, plântulas tratadas com Et apresentaram diminuição no número (35%) e no comprimento total (39%) de raízes laterais, com aumento significativo apenas no número de raízes adventícias (131%) (Figura 3, Figura 4A-C). O número de raízes adventícias e o comprimento de raízes laterais foram diminuídos em 70% e 45%, respectivamente, em resposta ao Co^{2+} sob elevada $[\text{CO}_2]$, sem alteração no número de raízes laterais. As plântulas cultivadas com Co^{2+} + Et não apresentaram alterações significativas no número de raízes laterais sob elevada $[\text{CO}_2]$ (Figura 3, Figura 4A). Além disso, Co^{2+} + Et reduziu em 69% e 36% o número de raízes adventícias e o comprimento de raízes laterais, respectivamente (Figura 3, Figura 4B, C).

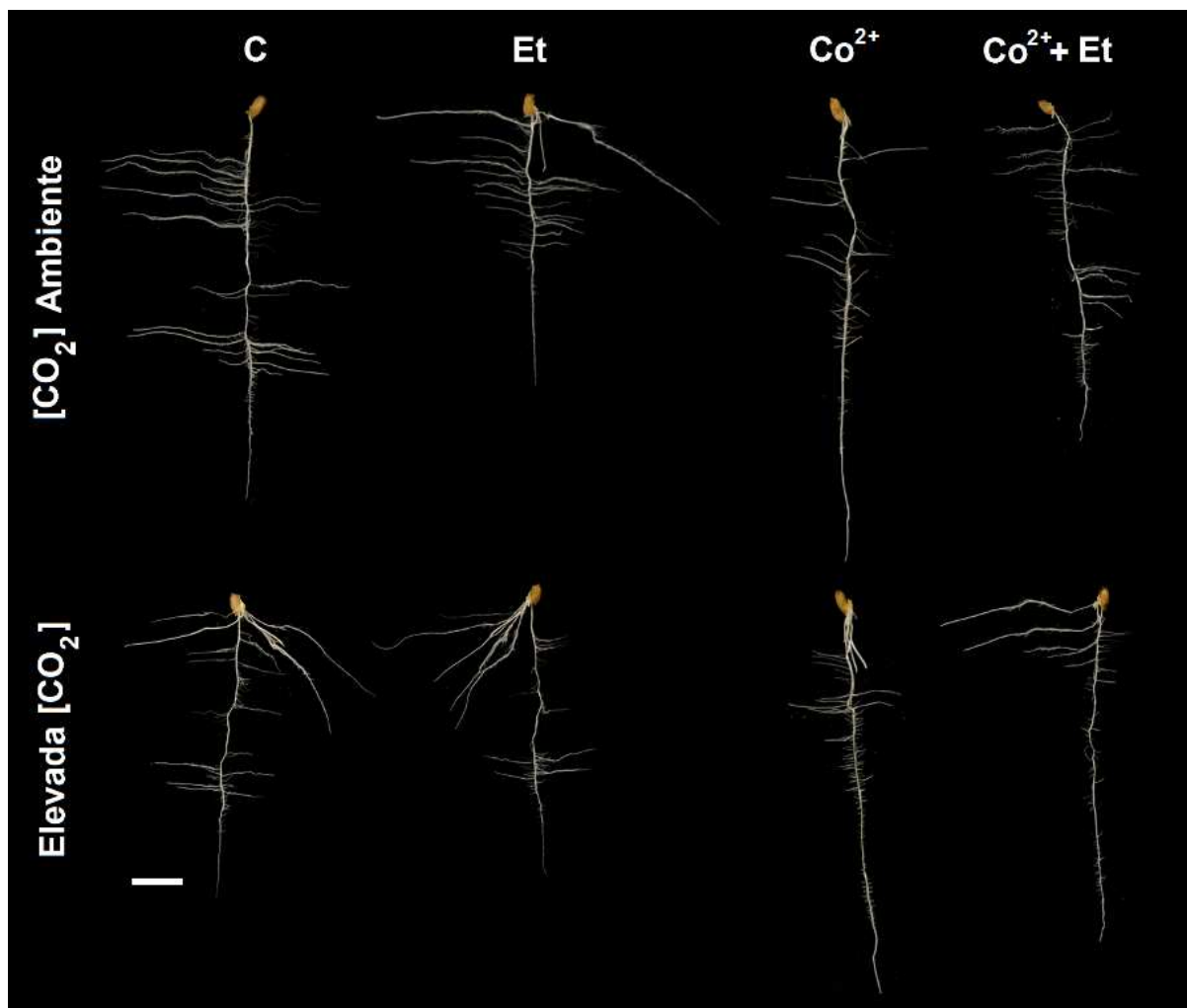


Figura 3. Detalhe das alterações na arquitetura da raiz promovidas pelos tratamentos com Ethephon, CoCl_2 e Ethephon + CoCl_2 em plântulas de arroz crescendo sob ambiente e elevada $[\text{CO}_2]$ (A). A barra da escala representa 20 mm.

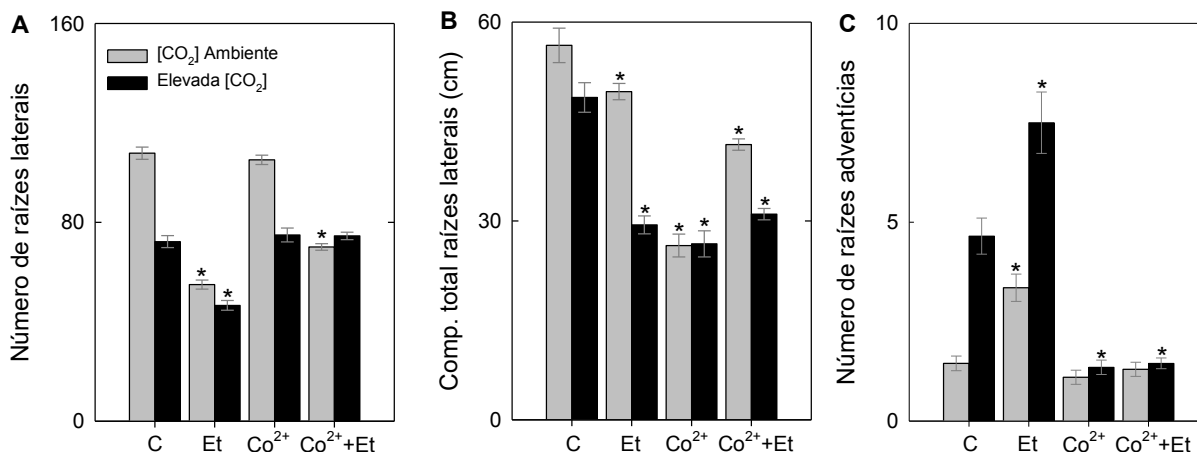


Figura 4. Alterações no crescimento de raiz de plântulas de arroz promovidas pelos tratamentos com Ethephon, CoCl₂ e Ethephon + CoCl₂, crescendo sob ambiente e elevada [CO₂]. Número de raízes laterais (A). Comprimento das raízes laterais (B). Número de raízes adventícias (C). Médias indicadas por asterisco diferem estatisticamente dos respectivos controles, em nível de 5% pelo teste *t*. Os valores representam as médias ± erro padrão de quatro experimentos separados, com cinco repetições cada.

Alterações no crescimento de plantas de arroz em resposta aos níveis de etileno e à elevada [CO₂]

Em plantas com 21 anos de idade sob [CO₂] ambiente, tanto Et quanto Co²⁺ promoveram diminuição marcante na biomassa da parte aérea (63%, 62%, respectivamente), biomassa da raiz, (70%, 66%), biomassa total (64%, 62%), número de folhas (29%, 50%), área foliar total (60%, 65%), número de perfilhos (40% e 62%) e na taxa de crescimento relativo (TCR) (9%, 9%), mas Et e Co²⁺ não alteraram a área foliar específica (AFE) e a razão raiz/parte aérea (Figura 5, Figura 6A-I). Sob elevada [CO₂], o Et e o Co²⁺ reduziram significativa a biomassa da parte aérea (33%, 50%, respectivamente), biomassa da raiz, (45%, 57%), biomassa total (28%, 51%), número de folhas (30%, 49%), área foliar total (60%, 65%), número de perfilhos (42%, 57%) e a TCR (9%, 9%), sem alteração na AFE e na razão raiz/parte aérea. Adicionalmente, plantas cultivadas com Co²⁺ + Et apresentaram o mesmo comportamento em relação ao controle em ambas as [CO₂]; menos na área foliar total, a qual foi diminuída tanto sob [CO₂] ambiente (32%) quanto sob elevada [CO₂] (23%) (Figura 5, Figura 6A-I).

Com o objetivo de entender a relação entre o crescimento de plantas de arroz sob elevada [CO₂] e a biossíntese de etileno, quantificou-se os níveis de etileno em plantas com 21 dias de idade, cultivadas sob ambas as [CO₂]. Observou-se, com

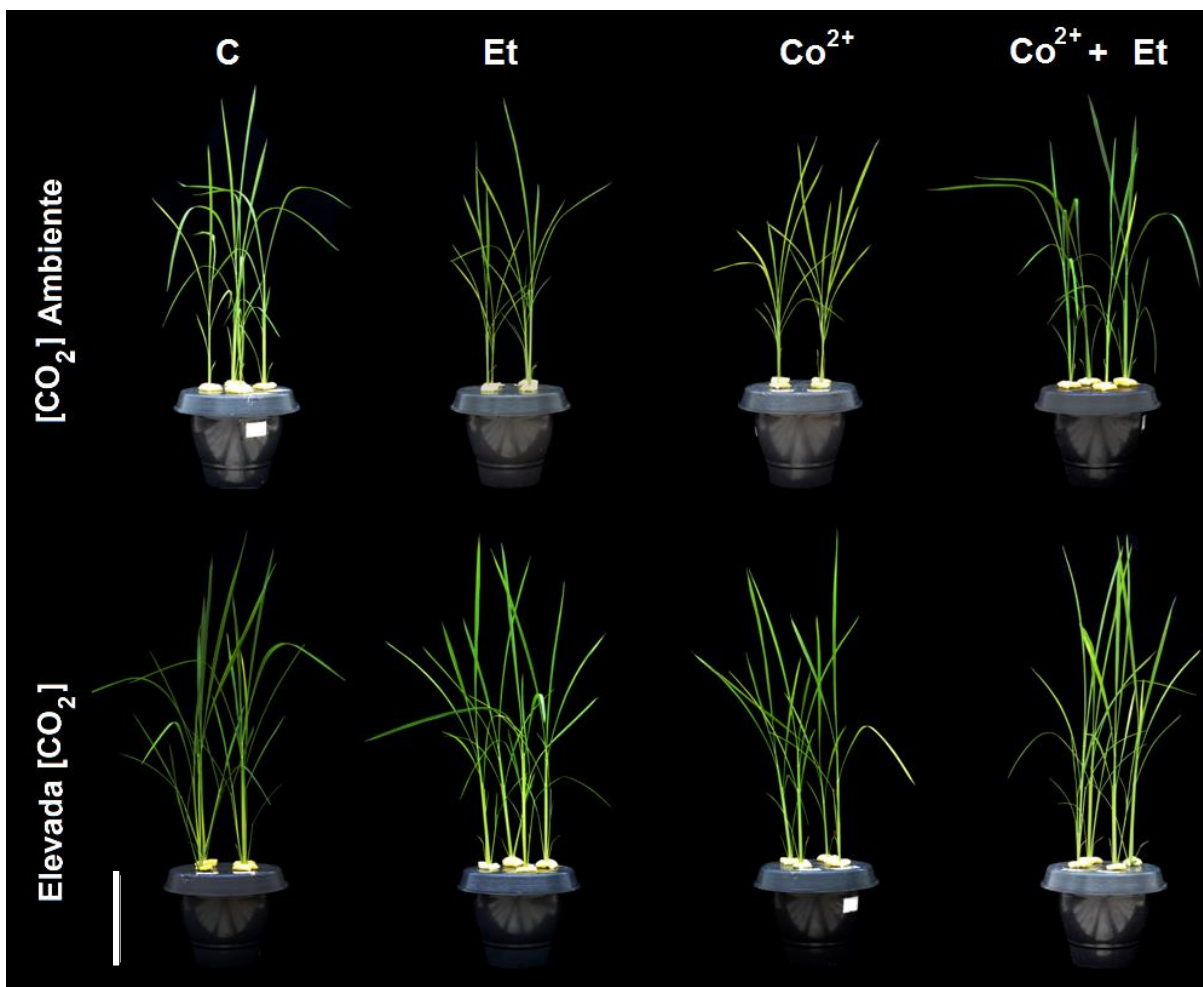


Figura 5. Fenótipo de plantas de arroz com 21 dias de idade crescendo em solução de Hoagland meia força (controle) ou contendo Ethephon (Et) 10 μM , CoCl_2 (Co^{2+}) 10 μM e Et + Co^{2+} , sob ambiente ou elevada $[\text{CO}_2]$ (A). A barra da escala representa 20 cm.

essa análise, que a concentração de etileno foliar em plantas com 21 dias de idade tratadas com Et foi significativamente maior em relação a produção de etileno foliar observados em plantas controle, tanto sob elevada $[\text{CO}_2]$ quanto sob $[\text{CO}_2]$ ambiente (Figura 7A). Na raiz, os maiores níveis de etileno foram observados em plantas com 21 dias de idade tratadas com Et ou Co^{2+} + Et, em ambas as $[\text{CO}_2]$ (Figura 4A). Por outro lado, quando os níveis de etileno em plantas com 21 dias de idade foram comparados aos níveis de etileno em plantas com 7 dias de idade, observou-se que plantas tanto controle como tratadas com Co^{2+} + Et apresentaram diminuição substancial (80 e 85%, respectivamente) nos níveis de etileno foliar, tanto sob elevada $[\text{CO}_2]$ quanto sob $[\text{CO}_2]$ ambiente (Figura 7B). Em contrapartida, não houve alteração significativa na concentração de etileno relativa nas folhas de plantas tratadas tanto com Et quanto com Co^{2+} , sob ambas as $[\text{CO}_2]$. Na raiz, apenas plantas controle

apresentaram diminuição significativa nos níveis de etileno relativo tanto sob ambiente quanto sob elevada $[\text{CO}_2]$ (Figura 7B).

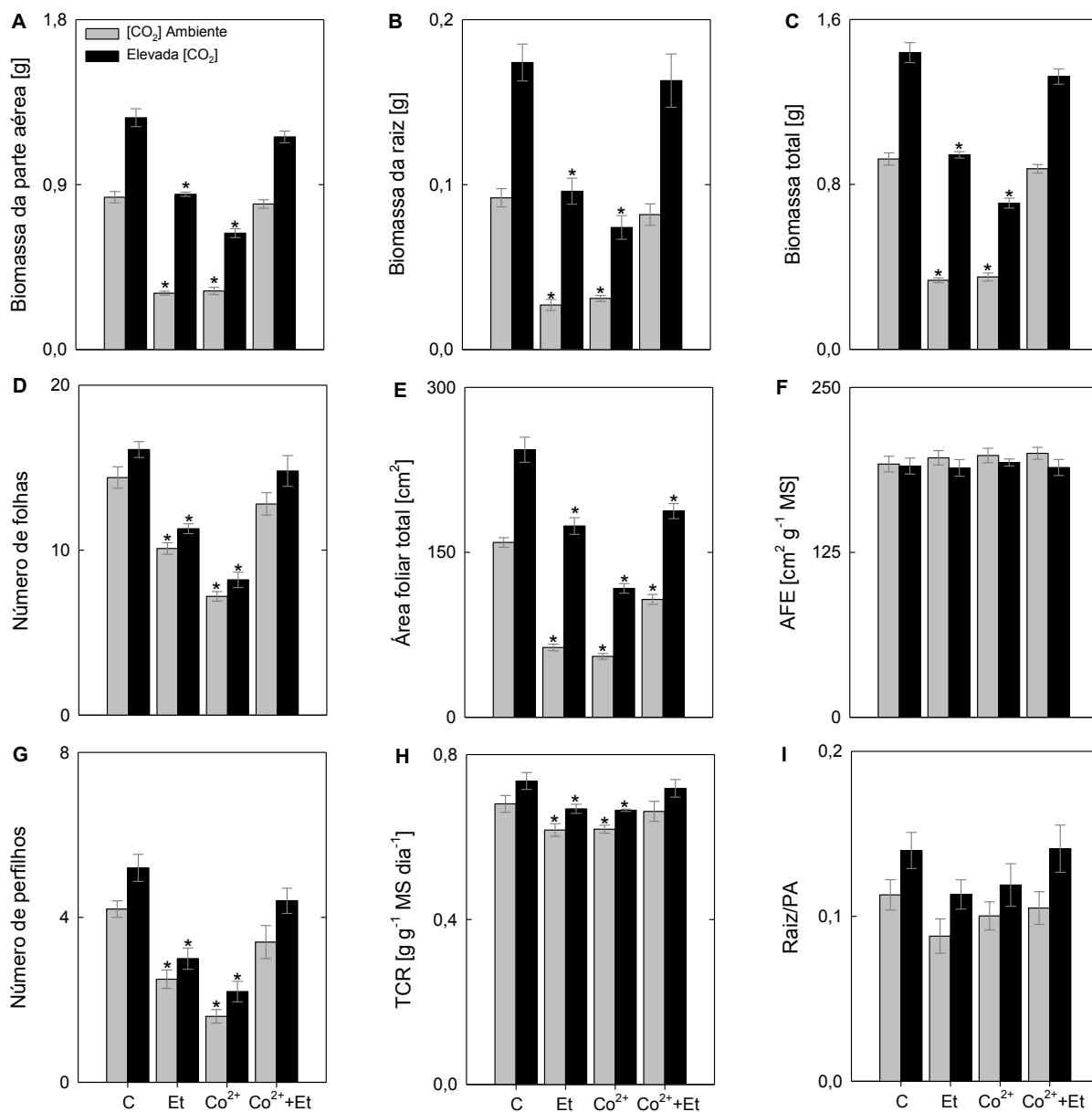


Figura 6. Alterações no crescimento de plantas de arroz com 21 dias de idade promovidas pelos tratamentos com Ethephon, CoCl_2 e Ethephon + CoCl_2 , crescendo sob ambiente e elevada $[\text{CO}_2]$ por 21 dias. Biomassa da parte aérea (A). Biomassa de raiz (B). Biomassa total (B). Número de folhas (D). Área foliar total (E). Área foliar específica (F). Número de perfilhos (G). Taxa de crescimento relativo (TCR) (H). Razão raiz/parte aérea (J). Médias indicadas por asterisco diferem estatisticamente dos respectivos controles, em nível de 5% pelo teste t . Os valores representam as médias \pm erro padrão de 10 repetições.

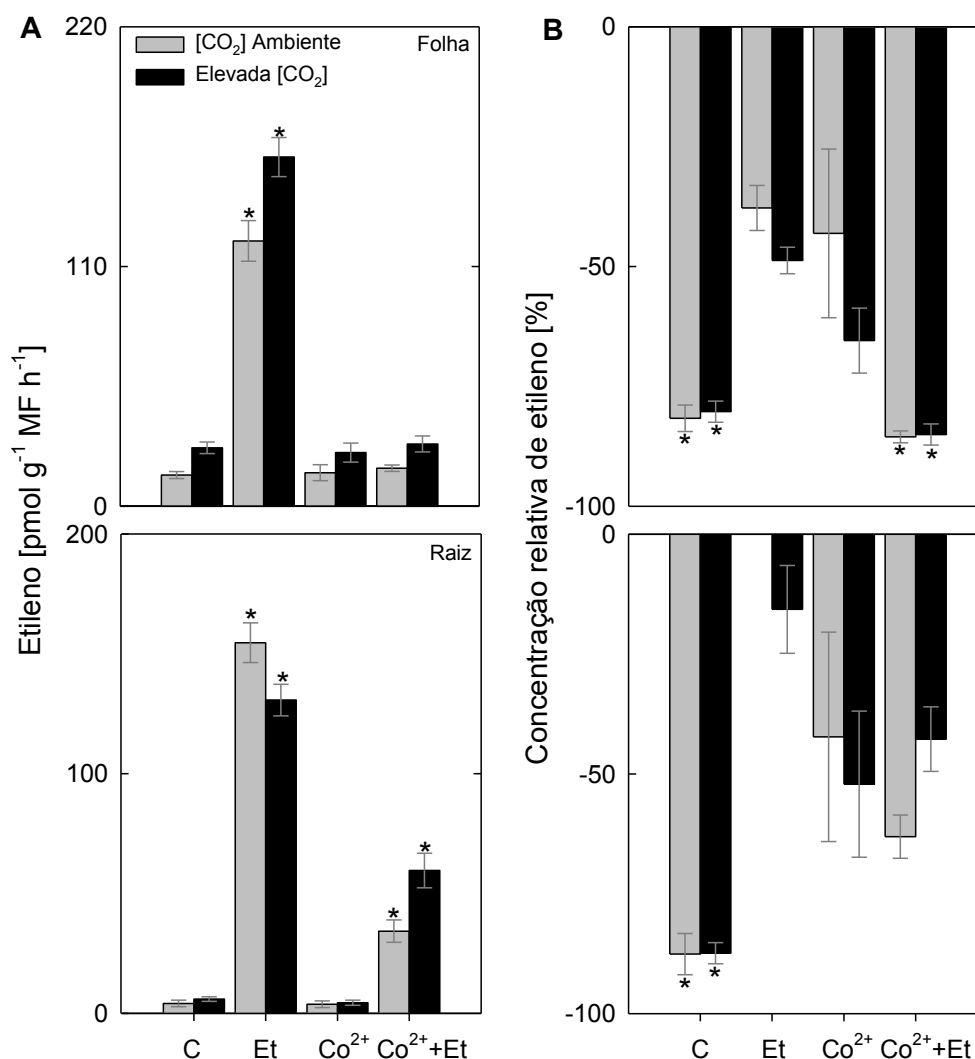


Figura 7. Taxa de produção de etileno influenciada pelos tratamentos com Ethepon, CoCl_2 e Ethepon + CoCl_2 em plantas de arroz crescendo sob elevada concentração de CO_2 . Concentração de etileno em folha ou raiz de plantas com 21 dias de idade (A). Inibição relativa na produção de etileno (produção de etileno de plantas com 21 dias/ produção de etileno de plantas com 7 dias de idade cultivadas sob ambiente e elevada $[\text{CO}_2]$) (B). As medições foram feitas em plantas de arroz após 21 dias de crescimento sob ambiente ou elevada $[\text{CO}_2]$. Os asteriscos indicam que as médias diferem significativamente pelo teste *t* a 5% de probabilidade em relação ao controle (A) ou em relação às plantas com 7 dias de idade (B). Os valores representam as médias \pm erro padrão de 6 repetições.

Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em plantas de arroz em resposta ao etileno e à elevada $[\text{CO}_2]$

O tratamento de plantas com Co^{2+} sob $[\text{CO}_2]$ ambiente diminuiu *A* (18%) e *ETR* (8%), acompanhados por aumento significativo de 46 % em *NPQ* (Figura 8A, B, L). Quando as plantas foram tratadas com $\text{Co}^{2+} + \text{Et}$, houve diminuição (7%) em *Fv'/Fm'* e aumento significativo (81%) em *NPQ* sob $[\text{CO}_2]$ ambiente (Figura 8J, L). Ademais,

P_R diminuiu (35%) significativamente em resposta ao Et sob $[CO_2]$ ambiente (Figura 8D). Et, Co^{2+} e $Co^{2+} + Et$ não afetaram C_i , R_d , g_s , E , F_v/F_m de plantas crescidas sob $[CO_2]$ ambiente em comparação com as plantas do controle (Figura 8C, E, G, H, J).

Sob elevada $[CO_2]$, por sua vez, Et diminuiu A em 18 % e ETR em 11 %, os quais foram acompanhados por aumento significativo de 76% em NPQ em comparação com as plantas do controle, respectivamente (Figura 8A, B, L). Ademais, o tratamento com Co^{2+} reduziu A (16%), C_i (24%), R_d (17%) e F_v'/F_m' reduziram (9%) de plantas de arroz cultivadas sob elevada $[CO_2]$ em comparação com as plantas do controle (Figura 8A, C, E, K). Entretanto, o Co^{2+} aumentou P_R (28%) de plantas de arroz mantidas sob elevada $[CO_2]$ (Figura 5D). Não houveram alterações nos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila em plantas tratadas com $Co^{2+} + Et$ sob elevada $[CO_2]$, em comparação com as plantas do controle (Figura 8A-L).

Alterações no metabolismo primário de plantas de arroz em resposta aos níveis de etileno e à elevada $[CO_2]$

Sob $[CO_2]$ ambiente, Et aumentou as concentrações de glicose (39%), frutose (25%) e amido (78%) nas folhas quando comparado ao controle (Figura 9A, B, D). Por outro lado, Co^{2+} e $Co^{2+} + Et$ não afetaram as concentrações de glicose, frutose, sacarose, amido, aminoácidos e proteínas nas folhas de plantas cultivadas sob $[CO_2]$ ambiente. Sob $[CO_2]$ ambiente, Et, Co^{2+} e Et + Co^{2+} diminuiram significativamente a concentração de proteína na raiz em 15%, 21% e 17%, respectivamente (Figura 9F). O tratamento com Et + Co^{2+} aumentou a concentração de sacarose (50%) na raiz de plantas mantidas sob $[CO_2]$ ambiente, em comparação ao controle (Figura 9C). Ademais, glicose, frutose, amido e aminoácidos não apresentaram alteração na raiz em nenhum dos tratamentos sob $[CO_2]$ ambiente (Figura 9A, B, D, E).

Sob elevada $[CO_2]$, as concentrações de amido e aminoácidos aumentaram em 103% e 49% em folhas de plantas de arroz tratadas com Et e Co^{2+} , em comparação com as plantas do controle, respectivamente (Figura 9D, E). Por outro lado, as concentrações de glicose e proteína diminuiram em 28% e 39% em folhas de plantas

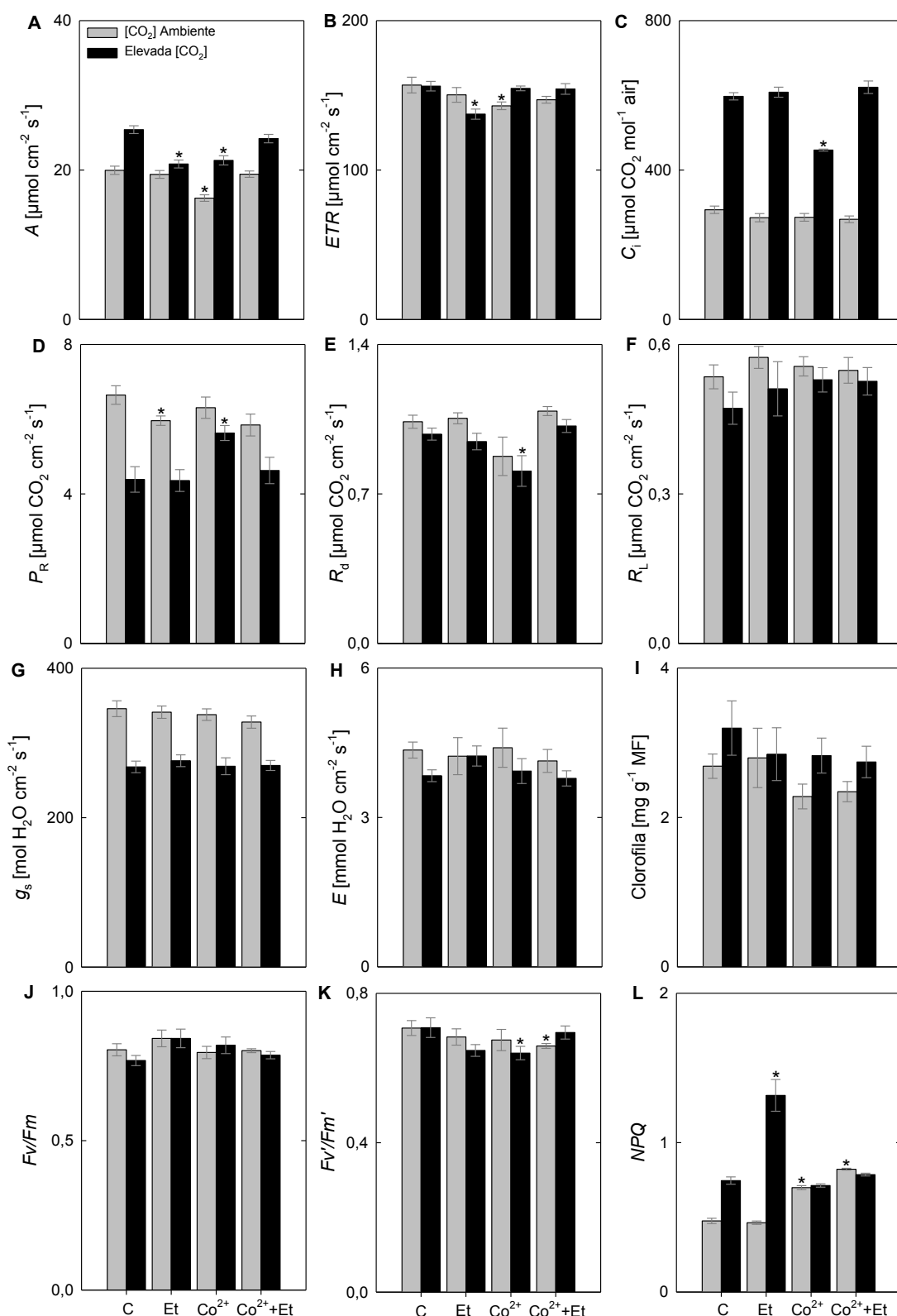


Figura 8. Alterações nas trocas gasosas, parâmetros de fluorescência e níveis de clorofila em plantas de arroz cultivadas sob ambiente e elevada [CO₂]. Os parâmetros fotossintéticos e de fluorescência foram quantificados em plantas de arroz após 21 dias crescendo sob ambiente e elevada [CO₂]. Médias indicadas por asterisco diferem estatisticamente dos respectivos controles, em nível de 5% pelo teste *t*. Os valores representam as médias \pm erro padrão de 10 repetições.

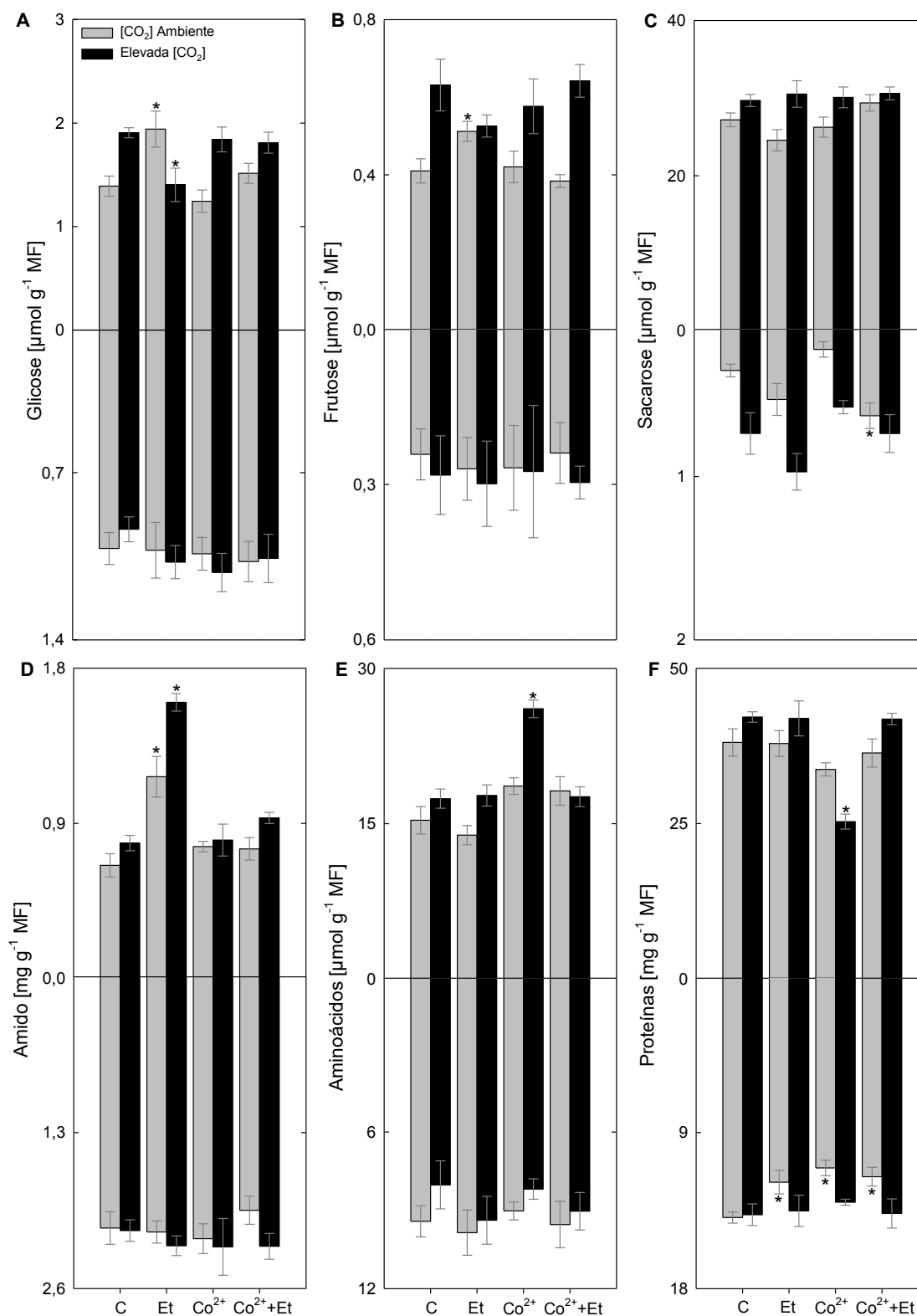


Figura 9. Alterações nos níveis de metabólitos em plantas de arroz crescendo sob ambiente e elevada [CO₂] por 21 dias. Glicose (A). Frutose (B). Sacarose (C). Amido (D). Aminoácidos (E). Proteínas (F). Médias indicadas por asterisco diferem estatisticamente dos respectivos controles, em nível de 5% pelo teste *t*. Os valores representam as médias ± erro padrão de 6 repetições.

tratadas com Et e Co^{2+} mantidas sob elevada $[\text{CO}_2]$, respectivamente (Figura 9A e F). Ademais, o tratamento com Co^{2+} + Et não afetou as concentrações de glicose, frutose, sacarose, amido, aminoácidos e proteínas nas folhas de plantas cultivadas sob elevada $[\text{CO}_2]$. Nenhuma mudança nas concentrações de glicose, frutose, sacarose, amido, aminoácidos e proteínas foi observada na raiz de plantas tratadas com Et, Co^{2+} , Et + Co^{2+} sob elevada $[\text{CO}_2]$, em comparação com as plantas do controle (Figura 9A-F).

DISCUSSÃO

Isoladamente, a elevada $[\text{CO}_2]$ e o etileno induzem a ‘dupla resposta’ e o desenvolvimento de raízes adventícias em plântulas de arroz

Tem sido demonstrado que o etileno estimula o crescimento do coleótilo e inibe o crescimento da raiz primária (‘dupla resposta’) em diferentes espécies de monocotiledôneas (Ku et al., 1970; Kim et al., 2012; Ma et al., 2010; Ma et al., 2013; Ma et al., 2014). Os resultados aqui descritos indicam que a elevada $[\text{CO}_2]$ promoveu a ‘dupla resposta’ em plântulas de arroz independentemente da aplicação de etileno exógeno (Figura 2A). Em associação, a elevada $[\text{CO}_2]$ promoveu aumento expressivo nos níveis de etileno em plântulas do controle em relação as plantas sob $[\text{CO}_2]$ ambiente (Figura 2B). Sabe-se também que o etileno controla as alterações na arquitetura da raiz em interação com auxina (Malheiros et al., 2019), induzindo, entre outras modificações, o desenvolvimento de raízes adventícias (Aloni et al., 2006; Muday et al., 2012). No presente estudo, aumento expressivo no número de raízes adventícias foi observado em plântulas controle sob elevada $[\text{CO}_2]$ (Figura 4C). Coletivamente, esses resultados obtidos evidenciam que a elevada $[\text{CO}_2]$ estimula a biossíntese de etileno e que tal hormônio coordena as alterações tanto no crescimento da parte aérea quanto no desenvolvimento da raiz de plântulas de arroz. Consistente com essa hipótese, plântulas tratadas com Et sob $[\text{CO}_2]$ ambiente apresentaram aumento no alongamento da parte aérea e diminuição do comprimento da raiz primária, o que foi acompanhado pelo aumento significativo no número de raízes adventícias (Figuras 2A, Figura 4C).

A interação entre a elevada [CO₂] e o etileno no crescimento de plantas de arroz é regulada por uma janela de sensibilidade do tecido

A biossíntese de etileno é regulada diferencialmente em nível de transcrição da sintase do ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACS) por meio de vias que respondem a estímulos endógenos e/ou exógenos (Tsuchisaka et al. 2009). Nesse contexto, estudos mostram que os genes que codificam a ACS exibem padrões de expressão específicos nas células dos tecidos e são regulados diferencialmente de acordo com estágio de desenvolvimento da planta (Tsuchisaka e Theologis 2004; Tsuchisaka et al. 2009). No presente estudo, plantas do controle com 21 dias de idade apresentaram redução de 80 a 85% na biossíntese de etileno na folha e na raiz tanto sob ambiente e elevada [CO₂], respectivamente, quando comparado com a produção de etileno em plantas com 7 dias de idade sob a mesma [CO₂] (Figura 7B). O mesmo comportamento foi verificado nas folhas de plantas tratadas com Co²⁺ + Et (Figura 7B). Interessantemente, plantas com 21 dias de idade tanto do controle quanto tratadas com Co²⁺ + Et apresentaram maior biomassa total sob elevada [CO₂] em comparação às plantas tratadas com Et ou Co²⁺ sob [CO₂] ambiente (Figura 6C). Coletivamente, esses dados sugerem que o efeito da elevada [CO₂] no crescimento em interação com etileno ocorrem em plantas de arroz com 7 dias de idade e não em plantas com 21 dias de idade. Por efeito, os resultados demonstram a existência de uma janela de sensibilidade do tecido em responder à elevada [CO₂] no que diz respeito a produção e a ação do etileno no crescimento da planta. Por outro lado, as respostas observadas em plantas tratadas com Et evidenciam que os maiores níveis de etileno em plantas com 21 dias de idade poderiam afetar negativamente o ganho de biomassa total nessas plantas sob elevada [CO₂].

A resposta temporal do etileno à elevada [CO₂] evita efeitos negativos do hormônio sobre a fotossíntese e o metabolismo primário em plantas de arroz com 21 dias de idade

As causas pelas quais as plantas de arroz tratadas com Et ou Co²⁺ não apresentaram maior crescimento sob elevada [CO₂] podem estar relacionadas às alterações nas trocas gasosas e metabolismo primário. Nesse contexto, foi demonstrado que o Et diminuiu indiretamente a taxa fotossintética de tomateiro via modificação no particionamento de carbono como consequência da alteração da

relação fonte/dreno e modificação na morfologia da planta (Woodrow et al., 1988). No presente trabalho, o aumento da concentração de amido (Figura 9D) e a diminuição nos níveis de glicose (Figura 9A) em folhas de plantas tratadas com Et sob elevada $[CO_2]$ sugere uma possível limitação no dreno e retro-inibição da fotossíntese (Stitt and Krapp 1999; Ainsworth and Bush 2011; Sugiura et al. 2017). Por outro lado, plantas de tabaco insensíveis ao etileno apresentaram regulação negativa da expressão da Rubisco e da taxa fotossintética (Tholen et al., 2007). No presente estudo, a inibição da via de biossíntese de etileno pelo Co^{2+} também afetou negativamente a taxa fotossintética em plantas de arroz em ambas as $[CO_2]$ (Figura 8A). Tal efeito negativo refletiu no acúmulo de aminoácidos e diminuição de síntese de proteína apenas em plantas crescendo sob elevada $[CO_2]$ (Figura 9E, F). Coletivamente, esses dados sugerem que a diminuição da biossíntese de etileno em plantas com 21 dias evita os possíveis efeitos negativos desse hormônio sobre a fotossíntese e sobre o metabolismo primário sob elevada $[CO_2]$, contribuindo para o incremento da biomassa total da planta. Consistente com essa hipótese, nenhuma alteração foi verificada em A , ETR , C_i , P_R , R_d , R_L , g_s , E , clorofila, F_v/F_m , F_v'/F_m' e NPQ em resposta a Co^{2+} + Et em folhas de plantas crescendo sob elevada $[CO_2]$, as quais, curiosamente, apresentaram diminuição drástica nos níveis de etileno (85%) em plantas com 21 dias de idade em relação às plantas com 7 dias idade (Figura 7B). Tal resposta evidencia, também, que o efeito negativo do Co^{2+} sobre a fotossíntese não está relacionado a um efeito tóxico do elemento, mas sim por uma atuação indireta (inibição da biossíntese do hormônio) tendo em vista a baixa concentração aplicada (10 μM).

CONCLUSÕES

O etileno modula as alterações no crescimento de plantas de arroz sob elevada $[CO_2]$ e a produção do hormônio gasoso é regulada de maneira dependente da idade da planta. Em plantas com 7 dias de idade, o etileno modula as alterações tanto na parte aérea quanto na raiz. Com 21 dias de idade, por outro lado, o etileno promove efeitos negativos sobre a fotossíntese e metabolismo primário, que são a causa da diminuição no ganho de biomassa sob elevada $[CO_2]$. Isso evidencia, portanto, que alteração na produção de etileno de modo temporal observada em plantas controle é

um importante evento para o incremento da biomassa total durante o crescimento vegetativo em plantas de arroz sob elevada [CO₂].

REFERÊNCIAS

Ainsworth EA, Bush DR (2011) Carbohydrate export from the leaf: A highly regulated process and target to enhance photosynthesis and productivity. *Plant Physiology* **155**: 64-69.

Ainsworth EA, Long SP (2005) What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. *New Phytologist* **165**: 351-372

Aloni R, Aloni E, Langhans M, Ullrich CI (2006) Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: Regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Annals of Botany* **97**: 883-893

Arnon DJ (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* **24**: 1-15

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254

Brito FAL, Costa LC, Gasparini K, Pimenta TM, Araujo WL, Zsogon A, Ribeiro DM (2018) Low soil pH modulates ethylene biosynthesis and germination response of *Stylosanthes humilis* seeds. *Plant Signalling and Behaviour* **13**:5- e1460186

Centritto M, Lauteri M, Monteverdi MC, Serraj R (2009) Leaf gas exchange, carbon isotope discrimination, and grain yield in contrasting rice genotypes subjected to water deficits during the reproductive stage. *Journal of Experimental Botany* **60**: 2325-2339

Cross JM, von Korff M, Altmann T, Bartzetko L, Sulpice R, Gibon Y, Palacios N, Stitt M (2006) variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 arabidopsis accessions growing in carbon-limited conditions. *Plant Physiology* **142**: 1574-1588

Dhawan KR, Bassi PK, Spencer MS (1981) Effects of carbon dioxide on ethylene production and action in intact sunflower plants. *Plant Physiology* **68**: 831-834

Dubois M, Claeys H, Van den Broeck L, Inzé D (2017) Time of day determines Arabidopsis transcriptome and growth dynamics under mild drought. *Plant, Cell & Environment* **40**:180-189

Dubois M, Van den Broeck L, Inzé D (2018) The pivotal role of ethylene in plant growth. *Trends in Plant Science* **23**: 311-323

Feng G, Liu G, Xiao J (2015) The Arabidopsis *EIN2* restricts organ growth by retarding cell expansion. *Plant Signalling and Behaviour* **10**: e1017169

Finlayson SA, Reid DM (1994) Influence of CO₂ on ACC oxidase activity from roots of sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *Phytochemistry* **35**: 847-851

Finlayson SA, Reid DM (1996) The effect of CO₂ on ethylene evolution and elongation rate in roots of sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *Plant Physiology* **98**: 875-881

Fiorani F, Bögemann GM, Visser EJW, Lambers H, Voeselek LACJ (2002) Ethylene emission and responsiveness to applied ethylene vary among *Poa* species that inherently differ in leaf elongation rates. *Plant Physiology* **129**:1382-1390

Geigenberger P, Lerchl J, Stitt M, Sonnewald U (1996) Phloem-specific expression of pyrophosphatase inhibits long-distance transport of carbohydrates and amino acids in tobacco plants. *Plant, Cell & Environment* **19**: 43-55

Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta - Gen Subj* **990**: 87-92

Gibon Y, Usadel B, Blaesing OE, Kamlage B, Hoehne M, Trethewey R, Stitt M (2006) Integration of metabolite with transcript and enzyme activity profiling during diurnal cycles in Arabidopsis rosettes. *Genome Biology* **7**: R76

Hendriks JHM (2003) ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of Arabidopsis and other plant species. *Plant Physiology* **133**: 838-849

Hunt R (1982) Plant growth analysis: Second derivatives and compounded second derivatives of splined plant growth curves. *Annals of Botany* **50**: 317-328

IPCC (2013) "Summary for Policymakers," in *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, eds T. Stocker F, Qin D, Plattner GK, Tignor M, Allen SK, Boschung J, et al. (New York, NY: Cambridge University Press).

Khanna R, Shen Y, Marion CM, Tsuchisaka A, Theologis A, Schäfer E, Quail PH (2007) The basic helix-loop-helix transcription factor PIF5 acts on ethylene biosynthesis and phytochrome signaling by distinct mechanisms. *Plant Cell* **19**: 3915-3929

Kim J, Wilson RL, Case JB, and Binder BM (2012). Ethylene growth response kinetics in eudicots and monocots reveals a role for gibberellin in growth inhibition and recovery. *Plant Physiology* **160**: 1567-1580

Ku HS, Suge H, Rappaport L, and Pratt, HK (1970). Stimulation of rice coleoptile growth by ethylene. *Planta* **90**: 333-339

Leakey ADB, Ainsworth EA, Bernacchi CJ, Rogers A, Long SP, Ort DR (2009) Elevated CO₂ effects on plant carbon, nitrogen, and water relations: Six important lessons from FACE. *Journal of Experimental Botany* **60**: 2859-2876

Lee SH, Reid DM (1997) The role of endogenous ethylene in the expansion of

Helianthus annuus leaves. Canadian Journal of Botany **75**: 501-508

Logan BA, Adams WW, Demmig-Adams B (2007) Avoiding common pitfalls of chlorophyll fluorescence analysis under field conditions. Functional Plant Biology **34**: 853-859

Long SP, Ainsworth EA, Rogers A, Ort DR (2004) Rising atmospheric carbon dioxide: plants FACE in the future. Annual Review of Plant Biology **55**: 591-628

Ma B, He SJ, Duan KX, Yin CC, Chen H, Yang C, Xiong Q, Song QX, Lu X, Chen HW, et al (2013) Identification of rice ethylene-response mutants and characterization of *MHZ7/OsEIN2* in distinct ethylene response and yield trait regulation. Molecular Plant **6**: 1830-1848

Ma B, Yin CC, He SJ, Lu X, Zhang WK, Lu TG, Chen SY, Zhang JS (2014) Ethylene-induced inhibition of root growth requires abscisic acid function in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. PLoS Genetics **10**: e1004701

Ma B, Chen SY, and Zhang, JS (2010). Ethylene signaling in rice. Chinese Science Bulletin **55**: 2204-2210.

Malheiros RSP, Costa LC, Avila RT, Pimenta TM, Teixeira LS, Brito FAL, Zsogon A, Araujo WL, Ribeiro DM (2019) Selenium downregulates auxin and ethylene biosynthesis in rice seedlings to modify primary metabolism and root architecture. Planta **250**: 333-345.

Martins SCV, Galmés J, Molins A, Damatta FM (2013) Improving the estimation of mesophyll conductance to CO₂: On the role of electron transport rate correction and respiration. Journal of Experimental Botany **64**: 3285-3298

Meir S, Riov J, Philosoph-Hadas S, Aharoni N (1989) Carbohydrates stimulate ethylene production in tobacco leaf discs. III. Stimulation of enzymatic hydrolysis of indole-3-acetyl-L-alanine. Plant Physiology **90**: 1246-1248

Muday GK, Rahman A, Binder BM (2012) Auxin and ethylene: Collaborators or competitors? Trends in Plant Science **17**:181-195

Pinelli P, Loreto FL (2003) ¹²CO₂ emission from different metabolic pathways measured in illuminated and darkened C3 and C4 leaves at low, atmospheric and elevated CO₂ concentration. Journal of Experimental Botany **54**: 1761-1769

Ramaglis LS, Rodrigues LV (1985) Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. Electrophoresis **6**: 559-563

Ribeiro RP, Costa LC, Medina EF, Araújo WL, Zsögön A, Ribeiro DM (2018) Ethylene coordinates seed germination behavior in response to low soil pH in *Stylosanthes humilis*. Plant and Soil **425**: 87-100

Savada RP, Ozga JA, Jayasinghege CPA, Waduthanthri KD, Reinecke DM (2017) Heat stress differentially modifies ethylene biosynthesis and signaling in pea floral and

fruit tissues. *Plant Molecular Biology* **95**(3): 313-331

Seneweera S, Aben SK, Basra AS, Jones B, Conroy JP (2003) Involvement of ethylene in the morphological and developmental response of rice to elevated atmospheric CO₂ concentrations. *Plant Growth Regulation* **39**: 143-153

Silva NCQ, de Souza GA, Pimenta TM, Brito FAL, Picoli EAT, Zsögön A, Ribeiro DM (2018) Salt stress inhibits germination of *Stylosanthes humilis* seeds through abscisic acid accumulation and associated changes in ethylene production. *Plant Physiology Biochemistry* **130**: 399-407

Silva PO, Medina EF, Barros RS, Ribeiro DM (2014) Germination of salt-stressed seeds as related to the ethylene biosynthesis ability in three *Stylosanthes* species. *Journal of Plant Physiology* **171**: 14-22

Stitt M, Krapp A (1999) The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: The physiological and molecular background. *Plant, Cell & Environment* **22**: 583-621

Sugiura D, Watanabe CKA, Betsuyaku E, Terashima I (2017) Sink–source balance and down-regulation of photosynthesis in *Raphanus sativus*: Effects of grafting, N and CO₂. *Plant Cell and Physiology* **58**:2043-2056

Thao NP, Khan MIR, Thu NBA, Hoang XLT, Asgher M, Khan NA, Tran L-SP (2015) Role of ethylene and its cross talk with other signaling molecules in plant responses to heavy metal stress. *Plant Physiology* **169**: 73-84

Tholen D, Pons TL, Voesenek LACJ, Poorter H (2007) Ethylene insensitivity results in down-regulation of Rubisco expression and photosynthetic capacity in tobacco. *Plant Physiology* **144**:1305-1315.

Tsuchisaka A, Theologis A (2004). Unique and overlapping expression patterns among the Arabidopsis 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members. *Plant Physiology* **136**: 2982-3000.

Tsuchisaka A, Yu G, Jin H, et al. (2009) A combinatorial interplay among the 1-aminocyclopropane-1- carboxylate isoforms regulate ethylene biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **183**:979-1003.

Valentini R, Epron D, Angelis P, Matteucci G, Dreyer E (1995). In situ estimation of net CO₂ assimilation, photosynthetic electron flow and photorespiration in Turkey oak (*Q. cerris* L.) leaves: diurnal cycles under different levels of water supply. *Plant, Cell & Environment* **18**: 631-640.

Vandenbussche F, Vancompernelle B, Rieu I, Ahmad M, Phillips A, Moritz T, Hedden P, Van Der Straeten D (2007) Ethylene-induced Arabidopsis hypocotyl elongation is dependent on but not mediated by gibberellins. *Journal of Experimental Botany* **58**: 4269-4281

- Wang DR, Bunce JA, Tomecek MB, Gealy D, McClung A, McCough SR, Ziska LH** (2016) Evidence for divergence of response in *Indica*, *Japonica*, and wild rice to high CO₂ x temperature interaction. *Global Change Biology* **22**: 2620-2632
- Woodrow L, Grodzinski B** (1993) Ethylene exchange in *Lycopersicon esculentum* Mill. leaves during short- and long-term exposures to CO₂. *Journal of Experimental Botany* **44**:471-480
- Woodrow L, Thompson RG, Grodzinski B** (1988) Effects of ethylene on photosynthesis and partitioning in tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill. *Journal of Experimental Botany* **39**: 667-684
- Zhang M, Smith JAC, Harberd NP, Jiang C** (2016) The regulatory roles of ethylene and reactive oxygen species (ROS) in plant salt stress responses. *Plant Molecular Biology* **91**: 651–659.
- Zhu J, Kaeppler S, Lynch JP** (2005) Mapping of QTLs for lateral root branching and length in maize (*Zea mays* L.) under differential phosphorus supply. *Theoretical and Applied Genetics* **111**:688-695.
- Zhu C, Xu X, Wang D, Zhu J, Liu G** (2015) An indica rice genotype showed a similar yield enhancement to that of hybrid rice under free air carbon dioxide enrichment. *Scientific Reports* **5**: 12719
- Zhu C, Zhu J, Cao J, Jiang Q, Liu G, Ziska LH** (2014) Biochemical and molecular characteristics of leaf photosynthesis and relative seed yield of two contrasting rice cultivars in response to elevated [CO₂]. *Journal of Experimental Botany* **65**: 6049-6056

CONCLUSÕES GERAIS

O presente estudo evidenciou que o crescimento de plantas de arroz sob elevada $[\text{CO}_2]$ é acompanhado pelo aumento da expressão de genes envolvidos com a expansão celular bem como alteração na expressão de genes associados à diferentes rotas hormonais. Entre os principais hormônios, o etileno parece estar envolvido nas principais mudanças observadas no crescimento de plantas de arroz em resposta à elevada $[\text{CO}_2]$. Ademais, observou-se que não somente os maiores níveis, mas a regulação temporal da biossíntese do etileno controla finamente o desenvolvimento e o metabolismo de plantas de arroz sob elevada $[\text{CO}_2]$. Sugere-se, com base nessa descoberta, que fatores de transcrição que regulam a via de biossíntese de etileno de maneira temporal podem ser potenciais marcadores do crescimento em plantas de arroz em um contexto de elevada $[\text{CO}_2]$.