

Estudos genômicos de tolerância à seca em arroz: uma breve revisão

Ricardo Diógenes Dias Silveira¹, Gabriel Feresin Pantalhão², Cláudio Brondani³

RESUMO

O arroz de terras altas é sensível à seca principalmente durante a fase reprodutiva, quando até mesmo o estresse moderado pode resultar na redução drástica de produtividade. Diante do estresse, é induzida a expressão de vários genes, desencadeando uma complexa rede de respostas que se estende desde a percepção e reconhecimento do sinal de estresse, passando pela ativação de genes de resposta adaptativa. Atualmente, vários estudos têm objetivado identificar e quantificar a expressão desses genes durante o momento do estresse. Técnicas avançadas de sequenciamento têm possibilitado identificar essas regiões expressas no genoma de arroz e associá-las a tolerância à deficiência hídrica. Nesse sentido, a presente revisão de literatura reúne diversos trabalhos de genômica funcional e de transcriptoma de arroz que visam identificar genes relacionados à tolerância à seca.

Palavras-chave: genômica funcional, expressão gênica e RNA-seq

Genomics studies of drought tolerance in rice: a brief review

ABSTRACT

The upland rice is sensitive to drought especially during the reproductive phase, when even moderate stress can result in drastic reduction of productivity. The face of stress, a number of genes is induced in plants, triggering a complex network of responses extending from the perception and recognition of signs of stress, through the activation of adaptive response genes. Currently, several studies have aimed to identify and quantify the expression of these genes during times of stress. Advanced sequencing techniques have made it possible to identify these regions expressed in the genome of rice and associate them with drought tolerance. This literature review meeting several studies of functional genomics and transcriptome of rice aimed at identifying genes related to drought tolerance.

Keywords: functional genomic, gene expression and RNA-seq

Autor para correspondência: Ricardo Diógenes Dias Silveira

Rodovia Geraldo Silva Nascimento, km 2,5, s/n, Zona Rural, Urutaí, GO, Brasil.

E-mail: ricardo.silveira@ifgoiano.edu.br

Recebido em: 10 fev. 2015

Aceito em: 24 mar. 2015

¹Instituto Federal Goiano – Câmpus Urutaí, GO, Brasil

²Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil

³Embrapa Arroz e Feijão (CNPAP), Santo Antônio de Goiás, GO, Brasil

INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa*) é a base da dieta e principal fonte de proteínas e carboidratos para mais de metade da população mundial, e sua importância relativa é mais evidenciada em países pobres e em desenvolvimento (Lee et al. 2011). Os principais centros de consumo deste cereal são Ásia e Oceania, onde vivem 70% da população total dos países em desenvolvimento e cerca de dois terços da população subnutrida mundial. Em países mais pobres da Ásia, como Bangladesh e Vietnã, o consumo de arroz é de 150 a 200 kg *per capita* anual (Maclean et al. 2002). O Brasil é o maior consumidor de arroz fora do continente asiático, em torno de 12 milhões de toneladas anuais em casca, o que equivale a 8 milhões de toneladas de arroz beneficiado, estima-se que a safra 2013/2014 o equivaleu ao seu consumo interno.

Além da sua importância nutricional o arroz apresenta um grande destaque para a economia em todo o Planeta. A produção anual mundial do arroz é cerca de 697 milhões de toneladas (Instituto Internacional de Pesquisa do Arroz – IRRI 2014), sendo que mais de 204 milhões toneladas foram produzidos na China e aproximadamente 151 milhões toneladas de grãos foram produzidos na Índia. A área cultivada com arroz no Brasil é de 2,4 milhões de hectares, sendo 1,3 milhão de hectares no sistema de cultivo irrigado, ou seja, 55,8% do total da área cultivada. A área plantada com arroz de terras altas está concentrada na região Centro-Oeste (Mato Grosso e Goiás); Nordeste (Piauí e Maranhão) e Norte (Pará e Rondônia) (MAPA 2013). A média nacional de produtividade do arroz irrigado na safra 2012/2013 foi de 6,9 ton/ha, enquanto que a produtividade média do arroz de terras altas foi de 2,4 ton/ha (CONAB 2014). O estado do Rio Grande do Sul se destaca como o maior produtor de arroz do Brasil, com 7,6 milhões de toneladas anuais de arroz em casca.

Devido a importância e a diversidade de áreas em que este cereal é cultivado, grandes esforços têm sido feitos na busca de informações genéticas relevantes para o fortalecimento da cadeia produtiva de arroz. Neste sentido, esta revisão bibliográfica objetivou reunir diversos estudos de genômica funcional e de transcriptoma de arroz que visam identificar genes relacionados à tolerância à seca.

GENÔMICA DO ARROZ

O arroz é considerado planta modelo para os cereais por apresentar o genoma relativamente pequeno quando comparado a outras gramíneas, além de possuir grande colinearidade em relação às outras gramíneas, isto é, conservação de genes e de

blocos ordenados de genes nos cromossomos (Moore et al. 1995, Devos e Gale 1997, Gale e Devos 1998). Adicionalmente essa espécie possui uma vasta coleção de germoplasma (Paterson et al. 2005, Xu et al. 2005), o que é uma fonte de variabilidade genética interessante para estudos de genômica e para o melhoramento genético da cultura.

Em 2002 foram publicados dois trabalhos independentes do sequenciamento do genoma do arroz: um grupo de pesquisa na China (BGI – *Beijing Genomics Institute*) sequenciou a cultivar da subespécie *indica* 93-11 (Yu et al. 2002), e um consórcio internacional sequenciou o genoma da cultivar da subespécie *japônica* Nipponbare (Goff et al. 2002). Esse consórcio, denominado IRGSP (*International Rice Genome Sequencing Project*) tem atualizado frequentemente as informações de sequências no seu banco de dados por meio do portal RGAP (*Rice Genome Annotation Project*; <http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>). De acordo com os dados mais recentes, o tamanho do genoma do arroz é de aproximadamente 370 Mpb, possuindo um total de 55.986 locos com função predita, incluindo 39.045 locos de não-ETs (elementos transponíveis) codificando 49.066 modelos gênicos, e 16.941 locos de ETs codificando 17.272 modelos gênicos (Kawahara et al. 2013).

O sequenciamento do genoma do arroz revolucionou os estudos genéticos e moleculares da espécie, tornando públicas informações que passaram a ser utilizadas para o desenvolvimento de marcadores moleculares capazes de amostrar virtualmente qualquer região do genoma, predição da função de sequências regulatórias e/ou genes e dos polipeptídeos por eles codificados, localização de marcas moleculares nos mapas genéticos e físicos, entre outras (Tyagi et al. 2004). A análise genômica do arroz tem sido beneficiada com o desenvolvimento de uma série de ferramentas públicas e interativas para a procura de genes, como o BLAST, também disponível RGAP (http://rice.plantbiology.msu.edu/analyses_search_blast.shtml), posicionamento de transcritos em rotas metabólicas, disponível no KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) e Gramene/RiceCyc (<http://pathway.gamene.org/RICE/class-tree?object=Pathways>), monitoramento da expressão gênica, disponível no RiceXPro (<http://ricexpro.dna.affrc.go.jp/>), interações proteína-proteína, disponível no PRIN (<http://www.bis.zju.edu.ch/prin/>), predição da função gênica, disponível no RiceNet (<http://www.functionalnet.org/ricenet/about.html>), dentre outras. Essas ferramentas, utilizadas em conjunto, permitem a integração *in silico* dos dados obtidos em experimentos de fenotipagem, o que

aumenta a chance de serem encontrados os genes que de fato estão envolvidos na expressão de determinado caráter de interesse.

Os dados de sequenciamento tem gerado o desenvolvimento de uma série de ferramentas úteis para os programas de melhoramento genético do arroz. Vários estudos de genômica funcional em arroz têm utilizado diferentes metodologias, como macro e microarranjos (Kawasaki et al. 2001, Rabbani et al. 2003), RT-qPCR (real time quantitative polymerase chain reaction), SAGE (análise serial de expressão gênica), MPSS (massive parallel signature sequencing) (Nobuta et al. 2007), e, mais recentemente, RNA-seq (sequenciamento de transcriptoma em larga escala). Porém, o grande desafio da genômica funcional está em identificar e determinar a atividade de todos os elementos funcionais do genoma do arroz. Para que ocorra o sucesso da pesquisa neste campo é fundamental uma grande disponibilidade de informação detalhada de dados de transcriptoma em arroz (Zhang et al. 2012).

Muitos genes identificados têm sido utilizados no melhoramento de plantas para melhorar a estrutura das plantas e aumentar a produção de grãos de arroz (Li et al. 2003, Ashikari et al. 2005, Song et al. 2007, Xu et al. 2008, Shomura et al. 2008, Huang et al. 2009) e na resistência à doenças como descrito por Zhang (2007). Embora centenas de genes envolvidos na resposta ao déficit hídrico já tenham sido identificados em arroz, (Ito et al. 2006, Xiao et al. 2007), a função de muitos desses genes ainda não foi validada (Wang et al. 2011).

Até o momento, quatro classes de genes foram relacionadas ao aumento da tolerância à seca: a) Genes que codificam para proteínas funcionais, como por exemplo proteínas que produzem diretamente osmólitos, como poliaminas e trehalose (Capell et al. 2004), proteínas protetoras, como “late embryogenesis abundant proteins” – LEA (Chandra et al. 2004) e outras, como as envolvidas na biossíntese de Ácido Abscísico (ABA); b) Genes que codificam fatores de transcrição, incluindo os membros da família AP2/ERF, proteínas bZip (*basic leucine zipper*), e fatores MYB/MYC (Hadiarto e Tran 2011); c) Genes que codificam fatores de sinalização, como os codificadores de proteínas kinases (Umezawa et al. 2004).

Uma quarta classe geral de genes foi explorada, os quais codificam proteínas envolvidas na percepção do conteúdo de água presente. A superexpressão de um destes genes (AtHK1) em *Arabidopsis* resultou em aumento da tolerância à seca, sem efeitos deletérios no crescimento de planta ou órgãos reprodutivos (Wohlbach et al. 2008). Em arroz, Pareek et al. (2006) caracterizaram

a cadeia de sinalização por fosfotransferência da via histidina-aspartato, na qual pertence a histidina kinase AtHK1. Foram identificados 14 genes codificando para 22 histidina kinases, cinco genes para fosfotransferência codificando sete proteínas, e 32 genes reguladores de resposta codificando para 44 proteínas (as diferenças entre o número de genes e proteínas são assumidas como resultantes do splicing alternativo).

ARROZ DE TERRAS ALTAS E A DEFICIÊNCIA HÍDRICA

Adaptado a solos com altos teores de óxidos de ferro e alumínio, como ocorre na Região do Cerrado, o arroz de terras altas passou a ser uma alternativa importante na abertura de novas áreas de cultivo não favoráveis a culturas como o milho e a soja, por exemplo. Os avanços tecnológicos aliados ao lançamento de cultivares com melhor resposta aos insumos utilizados levaram a recordes de produção e produtividade para o arroz de terras altas a partir do final da década de 1990, particularmente no estado do Mato Grosso (Pinheiro 2003). Entretanto, o arroz cultivado em sequeiro pode ter sua produtividade afetada por fatores climáticos, especialmente a falta de água, pois esta depende diretamente da precipitação pluviométrica natural, que pode ocorrer de forma irregular (Gomes 1997). No Brasil grande parte das lavouras de arroz de sequeiro está localizada na região dos Cerrados, onde é comum a ocorrência de estiagens de duas a três semanas durante a estação chuvosa. Esses episódios de seca podem afetar a produtividade, e conseqüentemente, resultar em perdas econômicas importantes (Taiz e Zeiger 2004).

Durante todo o ciclo, a cultura do arroz de terras altas necessita de 600 a 700 mm de água (Stone e Moreira 2005), exibindo variações quanto à sua exigência nas diferentes fases fenológicas, quais sejam, 30% na fase vegetativa, 55% na fase reprodutiva e 15% na fase de maturação (Ferraz 1987).

A diminuição da disponibilidade de água no solo leva ao déficit hídrico, desencadeando nas plantas uma série de respostas fisiológicas e bioquímicas que estão sob o controle de diversos mecanismos genéticos. Segundo Taiz e Zeiger (1991), as primeiras respostas de plantas ao déficit hídrico consistem no decréscimo da produção da área foliar, fechamento dos estômatos, aceleração da senescência e abscisão das folhas. A área foliar das plantas é reduzida sob deficiência hídrica intensa, e com isso o equilíbrio entre a produção de fotoassimilados e a demanda para o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos é severamente afetada, resultando na redução da produtividade (Gerik et al. 1996). Quando a planta

se encontra em situação de déficit hídrico, o fechamento dos estômatos é acionado para prevenir a perda de água por transpiração (Taiz e Zeiger 2004).

A cultura do arroz sob condições de déficit hídrico durante as fases vegetativa e reprodutiva promovem a redução na produção de matéria seca, teores de nutrientes da parte aérea e na extração de nutrientes até o florescimento (Crusciol et al. 2003), reduzindo o perfilhamento, ou seja, diminuindo o número de colmos (Fornasieri Filho e Fornasieri 1993). Segundo Jalaluddin e Price (1994), as plantas de arroz quando submetidas à deficiência hídrica, acabam exibindo diferenças na eficiência do uso da água, no mecanismo de abertura estomática e na produção de fitomassa.

TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO

As plantas podem utilizar mecanismos fisiológicos, bioquímicos e/ou anatômicos para minimizar o efeito do déficit hídrico ou para recuperar-se rapidamente deste mesmo efeito (Lilley et al. 1996, Price et al. 1997, Price et al. 2002, Bennett 2003). A tolerância à seca está relacionada à capacidade da planta de produzir grãos mesmo sob condições de déficit hídrico em alguma fase do seu desenvolvimento (Levitt 1972, Nguyen et al. 1997, Price et al. 2002, Blum 2005). Um limite máximo de déficit hídrico deve ser experimentalmente estabelecido para que se determine o potencial de produção economicamente viável para cada cultura. Em outras palavras, a submissão da cultura a estresse acima desse limite ultrapassará as suas condições biológicas de produzir suficientemente para tornar-se econômica. Pode-se dizer então que não existe resistência total à seca, pois a água é essencial para a planta sobreviver. O termo “tolerância” é, portanto, o mais adequado para definir a eficiência no uso da água. A seleção de genótipos de arroz adaptados ao sistema de cultivo de sequeiro confunde-se, pela natureza do modo de produção, com a seleção de acessos adaptados à condição de déficit hídrico. A tolerância à seca é uma característica das plantas que são capazes de resistir melhor à menor disponibilidade hídrica, por exibirem maior capacidade de obtenção da água, ou maior eficiência no uso da água disponível (Taiz e Zeiger 2004).

O estresse por déficit hídrico implica em importante alteração na expressão gênica, iniciada pela percepção do sinal primário (mudança no turgor celular), seguida pela transdução do sinal mediada por mensageiros secundários (principalmente Ca^{2+}) podendo ser regulada pela via ABA dependente e/ou independente (Nijhawan et al. 2008). A regulação da transcrição durante o

déficit hídrico envolve a participação de importantes fatores regulatórios como os elementos-cis ABRE (*ABA-responsive element*) e DRE (*dehydration-responsive element*) via ABA-independente (Khurana et al. 2008), além de fatores de transcrição induzíveis por estresse como os genes NAC que regulam a resposta contra a desidratação (Tran et al. 2004). DREBs (*dehydration responsive element binding*) são fatores de transcrição importantes que regulam a expressão de muitos genes estresse-induzidos, normalmente de modo ABA independente e desempenham uma função crítica em melhorar a tolerância a estresses abióticos pela interação com DRE/CRT *cis-elements* presente na região promotora de vários genes responsivos a esses estresses (Lata e Prasad 2011).

A adaptação das plantas ao estresse envolve a manutenção da homeostase celular, detoxificação de compostos nocivos e alterações no crescimento. Estes mecanismos são ativados em função do tempo de duração e da intensidade do estresse e processam-se nos variados níveis de complexidade: morfológicamente, através da redução da área foliar e do aumento do sistema radicular (volume e/ou profundidade); fisiologicamente, por meio de estratégias como o fechamento estomático, o ajuste osmótico, maior eficiência no uso da água (EUA), ativação do sistema antioxidante, absorção e fixação noturna de CO_2 (no caso de plantas que possuem CAM, *Crassulacean Acid Metabolism*); e, molecularmente, pela expressão diferencial de genes, tais como as proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) e enzimas antioxidantes (função protetora), proteínas canal de água (aquaporinas) e de síntese de osmólitos compatíveis (controle do balanço hídrico na célula) e enzimas de síntese de componentes da parede celular (extensibilidade da parede e crescimento celular), entre outros (Hopkins 1999, Taiz e Zeiger, 2004).

Quan et al. (2010) identificaram um aumento na tolerância à seca em arroz após a superexpressão do gene *TSRF1*, um fator de transcrição cuja proteína se liga ao box GCC de genes relacionados à patogênese, originalmente identificado em tabaco. Nesse estudo, o *TSRF1* ativou a expressão do gene *SDR*, putativamente relacionado com a síntese de ABA, além de aumentar a expressão dos genes da síntese de MYB, MYC e prolina, além de genes relacionados à fotossíntese, provavelmente devido à ligação a elementos responsivos à desidratação e boxes GCC em promotores de genes-alvo. A superexpressão de outro fator de transcrição, o *OsDREB2A*, também foi capaz de aumentar a tolerância à seca em arroz (Cui et al. 2011).

Eventos de transformação aumentaram a tolerância a estresse de seca em arroz utilizando o gene LEA (Xiao et al. 2007), e os fatores de transcrição NAC (Zheng et al. 2009), OsWRKY1 (Wu et al. 2009) e ZFP252 (Xu et al. 2008). A superexpressão desses e dos outros de genes descritos acima aumentou a tolerância à seca, mas produziram efeitos negativos no crescimento e/ou produção, quando comparadas as plantas transgênicas e os controles não transgênicos (Ito et al. 2006). Os efeitos deletérios podem ter sido resultantes da expressão constitutiva das proteínas funcionais, fatores de transcrição e/ou fatores de sinalização.

O conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na resposta ao déficit hídrico permite a identificação dos genes expressos nessas condições e a manipulação dessas informações para a obtenção de cultivares mais tolerantes à seca. Adicionalmente, as respostas genéticas que ocorrem nas células em resposta ao déficit hídrico se refletem em mudanças em alguns aspectos fisiológicos da planta, os quais também precisam ser entendidos. Particularmente para cultivares comerciais, somente a sobrevivência da planta sob um período de seca não é o suficiente, pois as mesmas precisam manter níveis desejáveis de produtividade ao final do ciclo (Fukai e Cooper 1995). De acordo com Nguyen et al. (1997) os mecanismos fisiológicos de tolerância à seca estão relacionados ao uso moderado da água através da redução da área foliar e controle da perda de água pelas folhas, e habilidade das raízes em explorar camadas mais profundas do solo.

O conhecimento de todos os fatores envolvidos na tolerância à seca e das respostas das plantas ao estresse fornece as informações que servem de base para a obtenção de cultivares tolerantes. A identificação dos genes envolvidos na resposta ao déficit hídrico em espécies modelo como *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* permite que eles sejam isolados e introduzidos em outras espécies através de técnicas de transformação genética (Edmeades et al. 2004).

RNA-seq

O transcriptoma pode ser definido como sendo o conjunto completo de transcritos em uma célula, e suas quantidades, em um estágio específico do desenvolvimento ou condição fisiológica, incluem portanto, RNA codificante (mRNA) e não codificante (rRNA, tRNA, RNA estrutural, RNA regulatório, e outros tipos de RNAs) (Wang et al. 2009). Diversos trabalhos já foram realizados com o objetivo de entender os mecanismos envolvidos no processo de transcrição nas células (Seshasayee et al. 2006), uma vez que a

alteração nos níveis de expressão está diretamente relacionada às modificações na fisiologia, metabolismo e conseqüentemente ao processo de adaptação celular (Van Vliet 2010).

Até recentemente técnica de microarranjos de DNA era mais utilizada para a determinação de um amplo padrão de expressão gênica (Hinton et al. 2004). Entretanto, algumas limitações metodológicas foram identificadas (Bloom et al. 2009), como por exemplo a especificidade do arranjo para cada tratamento, a saturação do fundo (*background*) e a qualidade e densidade variáveis dos *spots*; fatores que têm dificultado a análise comparativa entre experimentos e, geralmente, levado a necessidade de desenvolver métodos normalizadores complexos (Hinton et al. 2004). O sequenciamento de transcriptoma surgiu como uma alternativa eficiente para solucionar esses problemas, além de possibilitar a análise e interpretação dos dados de sequenciamento sem a necessidade de ter uma sequência genômica de referência previamente descrita.

O sequenciamento do transcriptoma por técnicas convencionais (sequenciamento por 'Sanger') pode também ser realizado. Todavia, este tipo de análise é muito dispendiosa e, por vezes, inviável economicamente devido ao grande número de sequências a serem geradas. Somente após o surgimento do NGS (*Next Generation Sequencing*) e o desenvolvimento de protocolos específicos aplicados na análise e sequenciamento de cDNA em larga escala, que a tecnologia de RNA-seq tornou-se possível. A metodologia de RNA-seq pois possui alta sensibilidade e pode ser utilizada para caracterizar o transcriptoma de um organismo (Pinto et al. 2011). Essa metodologia tem se mostrado útil para descobrir novas transcrições, identificações de mutações, deleções e inserções, *splicings* alternativos e também oferece uma cobertura elevada. Uma das suas grandes vantagens é a ausência quase total de ruídos e a capacidade de detectar um número elevado de cópias de mRNA por célula (Xu et al. 2012).

A metodologia de RNA-seq pode ser descrita, de uma forma simplificada, pelas seguintes etapas: uma quantidade de RNA é convertida em uma biblioteca contendo fragmentos de cDNA; em seguida estes fragmentos recebem adaptadores (bases de DNA) e passam pelo sequenciamento, gerando uma sequência curta (na ordem de 30 a 400 pares de base); essas leituras são alinhadas a um genoma de referência (ou outro transcriptoma) ou até mesmo remontadas sem um genoma de referência a fim de criar um mapa em escala genômica que é composto pela estrutura

transcricional ou o nível de expressão de cada gene individualmente (Wang et al. 2009).

A técnica de RNA-seq tem sido muito utilizada na descoberta e na quantificação de expressão de genes. Essa técnica apresenta vantagens sobre outras tecnologias pela maior sensibilidade e pela alta capacidade de quantificar a expressão gênica, mesmo em transcritos que possuem baixos níveis de expressão (Wang et al. 2009). Vários estudos têm demonstrado que dados de RNA-seq representam de maneira fidedigna as complexas redes integradas da biologia celular vegetal (Bleeker et al. 2011, Xu et al. 2012). Progressos significativos têm sido alcançados com esta tecnologia para o entendimento da expressão gênica em arroz, como os relacionados ao desenvolvimento do embrião (Xu et al. 2012, Gao et al. 2013) e a respostas a estresse biótico (Kawahara et al. 2012), assim como a descoberta de vários genes de arroz nos últimos anos (Zhai et al. 2013, Kyndt et al. 2012, Oono et al. 2011, Mizuno et al. 2010).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do que foi exposto nesta revisão de literatura conclui-se que grandes esforços têm sido realizados por pesquisadores do mundo todo para a descoberta de genes associados a diversos mecanismos de tolerância à deficiência hídrica em arroz, por meio de estudos de genômica funcional. A maioria dos trabalhos, atualmente, visa encontrar regiões expressas do genoma dessa espécie correlacionadas à aspectos fisiológicos e agrônômicos que caracterizam cultivares tolerantes ao estresse causado pela falta de água. Observa-se que vários estudos de transcriptoma têm colaborado para a identificação e quantificação da expressão desses genes em arroz.

REFERÊNCIAS

Ashikari M, Sakakibara H, Lin S, Yamamoto T, Takashi T, Nishimura A, et al. Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science* 309: 741-745, 2005.

Bennett J. Opportunities for increasing water productivity of CGIAR crops through plant breeding and molecular biology. In: *Improving water productivity in agriculture. Comprehensive Assessment of Water Management in Agriculture Series*. Jacob W. Kijne, Randolph Barker and David Molden (eds). Chapter 7: 103-126, 2003.

Bleeker PM, Spyropoulou EA, Diergaarde PJ, et al. RNA-seq discovery, functional characterization, and comparison of sesquiterpene synthases from *Solanum lycopersicum* and *Solanum habrochaites* trichomes. *Plant Molecular Biology*, 77, 323–336, 2011.

Bloom JS, Avaliação da interação entre *Methylobacterium* spp. e citros. Tese (Doutorado em Genética e

Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, 2010, 46p.

Blum A. Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential: are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? *Australian Journal of Agricultural Research*, 56: 1159-1168, 2005.

Capell T, Bassie L, Christou P. Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 101: 9909-9914, 2004.

Chandra BR, Zhang J, Blum A, David HTH, Wu R, Nguyen HT. HVA1, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. *Plant Science*, 166: 855-862, 2004.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira, 2014. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_02_11_15_22_20_boletim_graos_fevereiro_2014.pdf. Acesso em Março de 2015.

Crusciol CAC, Arf O, Soratto RP, Machado JR. Influência de lâminas de água e adubaçãomineral na nutrição e produtividade de arroz de terras altas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 27: 647-654, 2003.

Cui M, Zhang W, Zhang Q, Xu Z, Zhu Z, Duan F, Wub R. Induced over-expression of the transcription factor OsDREB2A improves drought tolerance in rice. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49: 1384–1391, 2011.

Devos KM, Gale MD. Comparative genetics in the grasses. *Plant Molecular Biology*, 35: 3–15, 1997.

Edmeanes GO, Banziger M, Schussler JR. In: Campos H. Improving abiotic stress tolerance in maize: a random or planned process. In: *Proceeding of the Arnel R Hallauer International Symposium on Plant Breeding*, p. 17-22, 2004.

Ferraz EC. Ecofisiologia do arroz In: Castro RC, Ferreira SO. *Ecofisiologia da produção agrícola. Associação Brasileira para pesquisa da Potassa e do Fosfato*, 185-202, 1987.

Fornasieri Filho D, Fornasieri JL. Manual da cultura do arroz. Funep, p. 221, 1991.

Fukai S, Cooper M. Development of drought-resistant cultivars using physio-morphological traits in rice. *Field Crops Research*, 40: 67–86, 1995.

Gale MD, Devos KM. Comparative genetics in the grasses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 1971–1974, 1998.

Gao Y, Xu H, Shen Y, Wang J. Transcriptomic analysis of rice (*Oryza sativa*) endosperm using the RNA-Seq technique. *Plant Molecular Biology*, 81: 363–378, 2013.

Gerik TJ, Faver KL, Thaxton PM. et al. Late season water stress in cotton: I. Plant growth, water uses, and yield. *Crop Science*, 36: 914-921, 1996.

- Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica), Science, 296: 92-100, 2002.
- Gomes MMA. Trocas gasosas e quantificação do ácido abscísico em duas cultivares de arroz sequeiro submetidas à deficiência hídrica. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 9 (3): 117-183, 1997.
- Hadiarto T, Tran LP. Progress studies of drought-responsive genes in rice. Plant Cell Reports, 30 (3) 297-310, 2011.
- Hinton JCD, Hautefort I, Eriksson S, Thompson A, Rhen M. Benefits and pitfalls of using microarrays to monitor bacterial gene expression during infection. Current Opinion in Microbiology, 7: 277-282, 2004.
- Hopkins WG. Introduction to plant physiology. 2nd Ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, 1999.
- Huang X, Qian Q, Liu Z, Sun H, He S, Luo D, et al. Natural variation at the DEP1 locus enhances grain yield in rice. Nature Genetics, 41: 494-497, 2009.
- IRRI. International Rice Research Institute, 2014. Disponível em: <http://ricestat.irri.org:8080/wrs2/entrypoint.htm>. Acesso em Março de 2015.
- Ito Y, Katsura K, Maruyama K, Taji T, Kobayashi M, Seki M, et al. Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. Plant Cell Physiology, 47: 141-153, 2006.
- Jalaluddin M, Price M. Photosynthesis and stomatal conductance as affected by drought stress. International Rice Research Notes (IRRI), 19 (3): 52-53, 1994.
- Kawahara Y, Oono Y, Kanamori H, Matsumoto T, Itoh T, Minami E. Simultaneous RNA-Seq Analysis of a Mixed Transcriptome of Rice and Blast Fungus Interaction. PLOS ONE, 7(11): e49423, 2012.
- Kawasaki S, Borchert C, Deyholos M, Wang H, Brazille S, Kawai K, Galbraith D, Bohnert HJ. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. Plant Cell, 13: 889-905, 2001.
- Khurana P, Vishnudasana D, Chhibbar AK. Genetic approaches towards overcoming water deficit in plants-special emphasis on LEAs. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 14: 277-298, 2008.
- Lee I, Seo, YS, Coltrane D, Hwang S, OH T, Marcotte EM, Ronald PC. Genetic dissection of the biotic stress response using a genome-scale gene network for rice. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108: 8548-18553, 2011.
- Lata C, Prasad M. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *Journal of Experimental Botany*, 62: 4731-4748, 2011.
- Levitt J. Responses of plants to environmental stresses. Academic Press, 732, 1972.
- Li QL, Gao XR, Yu XH, Wang XZ, Jiaan LJ. Molecular cloning and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase gene from Suaeda liaotungensis and its use in improved tolerance to salinity in transgenic tobacco. Biotechnology letters, 25: 1431-1436, 2003.
- Lilley JM, Ludlow MM, McCouch SR, O'Toole JC. Locating QTLs for osmotic adjustment and dehydration tolerance in rice. *Journal of Experimental Botany*, 47: 1427-1436, 1996.
- Kyndt T, Denil S, Haegeman A, Trooskens G, De Meyer T, Van Criekeing W, Gheysen G, Transcriptome analysis of rice mature root tissue and root tips in early development by massive parallel sequencing. *Journal of Experimental Botany*, 63: 2141-2157, 2012.
- Macleane JL, Dave DC, Hardy B, Hettel GP. Rice almanac. 3rd edn. CAB International, Wallingford, Oxon, 2002, p. 253.
- MAPA. Ministério da Agricultura e Pecuária, 2014. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/arroz/>. Acesso em Março de 2015.
- Mizuno H, Kawahara Y, Sakai H, Kanamori H, Wakimoto H, Yamagata H, et al. Massive parallel sequencing of mRNA in identification of unannotated salinity stress-inducible transcripts in rice (*Oryza sativa* L.). BMC Genomics, 11: 683, 2010.
- Moore G, Devos KM, Wang Z, Gale MD. Cereal genome evolution: Grasses, line up and form a circle. Current Biology, 5: 737-739, 1995.
- Nguyen HT, Babu RC, Blu A. Breeding for drought tolerance in rice: physiology and molecular genetics considerations. Crop Science 37: 1426-1434, 1997.
- Nijhawan A, Jain M, Tyagi AK, Khurana JP. Genomic survey and gene expression analysis of the basic leucine zipper transcription factor family in rice. Plant Physiology, 146(2): 333-350, 2008.
- Nobuta K, Venu RC, Lu C, Beló A, Vemaraju K, et al. An expression atlas of rice mRNAs and small RNAs. Nature Biotechnology, 25: 473-477, 2007.
- Oono Y, Kawahara Y, Kanamori H, Mizuno H, Yamagata H, Yamamoto M, et al. mRNA-Seq reveals a comprehensive transcriptome profile of rice under phosphate stress. Rice, 4: 50-65, 2011.
- Pareek TK, Keller J, Kesavapany S, Pant HC, Iadarola MJ, Brady RO, et al. Cyclin-dependent kinase 5 activity regulates pain signaling. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103: 791-796, 2006.
- Paterson AH, Bowers JE, Peterson DG, Estill JC, Chapman BA. Structure and evolution of cereal genomes. *Current Opinion in Genetics and Development*, 13: 644-650, 2003.
- Pinheiro BS. Cultivo do Arroz de Terras Altas: Características da Cultura. Embrapa Arroz e Feijão, Sistemas de Produção, N. 01, 2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHT/ML/Arroz/ArrozTerrasAltas/>. Acesso em Março de 2015.
- Pinto AC, Melo-Barbosa HP, Miyoshi A, Silva A, Azevedo V. Application of RNA-Seq to reveal the transcript profile

in bacteria. *Genetics and Molecular Research*, 10 (3): 1707-18, 2011.

Price AH, Young EM, Tomos AD (1997) Quantitative trait loci associated with stomatal conductance, leaf rolling and heading date mapped in upland rice (*O. sativa*). *New Phytologist*, v. 137: 83–91.

Price AH, Cairns JE, Horton P, Jones HG, Griffiths H (2002) Linking drought-resistance mechanisms to drought avoidance in upland rice using a QTL approach: progress and new opportunities to integrate stomatal and mesophyll responses. *Journal of Experimental Botany*, 53: 989–1004.

Quan RD, Hu SJ, Zhang ZL, Zhang HW, Huang RF. Overexpression of an ERF transcription factor TSRF1 improves rice drought tolerance. *Plant Biotechnology Journal*, 8: 476-488, 2010.

Rabbani MA, Maruyama K, Abe H, Khan MA, Katsura K, et al. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA get-blot analyses. *Plant Physiology*, 133: 1755–1767, 2003.

Seshasayee AS, Bertone P, Fraser GM, Luscombe NM. Transcriptional regulatory networks in bacteria: from input to output response. *Current Opinion in Microbiology*, 9: 511-519, 2006.

Shomura A, Izawa T, Ebana K, Ebitani T, Kanegae H, Konishi S, Yano M. Deletion in a gene associated with grain size increased yields during rice domestication. *Nature Genetics* 40: 1023-1028, 2008.

Song Xj, Huang W, Shi M, Zhu MZ, Lin HX. A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase. *Nature Genetics*, 39: 623-630, 2007.

Stone LF, Moreira JA. A. Irrigação do arroz de terras altas em função da porcentagem de cobertura do solo pela palhada, no sistema plantio direto, Circular Técnica 69, Embrapa – CNPAF, Goiânia, p.4 , 2005.

Taiz L, Zeiger E. *Plant physiology*. The Benjamin/Cummings Publishings Company, p. 565, 1991.

Taiz L, Zeiger E. *Fisiologia vegetal*. Porto Alegre: Artmed, p.449-484, 2004.

Tran LSP, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson SD, Fujita Y, Maruyama K, et al. Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *The Plant Cell*, 16: 2481-2498, 2004.

Tyagi AK, Khurana JP, Khurana P, Raghuvanshi S, Gaur A, Kapur A, et al. Structural and functional analysis of rice genome. *Journal of Genetics*, 83: 79-99, 2004.

Umezawa T, Yoshida R, Maruyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. SRK2C. A SNF1-related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stress-responsive gene expression in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101:17306-17311, 2004.

Van Vliet AHM. Next generation sequencing of microbial transcriptome: challenge and opportunities. *FEMS Microbiology Letters*, 302: 1-7, 2010.

Wang D, Pan Y, Zhao X, Zhu L, Fu B, Li Z. Genome-wide temporal-spatial gene expression profiling of drought responsiveness in rice. *Genomics* 12:149, doi: 10.1186/1471-2164-12-149, 2011.

Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews. Genetics*, 10(1):57-63, 2009.

Wohlbach DJ, Quirino BF, Sussman MR. Analysis of the Arabidopsis histidine kinase ATHK1 reveals a connection between vegetative osmotic stress sensing and seed maturation. *Plant Cell* 20: 1101–1117, 2008.

Wu X, Kishitani S, Ito Y, Toriyama K. Accumulation of raffinose in rice seedlings overexpressing OsWRKY11 in relation to desiccation tolerance. *Plant Biotechnology*, 26: 431–4, 2009.

Xu DQ, Huang J, Guo SQ, Yang X, Bao YM, Tang HJ, Zhang HS (2008) Overexpression of a TFIIIA-type zinc finger protein gene ZFP252 enhances drought and salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *FEBS Letters*, 582: 1037–1043, 2008.

Xiao B, Huang Y, Tang N, Xiong L. Over-expression of a LEA gene in rice improves drought resistance under the field conditions. *Theoretical and Applied Genetics* 115: 35–46, 2007.

Xu H, Gao Y, Wang J. Transcriptomic Analysis of Rice (*Oryza sativa*) Developing Embryos Using the RNA-Seq Technique. *PLoS ONE*, 7 (2): e30646, 2012.

Xu Y, McCouch SR, Zhang Q. How can we use genomics to improve cereals with rice as a reference genome? *Plant Molecular Biology*, 59: 7–26, 2005.

Yu J, HU S, Wang J, Wong GKS, Li S, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp indica). *Science*, 296: 79-92, 2002.

Zhai R, Feng Y, Wang H, Zhan X, Shen X, Wu W, et al. Transcriptome analysis of rice root heterosis by RNA-Seq. *BMC Genomics*, 14: 19, 2013.

Zhang G, Guo G, Hu X, ZhangY, Li Q, Li R, et al. Deep RNA sequencing at single base-pair resolution reveals high complexity of the rice transcriptome. *Genome Research*, 20: 646–654, 2012.

Zhang Q. Strategies for developing gree super rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104:1642-16409, 2007.

Zheng X, Chen B, Lu G, Han B. Overexpression of a NAC transcription factor enhances rice drought and salt tolerance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379: 985–989, 2009.