



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

**Análise do transcriptoma de arroz de terras altas (*Oryza sativa* L.) cultivado sob
condição de seca**

RICARDO DIÓGENES DIAS SILVEIRA

Orientador: Dr. Claudio Brondani

Goiânia

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

**Análise do transcriptoma de arroz de terras altas (*Oryza sativa* L.) cultivado sob
condição de seca**

Ricardo Diógenes Dias Silveira
Orientador: Dr. Claudio Brondani

Tese apresentada à Coordenação do
Programa de Pós-Graduação em
Biologia, da Universidade Federal
de Goiás, como requisito parcial
para obtenção do título de Doutor
em Biologia, área de concentração:
Biologia Celular e Molecular.

Goiânia
2014

Ficha catalográfica elaborada
automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Silveira, Ricardo Diógenes Dias

Análise do transcriptoma de arroz de terras altas (*Oryza sativa* L.)
cultivado sob condição de seca [manuscrito] / Ricardo Diógenes Dias
Silveira. - 2014.

114 f.: il.

Orientador: Prof. Claudio Brondani.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Ciências Biológicas (ICB) , Programa de Pós-Graduação em Biologia,
Goiânia, 2014.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, lista de tabelas.

1. Expressão diferencial de genes. 2. Estresse hídrico. 3. Anotação
funcional. 4. Cultivares brasileiras de arroz. I. Brondani, Claudio ,
orient. II. Título.

Dedicatória

À minha mãe, minha maior
incentivadora, ao meu pai,
um grande exemplo, e a
todos os familiares e amigos
que sempre torcem pelo
meu sucesso.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pela oportunidade de concluir mais esta etapa em minha vida e por proporcionar o convívio com tantas pessoas importantes para a conduta deste trabalho.

Aos meus pais, meu irmão e minha cunhada pelo carinho, força e paciência no decorrer desta etapa, assim como todos os meus familiares.

Agradeço a todos os meus amigos por me proporcionar inúmeros momentos de alegria e confiança. Principalmente aos colegas de trabalho e amigos do laboratório de biotecnologia da Embrapa Arroz e Feijão.

Ao meu orientador Dr. Claudio Brondani pela excelente orientação, oportunidade de desenvolver este trabalho e me proporcionar tamanho crescimento profissional. Assim como a Dr^a. Rosana Vianello que sempre se prontificou em ajudar e oferecer seus conhecimentos nos momentos oportunos.

À Dr^a. Anna Cristina Lanna pela paciência, sabedoria, disponibilidade e confiança que sempre foram oferecidas no decorrer do meu doutorado.

Aos professores e funcionários da Universidade Federal de Goiás pelos conhecimentos compartilhados.

À *North Dakota State University*, em especial ao Dr. Phillip E. McClean e Dr. Sujjan Mamidi, por todo o apoio prestado e por todos os conhecimentos compartilhados ao longo do meu estágio sanduíche nos Estados Unidos.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado e de estágio sanduíche, e a Embrapa Arroz e Feijão por disponibilizar toda a infra-estrutura e recursos para a realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1. A ESPÉCIE <i>Oryza sativa</i>	12
2.1.1. Taxonomia e história.....	12
2.1.2. Importância.....	12
2.2. GENÔMICA DO ARROZ.....	13
2.3. ARROZ DE TERRAS ALTAS E A DEFICIÊNCIA HÍDRICA.....	15
2.4. TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO.....	16
2.5. SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS).....	19
2.6. RNA-seq.....	19
2.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
3. OBJETIVOS.....	32
3.1. OBJETIVO GERAL.....	32
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4. ARTIGO 1 – EXPRESSION OF DROUGHT TOLERANCE GENES IN TROPICAL UPLAND RICE CULTIVARS (<i>Oryza sativa</i>).....	33
4.1. ABSTRACT.....	34
4.2. INTRODUCTION.....	35
4.3. MATERIALS AND METHODS.....	37
4.3.1. Plant Materials and experimental treatment.....	37
4.3.2. RNA isolation.....	38
4.3.3. RNA-seq and Bioinformatics analysis.....	39
4.3.4. Reverse transcription quantitative PCR validation of RNA-seq.....	40
4.4. RESULTS.....	40
4.4.1. RNA-seq experiments.....	40
4.4.2. Global Gene Ontology Annotation.....	42
4.4.3. Differential Gene Expression and Functional Annotation.....	43
4.4.4. Transcription Factors Identification.....	52
4.4.5. Validation of the Differentially Expressed Genes by RT-qPCR.....	52
4.5. DISCUSSION.....	53
4.5.1. Transcripts related to drought stress response in the tolerant cultivar.....	54
4.5.2. Transcription factors.....	55
4.5.3. RT-qPCR gene expression validation.....	56
4.6. FINAL CONSIDERATIONS.....	58
4.7. REFERENCES.....	61
5. ARTIGO 2 – GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM FOLHAS E RAÍZES DE PLANTAS DE ARROZ DE TERRAS ALTAS SUBMETIDAS À CONDIÇÃO DE SECA.....	70
5.1. RESUMO.....	71
5.2. INTRODUÇÃO.....	72
5.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	74
5.3.1. Material vegetal.....	74
5.3.2. Experimento de tolerância à seca.....	74
5.3.3. Atributo agronômico.....	75
5.3.4. Atributos fisiológicos.....	75
5.3.6. Atributos moleculares.....	75
5.3.7. Análise de homologia.....	77
5.3.8. Validação dos dados de RNA-seq via RT-qPCR.....	78
5.4. RESULTADOS.....	78
5.4.1. Atributo agronômico.....	78
5.4.2. Atributos fisiológicos.....	79
5.4.3. Bibliotecas de RNA-seq.....	80
5.4.4. Anotação global dos genes identificados em folhas e em raízes de plantas de Douradão e de Primavera submetidas a diferentes regimes hídricos.....	81
5.4.5. Identificação dos Genes Diferencialmente Expressos (GDEs).....	83
5.4.6. Anotação funcional dos GDEs em folhas de plantas de Douradão e de Primavera submetidas	

a diferentes regimes hídricos.....	84
5.4.7. Anotação funcional dos GDEs identificados em raízes de plantas de Douradão e de Primavera submetidas a diferentes regimes hídricos.....	87
5.4.8. Fatores de Transcrição identificados em folhas e em raízes de plantas de Douradão e de Primavera submetidas a diferentes regimes hídricos.....	89
5.4.9. Anotação funcional dos GDEs entre plantas de Douradão e de Primavera cultivadas sob deficiência hídrica.....	89
5.4.10. Anotação funcional dos GDEs no genoma de <i>Arabidopsis thaliana</i>	93
5.4.11. RT-qPCR.....	94
5.5. DISCUSSÃO.....	96
5.5.1. Genes identificados entre os tratamentos da cultivar tolerante à seca.....	97
5.5.2. Genes identificados entre os tratamentos da cultivar sensível à seca.....	100
5.5.3. Genes diferencialmente expressos entre os tecidos vegetais das cultivares.....	101
5.5.4. Genes homólogos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	102
5.6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	104
5.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107

LISTA DE TABELAS

Table 1. Average yield (g grain pot-1) and reduced yield in plants of the upland rice cultivars Douradão and Primavera, grown under optimal watering (100% water availability) and under drought stress conditions (70, 50 and 30% water availability).....	41
Table 2. Description of sequenced libraries (RNA-seq) from leaf tissues.....	42
Table 3. Metabolic pathways with the largest number of sequences annotated by KEGG.....	45
Table 4 Unique genes in Douradão under drought stress annotated in the kinase activity term by Gene Ontology.....	50
Table 5. List with the 10 genes validated by RT-qPCR. The FPKM values are related to the drought treatment for Douradão (D 30) and Primavera (P 50).....	51
Table 6. Transcription factors (TF) identified in the overexpressed genes of Douradão and Primavera cultivated under drought.....	52
Table S1. Primers sequences of genes validated by RT-qPCR.....	59
Table S2. Volumes of the RT-qPCR components reactions.....	60
Table S3. Primers concentration for reaction.....	60
Tabela 1. Índice de Produtividade (IP) de plantas de arroz de terras altas, cultivares Douradão e BRS Primavera, submetidas aos regimes hídrico de: 70%, 50% e 30% de capacidade de campo (CC) em relação ao tratamento controle (100% de CC), média de dois anos de experimentação, 2010 e 2011.....	78
Tabela 2. Descrição das bibliotecas sequenciadas (RNA-seq) do tecido foliar e radicular de plantas de arroz de terras altas, cultivadas sob condição adequada de água e sob condição de 50 % da CC, na fase reprodutiva durante seis dias.....	81
Tabela 3. Rotas metabólicas, anotadas pelo KEGG, com maior número de sequências obtidas do tecido foliar e radicular de plantas de arroz de terras altas, Douradão e Primavera.....	83
Tabela 4. Genes diferencialmente expressos comuns entre os tecidos foliar e radicular envolvidos em rotas metabólicas descritas pelo KEGG.....	93
Tabela suplementar 1. Sequência dos primers desenhado para os genes validados via RT-qPCR.....	106
Tabela suplementar 2. Volumes das reagents das reações de RT-qPCR.....	106
Tabela suplementar 3. Concentração dos primers na reação de RT-qPCR.....	107

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. Annotation with Gene Ontology terms by Blast2GO of all the sequences identified in libraries from leaf tissues of Douradão and Primavera.....	43
Figure 2. Number of differentially expressed genes between the control (100% FC) and drought treatments in the Douradão cultivar (30% of FC) and Primavera cultivar (50% FC).....	43
Figure 3. Classification of differentially expressed genes in Douradão by Gene Ontology terms in 23 sub-categories considering the three major functional categories: Biological Process, Cellular Component and Molecular Function.....	44
Figure 4. Classification of differentially expressed genes in Primavera by Gene Ontology terms in 27 sub-categories considering the three major functional categories: Biological Process, Cellular Component and Molecular Function.....	46
Figure 5. Distribution of genes up- and downregulated under drought stress.....	47
Figure 6. Venn diagram representing the number of differentially expressed genes comparing Douradão and Primavera. DvsP 100 – differentially expressed genes in the controls, D30vsP50 – differentially expressed genes under drought conditions.....	49
Figure 7. Levels of expression of 10 genes validated by RT-qPCR.....	53
Figura 1. Atributos fisiológicos avaliados plantas de arroz de terras altas, Douradão e Primavera durante o 2º ciclo de deficiência hídrica do segundo ano de experimentação (2011).....	80
Figura 2. Classificação dos genes identificados no tecido foliar e radicular de plantas de arroz de terras altas, Douradão e Primavera, submetidas ao cultivo sob condição hídrica ótima (tratamento 100% de CC) e sob condição de deficiência hídrica (50 % de CC), pelo GO.....	82
Figura 3. Diagramas de Venn representando os genes diferencialmente expressos (GDEs).....	84
Figura 4. Classificação dos genes diferencialmente expressos no tecido foliar de Douradão e Primavera enriquecidos pelos termos do Gene Ontology.....	86
Figura 5. Genes diferencialmente expressos, identificados como <i>chlorophyll A-B binding protein</i> atuantes na <i>Photosynthesis – Antenna Proteins</i> , em folhas de plantas de Douradão e Primavera, a diferentes regimes hídricos.....	86
Figura 6. Classificação dos genes diferencialmente expressos no tecido radicular de Douradão e Primavera enriquecidos pelos termos do Gene Ontology.....	88
Figura 7. Genes de <i>hsp20/alpha crystallin upregulated</i> no tecido radicular de Douradão sob condição de seca atuantes <i>Protein processing in endoplasmic reticulum</i>	88
Figura 8. Classificação dos genes diferencialmente expressos entre Douradão e Primavera no tecido foliar e radicular enriquecidos pelos termos do Gene Ontology.....	91
Figura 9. Genes <i>upregulated</i> no tecido foliar e radicular de plantas de Douradão, cultivadas sob condição de deficiência hídrica, atuantes na <i>Phenylpropanoid biosynthesis</i>	93
Figura 10. Níveis de expressão dos seis genes validados por RT-qPCR.....	95

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 da seca uma variedade de genes é induzida nas plantas, desencadeando uma complexa rede de respostas que se estende desde a percepção e reconhecimento do sinal de estresse até a ativação de genes de resposta adaptativa. O objetivo desta tese foi estudar o transcriptoma de duas cultivares brasileiras de arroz de terras altas (Douradão e Primavera), contrastantes em relação à tolerância à seca, e submetidas a dois experimentos sob déficit hídrico em dois anos consecutivos. No primeiro ano, correspondente ao Artigo 1, foram sequenciados os transcritos provenientes de amostras de folhas, e no segundo ano, correspondente ao Artigo 2, foram sequenciados os transcritos provenientes de amostras de folhas e raízes, para as duas cultivares, sob condições normais e restritas de irrigação durante a fase reprodutiva das plantas. No Artigo 1, o sequenciamento revelou 27.618 transcritos em Douradão, com 24.090 (87,2%) de homologia à genes de arroz e 27.221 transcritos na cultivar Primavera, dos quais 23.663 (86,9%) apresentaram homologia aos genes de arroz. Douradão apresentou 493 genes diferencialmente expressos (GDEs) e Primavera 1.154 GDEs. No Artigo 2 foram identificados 44.978 transcritos do tecido foliar e 37.898 transcritos do tecido radicular, considerando o número total de transcritos de ambas as cultivares. Douradão apresentou 3.554 e 840 GDEs, respectivamente, no tecido foliar e radicular, enquanto que Primavera apresentou, 1.141 e 1.975 GDEs. Foram identificados vários genes atuantes em rotas metabólicas envolvidas em diferentes mecanismos de tolerância a seca nos tecidos foliar e radicular, como por exemplo, genes relacionados à sinalização celular, fatores de transcrição, proteínas protetoras funcionais da célula e enzimas de detoxificação celular. Um conjunto de genes expressos em ambos os tecidos foram validados via RT-qPCR e a maioria deles tiveram resultados similares aos resultados de RNA-seq. Foi realizada uma análise de ortologia envolvendo os transcritos não anotados em arroz contra o banco de dados de *Arabidopsis thaliana*, a qual revelou um gene relacionado ao crescimento celular de raízes na cultivar Douradão. Os 16 genes validados via RT-qPCR relacionados a tolerância à seca serão utilizados como marcadores moleculares em seleção assistida no programa de melhoramento de arroz de terras altas e são genes candidatos a serem utilizados na transformação de genótipos sensíveis à seca.

Palavras-chave: Expressão diferencial de genes, Estresse hídrico, Anotação funcional, Cultivares brasileiras de arroz.

ABSTRACT

The upland rice is sensitive to drought especially during the reproductive phase, when even moderate stress can result in drastic reduction in yield. Upon the occurrence of the drought a variety of genes is induced in plants, triggering a complex network of responses that extends from the perception and recognition of sign of stress, through activation of adaptive response genes. The objective of this thesis was to study the transcriptome of two Brazilian cultivars of upland rice (Douradão and Primavera) contrasting in relation to drought tolerance, and subjected to two experiments under water deficit in two consecutive years. In the first year, corresponding to Article 1, the transcripts from leaf samples were sequenced by RNA-seq, and in the second year, corresponding to Article 2, the transcripts from leaf and root samples were sequenced, for both cultivars, under normal and limited irrigation during the reproductive phase. In Article 1, the sequencing showed in Douradão 27,618 transcripts, from which 24,090 (87.2 %) showed homology to rice genes and 27,221 transcripts in Primavera, from which 23,663 (86.9 %) showed homology to rice genes. Douradão had 493 differentially expressed genes (DEGs) and Primavera 1,154 DEGs. In Article 2 it were identified 44,978 and 37,898 transcripts in leaf and root tissues, respectively. Douradão showed 3,554 and 840 differentially expressed genes (DEGs), in leaf and root tissues, respectively, while Primavera showed 1,141 and 1,975 DEGs on those tissues, respectively. It were identified genes from different metabolic routes related to distinct drought tolerance mechanisms in leaf and root tissues, such as cell signaling -related genes, transcription factors, functional protective proteins and cell cellular detoxification enzymes. A set of expressed genes from both tissues were validated by RT-qPCR and most of them were similar to the results of RNA-seq results. The rice transcripts not annotated were submitted to an orthology analysis in relation to the *Arabidopsis thaliana* databank, which revealed one gene related to the root cell growth Douradão. The 16 genes validated by RT-qPCR will be used as molecular markers for marker assisted selection in the upland rice breeding program and are candidate genes for use in transformation of rice cultivars susceptible to drought.

Keywords: Differential gene expression, Water deficit, Functional annotation, Brazilian rice cultivars.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil o arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos produtos que compõem a cesta básica e uma das principais fontes de caloria da população. Para uma população crescente, é necessário que a produtividade da cultura seja aumentada, ou que barreiras sejam ultrapassadas para a redução de perdas na produção, ou ainda que a cultura tenha um melhor desempenho sob condições adversas. No cultivo do arroz de terras altas ocorre redução de produtividade por estresses abióticos como seca e frio, em consequência de variações climáticas nas principais regiões produtoras do Brasil, como o Sul e o Centro-Oeste. Uma das características mais desejáveis entre as variedades adaptadas ao sistema de cultivo de terras altas é, portanto, a capacidade de produzir economicamente mesmo em condições de deficiência de água.

O conceito de tolerância à seca é bastante amplo e, do ponto de vista da agricultura, está relacionado à capacidade da planta de produzir grãos mesmo sob condições de déficit hídrico em alguma fase do seu desenvolvimento (Levitt, 1971; Nguyen et al., 1997; Price et al., 2002; Blum, 2005). Essa capacidade pode ser entendida tanto como tolerância a uma seca moderada durante todo o seu ciclo ou, em outro extremo, como tolerância a seca severa por um curto período em um estágio específico de desenvolvimento.

A planta pode ser considerada como tolerante à seca por sua capacidade de: (a) reduzir a perda de água para o ar e para o solo; (b) manter o turgor por um período extenso de déficit hídrico; (c) sobreviver à perda de turgor; (d) proteger as células contra o dano oxidativo causado pela contínua absorção de radiação em condições em que a abertura estomatal não permite a fotossíntese; (e) prevenir a esterilidade do pólen e o aborto do embrião durante o florescimento; (f) alocar grande parte do carbono fixado nos grãos (índice de colheita elevado). A identificação e o isolamento de genes associados a essas características são de grande importância no entendimento dessa característica e no desenvolvimento de variedades tolerantes à seca (Tuberosa and Salvi, 2006; Lafitte et al., 2007).

Esta Tese de doutorado teve como objetivo principal estudar por dois anos consecutivos o transcriptoma de duas cultivares brasileiras de arroz de terras altas (Douradão e Primavera) contrastantes em relação à tolerância à seca. No primeiro ano, correspondente ao Artigo 1, foram sequenciados transcritos provenientes de amostras de tecido foliar, e no segundo ano, correspondente ao Artigo 2, foram sequenciados transcritos provenientes de amostras de folhas e raízes, sendo utilizadas, em ambos experimentos, as cultivares Douradão (tolerante à seca) e Primavera (suscetível à seca), sob condições normais e restritas de irrigação durante a fase reprodutiva.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A ESPÉCIE *Oryza sativa*

2.1.1. Taxonomia e história

O gênero *Oryza* está classificado na tribo Oryzae, subfamília Oryzoideae, família Poaceae (Graminae). Este gênero possui duas espécies cultivadas, *Oryza sativa* L., cultivada no mundo todo, e *O. glaberrima*, cultivada em alguns países da África Ocidental, e mais de 20 espécies silvestres, distribuídas nas regiões tropical e subtropical (Vaughan et al., 2003). *O. sativa* é a espécie mais cultivada mundialmente, ocupando o segundo lugar entre os cereais mais produzidos. Estudos demonstram que esta espécie é originária da Ásia e acredita-se que a sua domesticação tenha ocorrido aproximadamente entre 10.000 e 9.000 anos atrás (Londo et al., 2006; Kawakami et al., 2007).

O. sativa possui duas subespécies, *indica* e *japonica*. A subespeciação destas, segundo teoria mais aceita, é de que tenham sido originadas de dois eventos de domesticação distintos, ou seja, de duas populações diferentes da espécie silvestre *Oryza rufipogon* (Hu et al., 2006; Londo et al., 2006; Kawakami et al., 2007). A estimativa do tempo de divergência entre as duas subespécies é de aproximadamente 440 mil anos, segundo Ma and Bennetzen (2004).

Devido aos processos de domesticação as duas subespécies apresentam, em geral, características morfológicas distintas, grande divergência genética e um isolamento parcial em termos de reprodução sexuada. A subespécie *indica* é predominantemente tropical, ao contrário da subespécie *japonica* que apresenta variedades tropicais e temperadas, e é cultivada no Leste Asiático, América do Norte, América Latina, Norte da África e Europa. Sua produção corresponde a 20% do total de arroz produzido no mundo (Mackill, 1995).

No Brasil, arroz é cultivado em dois tipos de sistemas, o de várzeas, irrigado por inundação controlada, e o de terras altas, também conhecido por sequeiro, com ou sem irrigação por aspersão (Guimarães et al., 2006). Considera-se que a maioria das variedades de terras altas é da subespécie *japonica* tropical e as variedades irrigadas são do tipo *indica* (Khush, 1997). Estima-se que, no mundo todo, aproximadamente 55% da área plantada de arroz sejam irrigadas (Khush, 1997).

2.1.2. Importância

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). No Brasil o consumo de grãos *per capita* durante 2009 foi de 34,6 kg segundo dados da FAO, perfazendo 6,7g *per capita* diários.

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. O Brasil é o país com maior consumo 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 (CONAB, 2014). 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.

2.2. 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 and Gale, 1997; Gale and 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 no 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.gramene.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 (Hadiartho and 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).

2.3. 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 (Pereira et al., 1999). 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 consequentemente, resultar em perdas econômicas importantes (Taiz and Zeiger, 2004).

Durante todo o ciclo, a cultura do arroz de terras altas necessita de 600 a 700 mm de água (Stone and 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 and 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 and 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 and Fornasieri, 1993). Segundo Jalaluddin and 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.

2.4. 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 and 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 (Khurana 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 (Trans 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 and 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 and 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 and 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).

2.5. SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS)

As novas tecnologias de sequenciamento, denominadas de sequenciamento de nova geração ou sequenciamento em larga escala, começaram a ser comercializadas em 2005 e estão evoluindo rapidamente. Todas essas tecnologias promovem o sequenciamento de DNA em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases em uma única corrida. Estas tecnologias diferem principalmente quanto ao mecanismo químico empregado no processo, ao volume de dados gerados e a precisão na detecção de bases nitrogenadas (Maclean et al., 2009).

A *Roche* foi a primeira empresa a lançar no mercado, em 2005, uma tecnologia de sequenciamento de DNA em larga escala (equipamento 454 GS20), baseada na tecnologia de pirosequenciamento. No início de 2007 a empresa *Illumina* disponibilizou sua primeira plataforma (Solexa GA). Posteriormente foram lançadas as plataformas SOLiD (*Applied Biosystems*) e Heliscope (*Helicos*). Desde então essas empresas tem voltado suas pesquisas no aprimoramento de suas tecnologias, levando a uma contínua atualização de plataformas capazes de gerar um volume de dados cada vez maior, com maior precisão na detecção de bases e/ou tamanhos de *reads* maiores.

2.6. 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 à modificações na fisiologia, metabolismo e consequentemente 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 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).

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).

2.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K (1997) Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell*, 9: 1859-1868.

Anderson W, Smith BM, Gustafson J (1994) Health benefits practical aspects of high-fiber diets. *American Journal of Clinical Nutrition*, 59: 1242-1249.

Ashikari M, Sakakibara H, Lin S, Yamamoto T, Takashi T, Nishimura A, Angeles ER, Qian Q, Kitano H, Matsuoka M (2005) Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science* 309:741-745.

Assad, ED, Pinto HS, Zullo Junior J, Brunini O (2002) Mudanças climáticas: o aquecimento global e a agricultura. *Reportagens – Com Ciência*.

Bellin D, Ferrarini A, Chimento A, Kaiser O, Levenkova N, Bouffard P, Delledonne M (2009) Combining next-generation pyrosequencing with microarray for large scale expression analysis in non-model species. *BMC Genomics* 10: 555.

Bennet J (2003) 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.) 7: 103-126.

Bloom JS (2010) Avaliação da interação entre *Methylobacterium* spp. e citros. 46p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo.

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

Breeden L, Nasmyth K (1987). Similarity between cell-cycle genes of budding yeast and fission yeast and the Notch gene of *Drosophila*. *Nature*, 329: 651-654.

Diédhiou CJ, Popova OV, Dietz KJ, Golldack D (2008) The SNF1-type serine-threonine protein kinase SAPK4 regulates stress-responsive gene expression in rice1. *BMC Plant Biology*, 8: 49.

Chen H, Lai Z, Shi J, Xiao Y, Chen Z, Andxu X (2010) Roles of Arabidopsis WRKY18, WRKY40 and WRKY60 transcription factors in plant responses to abscisic acid and abiotic stress. *BMC Plant Biol.*, v. 10, n. 281. doi:10. 1186/1471-2229-10-281.

Cho JI, Ryoo N, Eom JS, Lee DW, Kim HB, Jeong SW, Lee YH, Kwon YK, Cho MH, Bhoo S. H, Hahn TR, Park YI, Hwang I, Sheen J, Jeon, JS (2009) Role of the Rice Hexokinases OsHKK5 and OsHKK6 as Glucose Sensors. *Plant Physiology*, 149: 745–759.

Ciftci-yilmaz S, Mittler R (2008) The zinc finger network of plants. *Cell Mol. Life Sci.* 65: 1150–1160.

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira (Fevereiro/2014). 26pp. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_02_11_15_22_20_boletim_graos_fevereiro_2014.pdf

Crusciol CAC, Machado JR, Arf O, Rodrigues RAF (1999) Componentes de produção e produtividade de grãos de arroz de sequeiro em função do espaçamento e da densidade de semeadura. *Sci. agric.*, v. 56, n. 1.

Crusciol CAC, Arf O, Soratto RP, Machado JR (2003) Influência de lâminas de água e adubaçãomineral na nutrição e produtividade de arroz de terras altas. *R. Bras. Ci. Solo*, 27: 647-654, 2003.

Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR (2010) Absciscic acid: Emergence of a core signaling network. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 61: 651–679.

Dai N, Schaffer A, Petreikov M, Shahak Y, Giller Y, Ratner K, Levine A, Granot D (1999) Overexpression of Arabidopsis Hexokinase in Tomato Plants Inhibits Growth, Reduces Photosynthesis, and Induces Rapid Senescence. *The Plant Cell*, 11: 1253-1266.

Datta SK, Malabuyoc JA, Aragon EL (1998) A field screening technique for evaluating rice germoplasma for drought tolerance during the vegetative stage. *Field Crop Res*, 19: 123-134.

Dardick C, Chen J, Richter T, Ouyang S, Ronald P (2007) The rice kinase database. A phylogenomic database for the rice kinome. *Plant Physiol*, 143: 579–586.

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

Easterling DR, Meehl GA, Parmesan C, Changnon SA, Karl TR, Mearns LO (2000) Climate extremes: observations, modeling and impacts. *Science*, 289: 2068-2073.

Edmeanes GO, Banziger M, Schussler JR (2004) 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 2003.

Erik A, Van DB, Jonathan DGJ (1998) The NB-ARC domain: a novel signaling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Curr Biol* 8: 226–667, 1998.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/home/index.html#DOWNLOAD>. Acessado em: 24 de janeiro de 2014.

Fageria NK (2006) Adubação e Calagem. In: A Cultura do Arroz no Brasil. 2ªed. Rev. ampl. – Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão.

Ferraz EC (1987) Ecofisiologia do arroz In: CASTRO, R. C. FERREIRA, S. O. Ecofisiologia da produção agrícola. Associação Brasileira para pesquisa da Potassa e do Fosfato, p. 185–202, 1987.

Friedel S, Björn Usadel B, Von Wirén N, Sreenivasulu N (2012) Reverse engineering: a key component of systems biology to unravel global abiotic stress cross-talk. *Frontiers in Plant Science*, 31 (294): 1-16.

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

Fukai S, Cooper M (1995) Development of drought-resistant cultivars using physiological traits in rice. *Field Crops Res*, 40: 67–86.

Garris AJ, Tai TH, Coburn J, Kresovich S, McCouch S (2005) Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. *Genetics*, 169 (3):1631–8.

Gale MD, Devos KM (1998) Comparative genetics in the grasses. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 1971–1974.

Galletti R, Denoux C, Gambetta S, Dewdney J, Ausubel FM, Delorenzo G, et al. (2008) The AtrbohD-mediated oxidative burst elicited by oligogalacturonides in *Arabidopsis* is dispensable for the activation of defense responses effective against *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.*, 148: 1695–1706.

Glantz MH (1988) Drought and hunger in Africa: denying famine a future, Cambridge University Press, Printed in Great Britain, 1988.

- Gao Y, Xu H, Shen Y, Wang J (2013) Transcriptomic analysis of rice (*Oryza sativa*) endosperm using the RNA-Seq technique. *Plant Mol Biol* 81:363–378.
- Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H et al. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. Japonica), *Science*, 296 :92-100.
- Gomes MMA (1997) 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.
- Graham IA, Denby KJ, Leaver CJ (1994) Carbon catabolite repression regulates glyoxylate cycle gene expression in cucumber. *Plant Cell*, 6: 761–772.
- Guimarães CM, Santos AB, Magalhães AM, Stone LF (2006) Sistemas de cultivo. In: SANTOS A. B; STONE L. F; VIEIRA N. R (eds). *A cultura do arroz no Brasil*, 3: 53-96.
- Han B, Xue Y (2003) Genome-wide intraspecific DNA-sequence variations in rice. *Current Opinion in Plant Biology*, 6 (2): 134–138.
- Hilton JC, Hautefort I, Eriksson S, Thompson A, Rhen M (2004) Benefits and pitfalls of using microarray to monitor bacterial gene expression during infection. *Current Opinion in Microbiology*, 7: 227-282.
- Huang J, Yang X, Wang MM, Tang HJ, Ding LY, Shen Y, Zhang HS (2007) A novel rice C2H2-type zinc finger protein lacking DLNbox/EAR-motif plays a role in salt tolerance. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1769: 220–227, 2007.
- Huang X, Qian Q, Liu Z, Sun H, He S, Luo D, Xia G, Chu C, Li J, Fu X (2009) Natural variation at the DEP1 locus enhances grain yield in rice. *Nat Genet* 41: 494-497.
- Huang XY, Chao DY, Gao JP, Zhu MZ, Shi M, Lin HX (2009) A previously unknown zinc finger protein, DST, regulates drought and salt tolerance in rice via stomatal aperture control. *Genes Dev.*, 23: 1805–1817.
- Hubbard KE, Nishimura N, Hitomi K, Getzoff ED, SCHROEDER JI (2010) Early abscisic acid signal transduction mechanisms: Newly discovered components and newly emerging questions. *Genes Dev.* 24: 1695–1708.

Hu F, Xu P, Deng X, Zhou J, Li J, Tao D (2006) Molecular mapping of a pollen killer gene S29(t) in *Oryza glaberrima* and co-linear analysis with S22 in *O. glumaepatula*. *Euphytica*, 151: 273-278.

IRRI. International Rice Research Institute (Fevereiro/2014). Disponível em: <http://ricestat.irri.org:8080/wrs2/entrypoint.htm>

IRGSP (International Rice Genome Sequencing Project). (2005) The map-based sequence of the rice genome. *Nature*, 436: 793-800.

Ito Y, Katsura K, Maruyama K, Taji T, Kobayashi M, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2006) Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. *Plant Cell Physiol* 47: 141–153.

Jalaluddin M, Price M (1994) Photosynthesis and stomatal conductance as affected by drought stress. *International Rice Research Notes (IRRI)*, 19 (3):52-53.

Jiang GH, Xu CG, Tu JM, Li XH, He YQ, Zhang QF (2004) Pyramiding of insect-and disease-resistance genes into an elite indica, cytoplasm male sterile restorer line of rice ‘Minghui 63’. *Plant Breeding*, 123 (2):112-116.

Kawakami S, Ebana K, Nishikawa T, Sato Y, Vaughan DA, Kadowaki K (2007) Genetic variation in the chloroplast genome suggests multiple domestication of cultivated Asian rice (*Oryza sativa* L.), *Genome*, v. 50, p.180-187.

Kawasaki S, Borchert C, Deyholos M, Wang H, Brazille S, Kawai K, Galbraith D, Bohnert HJ (2001) Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell*, v. 13, p. 889-905.

Kawahara Y, Oono Y, Kanamori H, Matsumoto T, Itoh T, Minami E (2012) Simultaneous RNA-Seq Analysis of a Mixed Transcriptome of Rice and Blast Fungus Interaction. *PLOS ONE* 7(11): e49423.

Kawahara Y, de la Bastide M, Hamilton JP, Kanamori H, McCombie WR, Ouyang S, et al. (2013) Improvement of the *Oryza sativa* Nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data. *Rice* 6:4.

Kyndt T, Denil S, Haegeman A, Trooskens G, De Meyer T, Van Criekinge W, Gheysen G (2012) Transcriptome analysis of rice mature root tissue and root tips in early development by massive parallel sequencing. *J Exp Bot*, 63: 2141–2157.

Lal R (2009) Soil degradation as a reason for inadequate human nutrition. *Food Security*, 1 (1):45-57.

Levitt J (1972) Responses of plants to environmental stresses. Academic Press, 732.

Lilley JM, Ludlow MM, McCouch SR, O'Toole JC (1996) Locating QTLs for osmotic adjustment and dehydration tolerance in rice. *J Exp Bot*, 47: 1427-1436.

Londo JP, Chiang YC, Hung KH, Chiang TY, Schaal BA (2006) Phylogeography of Asian wild rice, *Oryza rufipogon*, reveals multiple independent domestications of cultivated rice, *Oryza sativa*. *PNAS*, 103: 9578-9583.

Ma J, Bennetzen JL (2004) Rapid recent growth and divergence of rice nuclear genomes. *Proc Natl Acad Sci*, v. 101, n. 34, p.12404–12410.

Mackill DJ, Salam MA, Wang ZY, Tanksley SD (1993) A major photoperiod-sensitivity gene tagged with RFLP and isozyme markers in rice. *Theor. Appl. Genet*, 85: 536-540.

Maclean JL, Dave DC, Hardy B, Hettel GP (2002) Rice almanac. CAB International, Wallingford Natl. Acad. Sci, 101: 12404–12410.

Mao X, Zhang H, Tian S, Chang X, Jing R (2009) TaSnRK2.4, an SNF1-type serine/threonine protein kinase of wheat (*Triticum aestivum* L.), confers enhanced multistress tolerance in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 61 (3): 683-696.

MAPA. Ministério da Agricultura e Pecuária (Fevereiro/2014). Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/arroz/>.

McMichael AJ, Woodruff RE, Hales S (2006) Climate change and human health: present and future risks, *The Lancet*, 367 (9513): 11–17.

Miller G, Shulaev V, Mittler R (2008) Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiol. Plant.*, 133: 481–489.

Mizuno H, Kawahara Y, Sakai H, Kanamori H, Wakimoto H, Yamagata H, Oono Y, Wu J, Ikawa H, Itoh T, Matsumoto T (2010) Massive parallel sequencing of mRNA in

identification of unannotated salinity stress-inducible transcripts in rice (*Oryza sativa* L.). *BMC Genomics*, 11: 683.

Moore G, Devos KM, Wang Z, Gale MD (1995) Cereal genome evolution: Grasses, line up and form a circle. *Curr. Biol.*, 5: 737-739.

Nguyen HT, Babu RC, Blu A (1997) Breeding for drought tolerance in rice: physiology and molecular genetics considerations. *Crop Sci.*, v. 37, p. 1426-1434.

Nicholls N (2004) The changing nature of Australian droughts, *Clim. Change*, 63: 323– 336.

Nobuta K, Venu RC, Lu C, Beló A, Vemaraju K, Kulkarni K, Wang W, Pillay M, Green PJ, Wang GL, Meyers BC (2007) An expression atlas of rice mRNAs and small RNAs. *Nat. Biotechnol.*, 25: 473-477.

Olsson L (1993) On the causes of famine – drought, desertification and market failure in the Sudan, *Ambio*, 22 (6).

Oono Y, Kawahara Y, Kanamori H, Mizuno H, Yamagata H, Yamamoto M, Hosokawa S, Ikawa H, Akahane I, Zhu Z, et al. (2011) mRNA-Seq reveals a comprehensive transcriptome profile of rice under phosphate stress. *Rice*, 4: 50–65.

Paterson AH, Bowers JE, Peterson DG, Estill JC, Chapman BA (2003) Structure and evolution of cereal genomes. *Curr. Opin. Genet Dev.*, 13: 644-650.

Pereira JA (2002) Cultura do arroz no Brasil - subsídios para a sua história, Teresina - PI:Embrapa - Meio Norte.

Platz JA (2002) A human disease indicator for the effects of recent global climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 (20): 1112506-12508.

Piironen V, Lindsay DG, Miettinen TA, Toivo J, Lampi AM (2000) Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7): 939-966.

Pinheiro BS, Castro EM, Guimarães CM (2006) Sustainability and profitability of aerobic rice production in Brazil. *Field Research*, 97: 34-42.

Pinto AC, Melo-Barbosa HP, Miyoshi A, Silva A, Azevedo V (2011) Application of RNA-Seq to reveal the transcript profile in bacteria. *Genet Mol Res.*, 10 (3)1707-18.

- 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 Phytol*, 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. *J Exp Bot*, 53: 989–1004.
- Rabbani MA, Maruyama K, Abe H, Khan MA, Katsura K, Ito Y, Yoshiwara K, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) 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 Physiol*, 133, 1755–1767.
- Sasaki T, Burr B (2000) International rice genome sequencing project: the effort to completely sequence the rice genome. *Curr Opin Plant Biol*, 3: 138–141.
- Seshasayee AS, Bertone P, Fraser GM, Luscombe NM (2006) Transcriptional regulatory networks in bacteria: from input to output response. *Current Opinion in Microbiology*, 9: 511-519.
- Shomura A, Izawa T, Ebana K, Ebitani T, Kanegae H, Konishi S, Yano M (2008) Deletion in a gene associated with grain size increased yields during rice domestication. *Nat Genet* 40: 1023-1028.
- Slavin J (2004) Whole grains and human health. *Nutrition Research Reviews*, 17 (1): 99-110.
- Smeekens S, Rook F (1997) Sugar sensing and sugar-mediated signal transduction in plants. *Plant Physiol*, 115: 7–13.
- Song Xj, Huang W, Shi M, Zhu MZ, Lin HX (2007) A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase. *Nat Genet* 39: 623-630.
- Souza JG, de Beltrão NE, de M (1999) Fisiologia. In: BELTRÃO, N. E. de M. (org.). *O agronegócio do algodão no Brasil*. Embrapa-Comunicação para Transferência de Tecnologia, v. 1, cap. IV, 89-116.
- Stogios PJ, Downs GS, Jauhal JJS, Nandra SK, Privé GG (2005) Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome Biology*, 6 (10): 82.
- Stone, LF, Moreira, JAA (2005) 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, 4.

- Sun SJ, Guo SQ, Yang X, Bao YM, Tang HJ, Sun H, Huang J, Zhang HS (2010) Functional analysis of a novel Cys2/His2-type zinc finger protein involved in salt tolerance in rice. *J. Exp. Bot.*, 61, 2807–2818.
- Taiz L, Zeiger E (2004) *Fisiologia vegetal*. Porto Alegre: Artmed, p.449-484.
- Taiz L, Zeiger E (1991) *Plant physiology*. The Benjamin/Cummings Publishings Company, p. 565, 1991.
- Trapnell C, Hendrickson DG, Sauvageau M, Goff L, Rinn J, Pachter L (2012) Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nature Biotechnology*, 9: 1-9.
- Tuberosa R, Salvi S (2006) Genomics approaches to improve drought tolerance in crops. *Trends in Plant Science*, v. 11, p. 415-412, 2006.
- Tyagi AK, Khurana JP, Khurana P, Raghuvanshi S, Gaur A, Kapur A, Gupta V, Kumar D, Ravi V, Vij S, Khurana P, Sharma S (2004) Structural and functional analysis of rice genome. *Journal of Genetics*, 83, 79-99.
- Vaughan DA, Morishima H, Kadowaki K (2003) Diversity in the genus *Oryza*. *Curr Opin Plant Biol*, 6: 139-146.
- Vaughan DA (1994) *The wild relatives of rice, a genetic resources handbook*. International Rice Research Institute (IRRI). Manila, Philippines. 130 p.
- Van Vliet AHM (2010) Next generation sequencing of microbial transcriptome: challenge and opportunities. *FEMS Microbiology Letters*, 302: 1-7.
- Venuprasad R, Bool ME, Quiatchon L, Sta Cruz MT, Amante M, Atlin GN (2011) A large-effect QTL for rice grain yield under upland drought stress on chromosome 1. *Molecular Breeding*, 30 (1) 535–547.
- Waal A DE, Whiteside A. New variant of famine: AIDS and food crisis in southern Africa. *Lancet*. 362: 1234-1237, 2003.
- Wang D, Pan Y, Zhao X, Zhu L, Fu B, Li Z (2011). Genome-wide temporal-spatial gene expression profiling of drought responsiveness in rice. *Genomics* 12:149, doi: 10.1186/1471-2164-12-149.

- Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews. Genetics*, v. 10, n.1, p.57-63.
- Wingler A, Von Schaewen A, Leegood RC, LEA PJ, Quick WP (1998) Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars, and light. Effects on NADH-dependent hydroxypyruvate reductase. *Plant Physiol*, v. 116, 329–335.
- Yu J, HU S, Wang J, Wong GKS, Li S, Liu B, Deng Y, Dai L, Zhou Y, Zhang X et al. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp indica). *Science*, 296: 79-92.
- Xiao B, Huang Y, Tang N, Xiong L (2007) Over-expression of a LEA gene in rice improves drought resistance under the field conditions. *Theor Appl Genet* 115: 35–46.
- 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 Lett.*, 582: 1037–1043.
- Xu H, Gao Y, Wang J (2012) Transcriptomic Analysis of Rice (*Oryza sativa*) Developing Embryos Using the RNA-Seq Technique. *PLOs ONE* 7(2): e30646.
- Zeng QY, Yang CY, Ma QB, Li XP, Dong WW, Nian H (2012) Identification of wild soybean miRNAs and their target genes responsive to aluminum stress. *BMC Plant Biology*, 12: 182.
- Zhang H, Jin J, Tang L, Zhao Y, Gu X, Gao G, Luo J (2011) Database issue, *Nucleic Acids Research*, Vol. 39, p.1114–1117, 2011.
- Zhang G, Guo G, Hu X, ZhangY, Li Q, Li R, Zhuang R, Lu Z, He Z, Fang X, Chen L, Tian W, Tao Y, Kristiansen K, Zhang X, Li S, Yang H, Wang J, Wang J (2012) Deep RNA sequencing at single base-pair resolution reveals high complexity of the rice transcriptome. *Genome Research*, 20: 646–654.
- Zhang H, Ni L, Liu Y, Wang Y, Zhang A, Tan M, Jiang M (2012) The C2H2-type Zinc Finger Protein ZFP182 is Involved in Absciscic Acid-Induced Antioxidant Defense in Rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 54 (7): 500–510.
- Zhang Q (2007) Strategies for developing gree super rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:1642-16409.

Zhou L, Jang JC, Jones TL, Sheen J (1998) Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an Arabidopsis glucose-insensitive mutant. Proc. Natl. Acad. Sci., v. 95, p. 10294–10299, 1998.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão dos genes relacionados à resposta ao déficit hídrico em duas cultivares brasileiras de arroz de terras altas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar experimento de déficit hídrico com as cultivares Douradão, tolerante à seca, e Primavera, sensível à seca, em condições normais de irrigação e submetidas ao déficit hídrico;
- Isolar o RNA total de folhas e raízes de plantas de arroz das duas cultivares submetidas aos diferentes tratamentos;
- Obter sequências do transcriptoma de plantas de arroz via técnica de RNA-seq;
- Identificar os genes diferencialmente expressos entre o tratamento de déficit hídrico e tratamento-controle (condições normais de irrigação), entre os genótipos Douradão e Primavera, e entre o tecido foliar e radicular;
- Proceder a anotação dos genes diferencialmente expressos utilizando como referência os bancos de dados de sequência públicos de arroz;
- Anotar com base no genoma de *Arabidopsis thaliana* genes não anotados no genoma de arroz (análise de homologia).
- Validar o nível de expressão gênica de alguns transcritos identificados via RNA-seq por meio da metodologia de RT-qPCR.

4. ARTIGO 1

EXPRESSION OF DROUGHT TOLERANCE GENES IN TROPICAL UPLAND RICE CULTIVARS (*Oryza sativa*)

Ricardo Diógenes Dias Silveira^{a,d}, Fernanda Raquel Martins Abreu^{b,d}, Sujan Mamidi^c, Phillip E. McClean^{c,f}, Rosana Pereira Vianello^{a,d}, Anna Cristina Lanna^d, Newton Portilho Carneiro^e, Claudio Brondani^{a,b,d}

^aUniversidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, CEP 74001-970 Goiânia, GO, Brazil.

^bUniversidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia, CEP 74001-970 Goiânia, GO, Brazil.

^cNorth Dakota State University, Department of Plant Sciences, Fargo, ND 58108-6050, USA.

^dEmbrapa Arroz e Feijão, Rodovia GO- 462, Km 12, Caixa Postal 179, CEP 75375-000, Santo Antônio de Goiás, GO, Brazil.

^eEmbrapa Milho e Sorgo, Rodovia MG – 242, Km 45, Caixa Postal 285, CEP 35701-970, Sete Lagoas, MG, Brazil.

^fNorth Dakota State University, Genomics and Bioinformatics Program, Fargo, ND 58108-6050, USA

4.1. ABSTRACT

Drought stress, particularly during the reproductive stage, contributes to serious yield loss in tropical upland rice (*O. sativa*). Gene expression induced in response to drought stress of two contrasting Brazilian upland cultivars, the drought-tolerant Douradão and the drought-sensitive Primavera, was analyzed in the present study. Transcriptome analysis by RNA-seq identified 27,618 transcripts in the Douradão cultivar, with 24,090 (87.2%) homologous to the rice database. Of the 27,221 transcripts identified in the Primavera cultivar, 23,663 (86.9%) showed homology to the rice database. Gene-expression analysis between the control and water-deficient treatment revealed 493 differentially expressed genes in Douradão and 1,154 differentially expressed genes in the Primavera cultivar. Genes exclusively expressed under drought were identified for Douradão, including two genes of particular interest coding for the protein peroxidase precursor, which is involved in three distinct metabolic pathways: methane metabolism, phenylalanine metabolism and phenylpropanoid biosynthesis. When the genes that were differentially expressed between the two drought-exposed cultivars were compared, 2,314 genes were differentially expressed. Most of the genes identified in Douradão activate metabolic pathways responsible for production of secondary metabolites and genes coding for enzymatically active signaling receptors, such as protein kinases. Quantitative PCR validation showed that most of the gene expression was in agreement with computational prediction of these transcripts. The transcripts identified in this study will define molecular markers in order to identify Cis-acting elements to search for allelic variants of these genes through analysis of polymorphic SNPs in genebank accessions of upland rice, aiming at the development of cultivars with the best combination of these alleles, and which will result in materials with high yield potential in the event of drought in the reproductive phase.

4.2. INTRODUCTION

The future of global agriculture will encounter great challenges in relation to global warming, water shortages, demographic growth and degradation of the environment in addition to a projected increase in agricultural demand of 70% by 2050 to keep up with the growth of the world's population (Godfray et al., 2010). Rice (*Oryza sativa* L.) is part of this scenario because it is the most highly consumed cereal grain around the world (Huang et al., 2010). Technical advancements brought about by genomics may result in an increase in rice productivity, even under suboptimal crop conditions, such as the occurrence of drought periods. The area cultivated with rice is estimated to be approximately 164 million hectares, with production of 722 million tons per year, and 75% of this area is in floodplain systems (FAO, 2013). With a reduction in crop water availability due to the cost of electrical energy or due to competition for human consumption, dry-land cultivation systems may constitute a viable alternative. In Brazil, although upland rice fields represent 55% of the total cultivated area, their production barely represents 25% of total Brazilian production (Santos and Rabello, 2008).

Rice is sensitive to drought conditions mainly during its reproductive phase, when even moderate stress can drastically reduce yield (Hsiao, 1982). As a result of drought stress, a number of genes are expressed in these plants, triggering a complex network of responses, including the perception and recognition of stress signals, the activation of adaptive programs and even the activation of genes involved in the downstream response (Boudsocq and Laurière, 2005). The products of stress-induced genes can be classified in two groups, one comprising genes that directly protect the plant against the environmental stressor, such as the biosynthesis of various osmoprotectants, proteins abundant during late embryogenesis, chaperones and detoxification enzymes; and a second group comprised of genes regulating gene expression and signal transduction in response to stress, including transcription factors, protein kinases and proteins involved in phosphoinositide metabolism (Seki et al., 2003; Chaum et al., 2012; Ding et al., 2013). Among the noteworthy mechanisms for physiological responses are the relative reduction in water content, pigment degradation, decrease in stomatal conductance, reduction of internal CO₂ concentration, activation of respiration and reduction in net photosynthesis rate and cellular growth (Chaves and Oliveira, 2004; Reddy et al., 2004; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Cattivelli et al., 2008).

Since tolerance to drought stress is multigenic and quantitative in nature (Collins et al., 2008), understanding the key molecular mechanisms for advanced selective breeding purposes is a massive challenge. Plant responses to drought consist of morphological, physiological and biochemical changes that decrease plant exposure to stress and/or limit

damage and facilitate recovery of impaired systems (Potters et al., 2007). Understanding abiotic stress responses in plants is difficult due to the complexity, interrelationship, and variability of mechanisms and molecules involved. However, it is important to understand the mechanisms by which tolerant cultivars respond to stress in order to select genes that might be useful to rice breeding programs (Recchia et al., 2013).

Gene-expression analysis in rice exposed to drought-stress conditions has been extensively studied using diverse technologies, such as DNA microarrays (Schena et al., 1995) and RNA-seq, based on the massive sequencing of cDNA using next-generation sequencing technology (Nagalakshmi et al., 2008). Studies emphasizing the transcriptome of *Oryza sativa* increase the possibilities of discovery and exploration of novel genes and expand opportunities for detailing previously described genes that may be the target of more specific functional analyses, thus effectively contributing to increase plant tolerance to drought-induced stress. While hundreds of genes involved in the drought-stress response have been identified in rice, many of which are well characterized (Ito et al., 2006; Xiao et al., 2007), the function of many genes remains unknown (Wang et al., 2011). A considerable portion of these studies is focused on the identification of genes *upregulated* during drought, comparing the gene-expression profiles of drought-tolerant and drought-sensitive cultivars under normal irrigation conditions vs. water-deficient conditions (Zheng et al., 2004; Wang et al., 2011).

Rabbani et al. (2003) identified 75 differentially expressed genes in the subspecies *japonica* in drought conditions using microarray technology. Similarly, Moumeni et al. (2011) compared genes that were differentially expressed under water-deficient conditions in roots of isogenic lines of the subspecies *indica* with different drought-tolerance profiles and identified genes involved in the production of secondary metabolites, amino acid metabolism, stimuli response, defense response, transcription and signal transduction. Studies performed with RNA-seq technology have the advantage of detecting even genes with low levels of expression (Bellin et al., 2009; Wang et al., 2009) and those not detected by commercial gene expression microarrays (Civelek and Lusi, 2013). When considering rice, these studies address questions such as embryo development (Xu et al., 2012; Gao et al., 2013) and responses to biotic stimuli (Kawahara et al., 2012).

Understanding the responses to drought in upland rice is important to plan breeding strategies to develop cultivars more tolerant to this stress. The present work advances the knowledge of the genetic mechanisms involved in drought tolerance for tropical upland rice varieties, from the analysis of the transcriptome of two contrasting cultivars in relation to water deficit. Sequencing and analysis of gene expression were derived from leaf tissues of

the reproductive stage, which affects more critically the rice yield. Most transcripts validated by qRT-PCR corresponded to the respective level of expressions estimated by RNA-seq.

4.3. MATERIALS AND METHODS

4.3.1. Plant Materials and experimental treatment

Drought-tolerant Douradão upland rice cultivar and drought-sensitive Primavera cultivar were used to screen their performance under drought treatments. These cultivars are from the subspecies japonica and were chosen based on their different physiological characteristics (Heinemann et al., 2009) and due to their use as parental lines in breeding programs of Embrapa (Breseghello et al., 2008). The Douradão cultivar was developed in 1989 through a partnership between the Agricultural Research Company of Minas Gerais (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, EPAMIG) and the Embrapa National Center for Research on Rice and Beans (Centro Nacional de Pesquisa de Arroz and Feijão, CNPAF). This cultivar was produced from the crossing IAC 25/63-83 and presents a short cycle of 95 days on average (Soares et al., 1989). Primavera cultivar is considered semi-precocious due to the cycle of 115 days. This latter cultivar was developed in 1987 by EPAMIG by crossing the parental lines IRAT 10 and LS 85-158 (Soares et al. 2001).

The drought-tolerance experiment was conducted in a greenhouse at Embrapa CNPAF (Santo Antônio de Goiás, Brazil), in the growing season 2010/2011. For the experiment, approximately 10 seeds of the cultivars were sown in pots, and after germination, five randomly chosen plants were maintained in each pot. Water restriction was applied in two periods: in period 1 the interruption in irrigation occurred between vegetative stage V3 (according classification of Counce et al., 2000), (17 DAS for Douradão and 15 DAS for Primavera) and V6 (35 DAS for Douradão and 34 DAS for Primavera); and in the period 2, the interruption in irrigation begun in reproductive stage R3 (panicle emergence – 55 DAS for Douradão and 64 DAS for Primavera) through R6 (milky grain – 66 DAS for Douradão and 75 DAS for Primavera). During these two periods, four irrigation regimes were used: Group A (control group) – a set of plants with the availability of water set at field capacity (FC); Group B – a set of plants exposed to 70% of FC; Group C – a set of plants exposed to 50% of FC; and Group D – a set of plants exposed to 30% of FC. Once 50% of the plants from each cultivar reached vegetative state V3 (the beginning of the first cycle of water deficiency), irrigation was interrupted so that the different water regimes could be reached in the soil until vegetative stage V6. Irrigation continued normally for the set of plants exposed to the second period of water deficiency until more than 50% of plants in this set of pots

reached reproductive stage R3, at which time water restriction was enforced and lasted until stage R6.

The experimental design was a split-plot randomized block. Six replicates were used for each cultivar and for each cycle of water deficiency. Of the six replicates, three pots were used for sampling of the plant material, and three pots were maintained until the end of the rice cycle to determine the productivity. Replicates were established according to the water regime, genotype and water-deficiency cycle, for a total of two plots (Period 1 and 2) with 48 pots each. To establish the amount of water per pot for each water regime, the field capacity (FC) of the soil was determined, defined as the maximum water content retained by the soil after the excess has been drained (Mello et al., 2002), recording the maximum mass of the pot (soil + water) as well as the water volume corresponding to 100% of FC. The mass was obtained with an electronic scale (Marte, LC20 model), and the water amount added was measured using a graduated cylinder. The duration of the stress varied with the severity of the treatment: for the plants exposed to 70% of FC, the duration of the stress was 10 days; for the plants exposed to 50% of FC, the duration was 6 days; and for the plants exposed to 30% of FC, the duration was 1 day.

At the end of the water-restriction period, the stressed plants were irrigated again by the end of the cultivation cycle to determine their productivity (grams of grains per pot) to evaluate the severity of water deprivation (Campos et al., 2004). To analyze the transcriptome, the developmental stage of the rice plant most sensitive to water restriction was chosen, that is, the stage in which the plants' productivity reduced most drastically. Next, with the objective of defining the appropriate water treatment that could induce the molecular responses to water deficit, we used as parameter the irrigation treatment that would induce a reduction in plant productivity greater than 50%. Average values across treatments were compared according to Tukey's test, using the ExpDes statistical package of v.2.13.2 of the R software (R Development Core Team, 2010).

4.3.2. RNA isolation

To analyze the transcriptome, samples of leaf tissue of the control and drought-stressed plants were collected on the last day of water restriction of each water-deprivation cycle, immediately placed in liquid nitrogen and stored at -80°C freezer. Apical leaves (the last fully extended leaf from the top to the base of the main stem) were used as the plant material for total RNA extraction. This extraction was performed with a PureLink® RNA Mini Kit (Ambion®) according to the manufacturer's instructions. Total RNA was extracted from leaves pooled from three plants of different replicates with the goal of increasing the

isolation efficiency of expressed sequences (mRNA) related to responses drought tolerance. In the end, the total RNA was resuspended in RNase-free water and stored at -80°C. The RNA quantity and quality were evaluated with NanoVue™ (GE Healthcare UK Ltd, England) and BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies CA, USA), respectively.

4.3.3. RNA-seq and Bioinformatics analysis

RNA samples were sent to the Beijing Genomics Institute (BGI). A total of four cDNA libraries were developed, that is, two cDNA libraries for each sample, one for the water-deficiency treatment and the other one for the control treatment, followed by sequencing on the Illumina HiSeq™ 2000 platform. The collected data were filtered by BGI and submitted for alignment and mapping against a rice reference genome (*Oryza sativa ssp. japonica*, Nipponbare- MSU Rice Genome version 7.0) using the software TopHat, version 2.04 (Trapnell et al., 2012). The software package Cufflinks 2.0.01 (Trapnell et al., 2012) was used to build the assemblies for each library and to identify differentially expressed genes (DEG). The reads for each of the samples for the four cDNA libraries were normalized taking into account the size of the genes, the size of the library (sample) and the number of reads of each gene, considering the abundance of reads per kilobase of regions expressed for every million mapped reads (reads per kilobase of exon model per million mapped reads; Mortazavi et al., 2008). Two tests were used to consider the differences in gene expression among the genes, for which the same transcript was required to be present in both of the samples to be compared, which were q values ≤ 0.001 and $|\log_2 \text{ratio}| > 2$. Common and exclusive DEG with respect to treatments and genotypes were considered.

The reads were annotated using the BLASTX algorithm (Altschul et al. 1997) and cross-referenced with the non-redundant rice protein database using default settings in the tool blast+ from the NCBI C++ Toolkit package (NCBI). With the goal of attributing a putative function to the global set of transcripts using *gene ontology* (GO) terms, we used the tool BLAST2GO on the BLASTX hits (Conesa et al., 2005). The parameters adopted for the annotation were the default settings for BLAST2GO (an E-value $< 1.0E-6$ and annotation cut-off =20), which were used to functionally categorize the transcript of GO categories. Differentially expressed genes were analyzed using the tool agriGO (Zhou et al., 2010), which has a web interface (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO>) and is integrated in the GO database with an emphasis on plant species. A GO enrichment analysis was performed with the tool *Singular Enrichment Analysis* (SEA, <http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/analysis.php>) with a false discovery rate (FDR) and P value ≤ 0.05 . Additionally, differentially expressed

genes were placed in metabolic pathways using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), available at <http://www.genome.jp/kegg/>.

From the differentially expressed genes between Douradão and Primavera, it was performed a search for potential transcription factors. To identify the transcription factors, hits derived from the alignment (BLASTX) were cross-referenced with the transcription-factor database *Plant Transcription Factor Database* (PlnTFDB; Perez-Rodriguez et al. 2009) available at <http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v3.0/>.

4.3.4. Reverse transcription quantitative PCR validation of RNA-seq

Ten genes were selected for validation using the reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) (Supplementary file 1, Table S1). Primers set for each gene were designed in the span exon-exon junctions by the OligoPerfect™ Designer (<http://tools.lifetechnologies.com/content.cfm?pageid=9716>). The total RNA was treated with DNase I (Invitrogen™) to avoid DNA contamination. One microgram of RNA was reverse transcribed using the Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen™) with the random primer according to the manufacturer's instruction. RT-qPCR experiments were conducted using Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen™) and were carried out on a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®). The reactions conditions were: 50°C for 2 min, 95°C for 2 min followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 30s. The total volume of 20µl in each tube contained 1µl of cDNA (50ng/µl), and the volume of water and reverse and forward primers were variable for each gene, according with the adjustment made for optimal concentration of each primer (Supplementary file 2, Table S2 and S3). All RT-qPCR reactions were performed in triplicate, and the results were analyzed with the DataAssist™ Software (Life Technologies) based on the delta-delta-Ct method. A heat dissociation curve (60°C – 95°C) following the final cycle of the PCR was checked to test the specificity of the PCR amplification. The detection threshold cycle for each reaction was normalized against the expression level of the rice reference genes Actin (ACTX3), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and Eukariote Elongation factor (EEFα) genes (Primer sequences, see Supplementary file 1, Table S1).

4.4. RESULTS

4.4.1. RNA-seq experiments

The largest reduction in productivity was observed when the water restriction was applied during the reproductive phase (the second period of water restriction) rather than during the vegetative phase (the first period of water restriction), which was expected, given

the greater opportunity for the rice plant to recover from the water deficit during its initial phase of development (Table 1). After the definition of the drought period, we selected the water treatments that induced a reduction in productivity greater than 50% in relation to the controls. For the Douradão cultivar, the greatest difference in productivity (83.99% reduction) was observed in the treatment with 30% of FC; while for Primavera, the treatment with the greatest difference was that of 50% of FC. These results confirm the higher tolerance of the Douradão cultivar compared to the Primavera cultivar.

Table 1. Average yield (g grain pot⁻¹) and reduced yield in plants of the upland rice cultivars Douradão and Primavera, grown under optimal watering (100% water availability) and under drought stress conditions (70, 50 and 30% water availability).

Treatment	Vegetative stage				Reproductive stage			
	Douradão g grain pot ⁻¹	Reduction (%)	Primavera g grain pot ⁻¹	Reduction (%)	Douradão g grain pot ⁻¹	Reduction (%)	Primavera g grain vaso ⁻¹	Reduction (%)
100% of FC	26.16 ^a	--	16.64 ^a	--	28.54 ^a	--	18.59 ^a	--
70% of FC	23.14 ^{ab}	11.55	11.88 ^a	28.60	25.46 ^a	10.80	16.15 ^{ab}	13.12
50% of FC	20.90 ^{ab}	20.10	11.70 ^a	29.68	18.64 ^a	34.69	8.20 ^b	55.9
30% of FC	14.56 ^b	55.65	3.46 ^b	79.2	4.57 ^b	83.99	0 ^c	100

The letters a and b indicate significant difference (Tukey test) between the average yield in relation to water treatments for each genotype at each stage of development. Mean comparison refers to the treatment of each genotype, i.e. the mean values were compared within each data column. Yield reduction, in percentage, is related to the decrease in yield of drought stressed plants compared to the yield of control plants.

RNA-seq from all the libraries generated 201,509,058 paired-end (PE) reads of 100 bp. The total coverage of reads in the rice genome was approximately 46x, and the coverage in relation to DNA coding sequences (CDS) was approximately 200x. The average coverage of the rice genome and the average coverage of CDSs were 11.65x and 49.81x, respectively (Table 2). The reads mapped and aligned with the program TopHat totaled 85.02% of the total number of sequenced reads, and by using an alignment of sequences from each library it was possible to make comparisons between samples to identify differentially expressed genes. For the Douradão cultivar, of the 27,618 sequenced transcripts, 24,090 (87.2%) were similar to the Nipponbare reference genome (MSU Rice Genome version 7.0), while for Primavera, 23,663 transcripts (86.9%) were similar to Nipponbare.

Table 2. Description of sequenced libraries (RNA-seq) from leaf tissues.

Libraries	Number of reads	Number of mapped reads	~ Coverage in CDS region (91MB)	~ Coverage in the genome (389MB)
Douradão 100%	51,193,382	46,173,215	50.74	11.87
Douradão 30%	51,619,472	45,822,301	50.35	11.78
Primavera 100%	49,164,344	44,100,840	48.47	11.33
Primavera 50%	49,531,860	45,214,807	49.68	11.62
Total	201,509,058	181,311,163	199.24	46.6
Average	50,377,265	45,327,790	49.81	11.65

4.4.2. Global Gene Ontology Annotation

A functional classification of the sequences from all four libraries according to GO identified 26,159 genes across all the libraries (Figure 1), of which 17,270 (66%) were annotated and distributed in three main functional categories: biological process, with 15 subcategories; cellular component, with 12 subcategories; and molecular function, with 8 subcategories (Figure 1). For biological process, the three subcategories with the greatest number of genes were metabolic process (10,316 genes), cellular process (9,932 genes) and response to stimulus (3,598 genes). For cellular component, the three subcategories with the greatest number of genes were cell (11,904 genes), cell part (10,765 genes) and organelle (6,881 genes). For molecular function, the three subcategories with the greatest number of genes were binding (8,077 genes), catalytic activity (7,256 genes) and transcription regulatory activity (1,203 genes). From the 26,159 genes, 6,720 were placed in 126 metabolic pathways that coded for 546 different types of enzymes (Table 3).

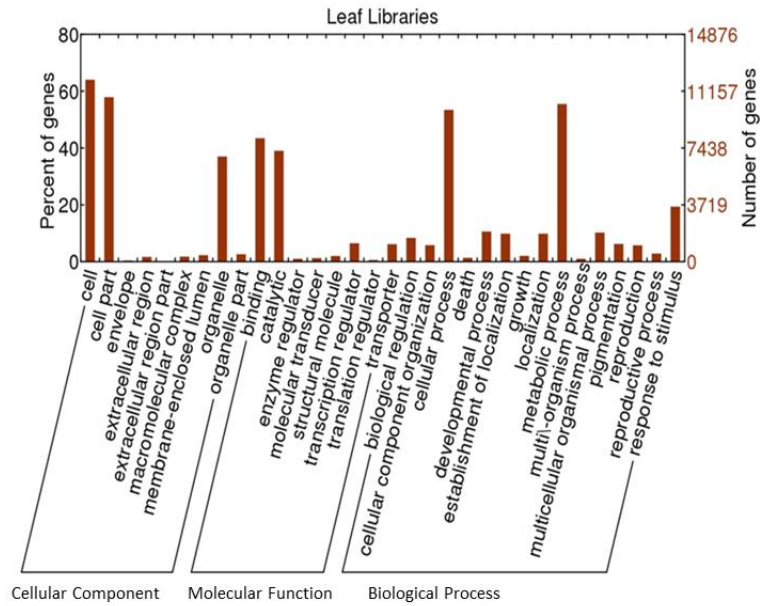


Figure 1. Annotation with Gene Ontology terms by Blast2GO of all the sequences identified in libraries from leaf tissues of Douradão and Primavera.

4.4.3. Differential Gene Expression and Functional Annotation

In the leaf tissues of the tolerant cultivar Douradão, it was identified 493 differentially expressed genes between the control treatment and the 30% of FC treatment. Of this total, 374 genes were *upregulated*, and 119 genes were downregulated with water-deficiency treatment (Figure 2). For the susceptible cultivar Primavera, more than twice as many DEG (1,154) were identified between the control and 50% of FC treatment. Of this total, 752 genes were *upregulated* and 402 were downregulated upon water deficiency (Figure 2).

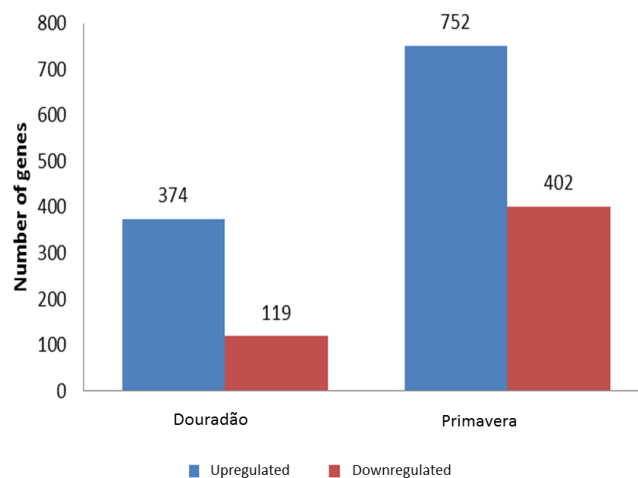


Figure 2. Number of differentially expressed genes between the control (100% FC) and drought treatments in the Douradão cultivar (30% of FC) and Primavera cultivar (50% FC).

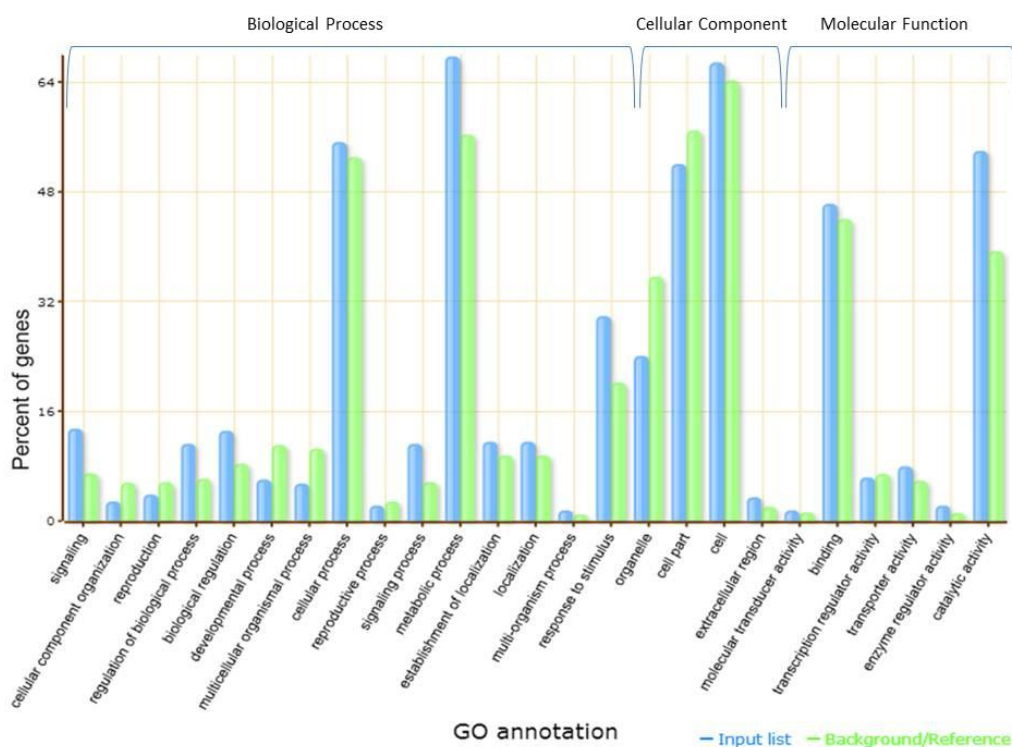


Figure 3. Classification of differentially expressed genes in Douradão by Gene Ontology terms in 23 subcategories considering the three major functional categories: Biological Process, Cellular Component and Molecular Function.

From the 493 differentially expressed genes in Douradão, 454 (92.08%) were similar to proteins, and 311 genes (63.1%) were distributed across 28 different functional categories of which the three main sets were enriched ($FDR \leq 0.05$ and $p \leq 0.05$): biological process, molecular function and cellular component (Figure 3). In the biological process five subcategories were enriched: response to stimulus (GO:0050896; 93 genes, 29.9%); signaling (GO:0023052; 2 genes, 13.5%); cellular processes (GO:0050794; 35 genes, 11.25%); signaling processes (GO:0023046); and in biological regulation (GO:0065007; 41 genes, 13.18%). Additionally, 168 genes enriched in the category molecular function had a catalytic activity (GO:0003824).

Table 3. Metabolic pathways with the largest number of sequences annotated by KEGG.

Pathway	Number of annotated sequences	Pathway ID
Purine metabolism	457	ko00230
Starch and sucrose metabolism	313	ko00500
Methane metabolism	209	ko00680
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	182	ko00520
Thiamine metabolism	168	ko00730
Pyrimidine metabolism	166	ko00240
Phenylalanine metabolism	152	ko00360
Galactose metabolism	139	ko00052
Glycolysis / Gluconeogenesis	139	ko00010
Phenylpropanoid biosynthesis	126	ko00940
Glycerolipid metabolism	119	ko00561
Glutathione metabolism	118	ko00799
Carbon fixation in photosynthetic organisms	114	ko00710
Cysteine and methionine metabolism	110	ko00270
Pentose phosphate pathway	102	ko00030
Glycerophospholipid metabolism	99	ko00564
alpha-Linolenic acid metabolism	91	ko00592
Pyruvate metabolism	88	ko00620
Nitrogen metabolism	86	ko00910
Oxidative phosphorylation	86	ko00190

From the 1,154 genes differentially expressed in Primavera, 973 (84%) were similar to proteins, and 677 (69.6%) were annotated in 27 subcategories within the three principal functional categories (Figure 4). In the subcategory response to stimulus (GO:0050896), three subcategories were identified: response to stress (GO:0006950; 134 genes, 19.8%) (19.8%); response to abiotic stimulus (GO:0009628; 93 genes, 13.74%); and response to endogenous stimulus (GO:0009719; 68 genes, 10%).

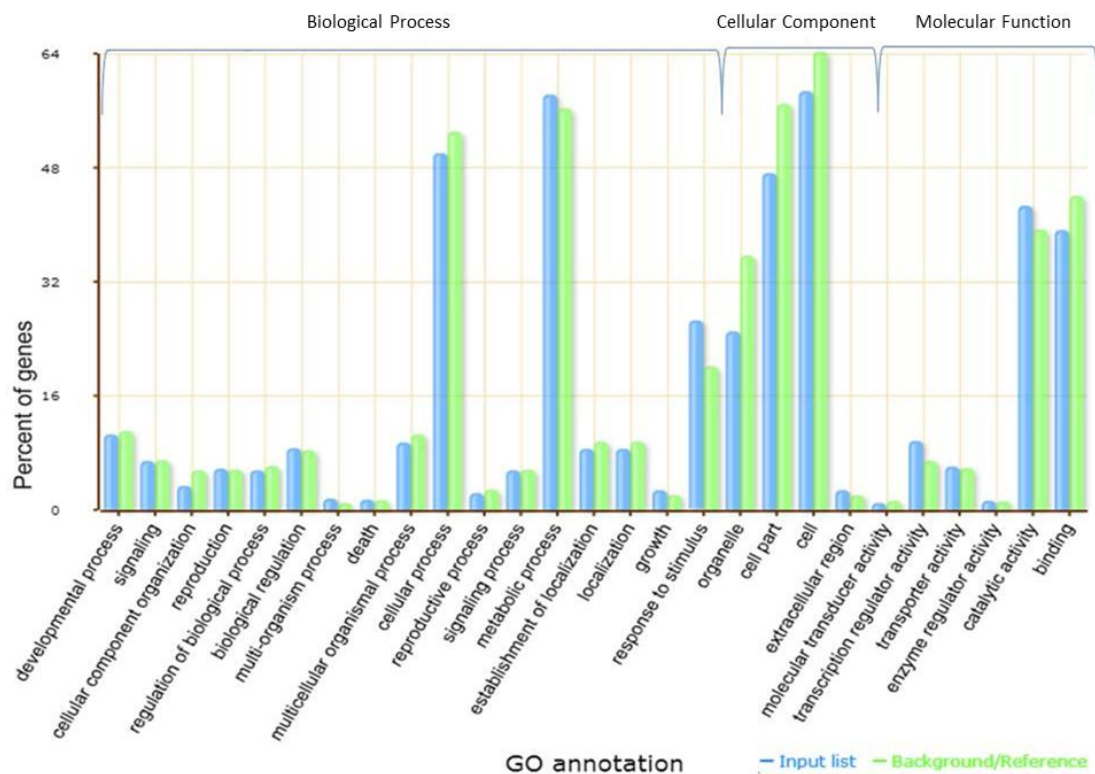


Figure 4. Classification of differentially expressed genes in Primavera by Gene Ontology terms in 27 subcategories considering the three major functional categories: Biological Process, Cellular Component and Molecular Function.

From the 374 genes *upregulated* by drought in the Douradão cultivar, 255 (68%) were annotated according to GO terms (Figure 5). In the biological process category, 17 subcategories were identified, with metabolic process (178 genes), cellular process (142 genes) and response to stimulus (103 genes). From the total genes with functions attributed to response to stimulus, 65 genes were related to the subcategory response to stress, with only six genes *upregulated* in the drought treatment (all with $|\log_2 \text{ratio}| = 1.80\text{E}+30$). These genes encode peroxidase precursor (LOC_Os04g55740.1 and LOC_Os12g02060.1), CHIT4 - Chitinase family protein precursor (LOC_Os03g30470.1), disease resistance-responsive (dirigent-like protein) family protein (LOC_Os07g44250.1), CHIT7 - Chitinase family

protein precursor (LOC_Os06g51050.1) and NB-ARC domain-containing protein (LOC_Os05g15040.4). Of these proteins, the protein peroxidase precursor (EC: 1.11.1.7) is the only one annotated in the KEGG database and described as actively participating in three different metabolic pathways: methane metabolism, phenylalanine metabolism and phenylpropanoid biosynthesis. Thirty-five of 42 (83.3%) signaling genes were detected as *upregulated* after the drought treatment, and from these, five were identified only in the drought treatment. Two of these genes were, additionally to category biological potential, also classified in the subcategory response to stress: CHIT7 – chitinase family protein precursor (LOC_Os06g51050.1) and CHIT4 – chitinase family protein precursor (LOC_Os03g30470.1). Three other *upregulated* genes, ABC transporter ATP-binding protein (LOC_Os01g74470.1), the receptor-like protein kinase precursor (LOC_Os02g01800.1) and the receptor-like protein kinase HAIKU2 precursor (LOC_Os11g12560.1), have not been annotated to a rice metabolic pathway by KEGG.

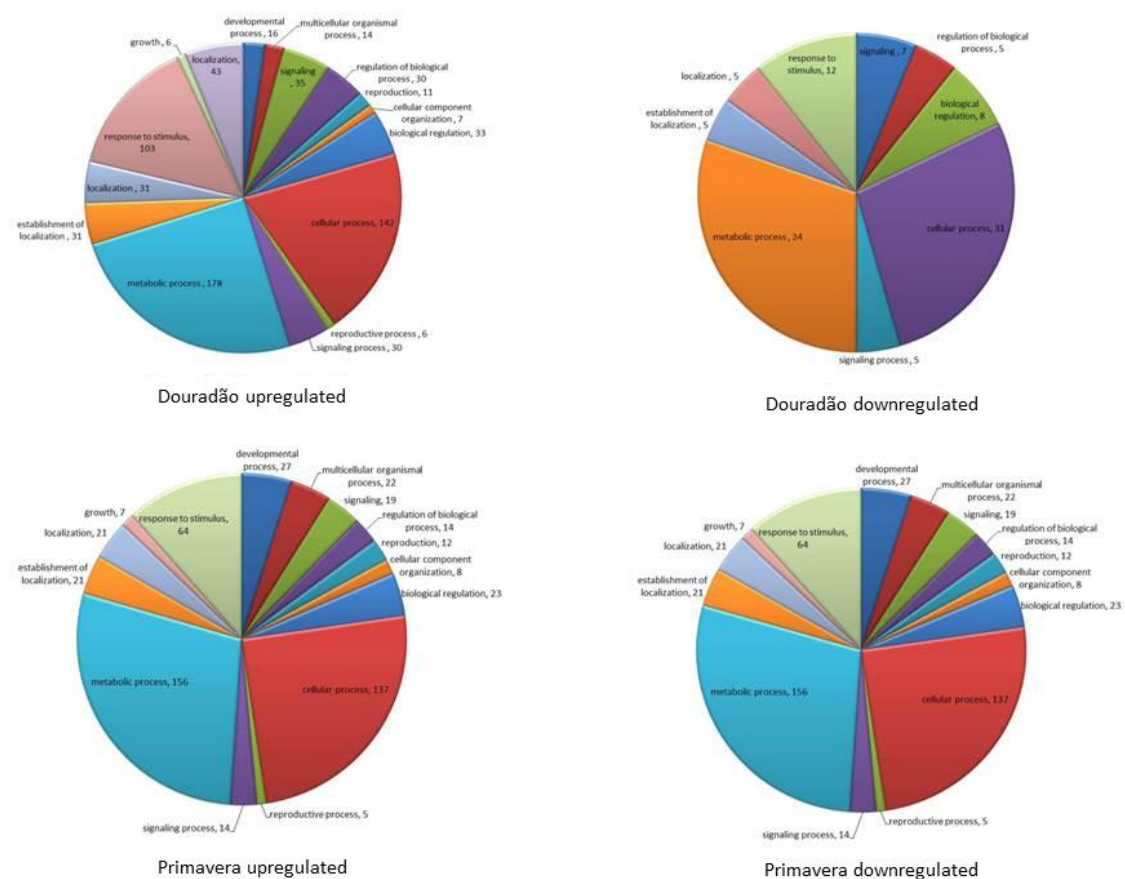


Figure 5. Distribution of genes up- and downregulated under drought stress.

In Primavera, 428 out of 752 *upregulated* genes were previously annotated in rice (Figure 5). A total of 17 biological process subcategories were identified, of which the three with the higher number of genes were metabolic process (240 genes), cellular process (202 genes) and response to stimulus (116 genes). In response to stimulus subcategory, 93 genes were involved in response to stress, and from these, nine genes were *upregulated* only in the drought treatment. These genes were: uncharacterized glycosyltransferase (LOC_Os01g07530.1); early light-induced protein, chloroplast precursor (LOC_Os01g14410.1); HSP20/alpha crystallin family protein (LOC_Os03g15960.1); CBS domain-containing membrane protein (LOC_Os03g63940.1); protein kinase (LOC_Os05g44030.1); dehydrogenase E1, a component domain-containing protein (LOC_Os06g13720.1); HVA22 (LOC_Os08g36440.1); annexin (LOC_Os09g20330.1); and tyrosine protein kinase domain-containing protein (LOC_Os09g27010.1). Only two of these proteins were annotated by KEGG as belonging to a metabolic pathway: LOC_Os01g07530.1 (stachyose biosynthesis) and LOC_Os06g13720.1 (pyruvate metabolism, citrate cycle/TCA cycle, glycolysis/gluconeogenesis and butanoate metabolism). In cellular process, the abscisic aldehyde oxidase (LOC_Os03g57690.1) was *upregulated* and is associated to the ABA biosynthesis.

From 2,519 genes differentially expressed between control treatments of Douradão and Primavera, 983 were common to the 3,297 genes differentially expressed considering the drought treatments (Figure 6). Subtracting the common genes, 2,314 differentially expressed genes were identified (978 *upregulated* and 1,336 downregulated in Douradão). From this total, 1,171 were annotated with GO terms and distributed across 26 functional subcategories, and the three main groups were biological process, molecular function, and cellular component (Figure 6). Within these groups, the categories with the higher number of genes were: 1) catalytic activity (GO:0003824) with 551 genes, of which 155 have functional kinase activity (GO:0016301), and 2) response to stimulus (GO:0050896) with 288 genes, 221 of which are related to the response to stress (GO:0006950).

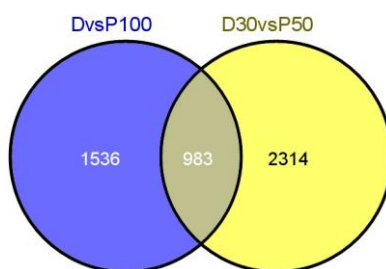


Figure 6. Venn diagram representing the number of differentially expressed genes comparing Douradão and Primavera. DvsP 100 – differentially expressed genes in the controls, D30vsP50 – differentially expressed genes under drought conditions.

Among the 978 genes *upregulated* in Douradão, 324 were only expressed in the drought treatment, with the predominance of genes grouped in the most enriched subcategories: response to stress (46 genes) and kinase activity (34 genes). From the 46 genes related to response to stress, five were identified in metabolic pathways in the KEGG database, of which three expressed the previously identified protein peroxidase precursor (LOC_Os07g48050.1, LOC_Os01g73200.1 and LOC_Os12g02060.1), and two were annotated as response to stress, pleiotropic drug-resistance protein (LOC_Os01g42380.1), identified in the purine metabolism pathway, and T-complex protein (LOC_Os03g04970.1), involved in the glyoxylate and dicarboxylate metabolism pathway. None of the 34 genes identified in the tolerant genotype under the subcategory kinase activity were annotated by the KEGG database; however, important genes involved in cellular signaling during the stress response in the Douradão cultivar were identified (Table 4). The 10 DEG from Douradão with increased expression when compared the drought treatment and the control treatment, as well as 10 DEG with highest expression when compared the drought treatment of Douradão and the drought treatment of Primavera are shown in Table 5.

Table 4. Unique genes in Douradão under drought stress annotated in the kinase activity term by Gene Ontology.

Gene Model	Protein Name	FPKM	log2 (Fold Change)
LOC_Os02g12130.1	cysteine-rich receptor-like protein kinase 35 precursor	13.3946	1.8E+35
LOC_Os01g66760.1	inactive receptor kinase At2g26730 precursor	0.788876	1.8E+35
LOC_Os06g10790.1	lectin-like receptor kinase	4.54422	1.8E+35
LOC_Os07g04010.1	lectin-like receptor kinase	1.48381	1.8E+35
LOC_Os02g40130.1	leucine-rich	1.09946	1.8E+35
LOC_Os02g56370.1	OsWAK20 - OsWAK receptor-like protein kinase	0.909119	1.8E+35
LOC_Os04g29580.1	OsWAK37 - OsWAK short gene	0.804394	1.8E+35
LOC_Os04g29930.1	OsWAK42 - OsWAK receptor-like protein kinase	0.880981	1.8E+35
LOC_Os04g29960.1	OsWAK43 - OsWAK receptor-like protein kinase	2.00163	1.8E+35
LOC_Os04g30160.1	OsWAK46 - OsWAK receptor-like protein kinase	0.811559	1.8E+35
LOC_Os07g31210.1	OsWAK70 - OsWAK receptor-like cytoplasmic kinase OsWAK-RLCK	4.04916	1.8E+35
LOC_Os06g47650.1	phytosulfokine receptor precursor	4.33848	1.8E+35
LOC_Os01g02400.1	protein kinase domain containing protein	15.7548	1.8E+35
LOC_Os01g02420.1	protein kinase domain containing protein	1.30291	1.8E+35
LOC_Os11g44500.1	protein kinase domain containing protein	96.4635	1.8E+35
LOC_Os11g46880.1	protein kinase domain containing protein	59.7802	1.8E+35
LOC_Os04g01890.1	protein kinase	1.29413	1.8E+35
LOC_Os11g44430.1	protein kinase	9.31762	1.8E+35
LOC_Os11g47180.1	receptor-like protein kinase 2 precursor	3.23605	1.8E+35
LOC_Os02g13430.1	receptor-like protein kinase 5 precursor	12280.7	1.8E+35
LOC_Os11g47210.1	receptor-like protein kinase 5 precursor	5.32406	1.8E+35
LOC_Os11g12560.1	receptor-like protein kinase HAIKU2 precursor	3.03439	1.8E+35
LOC_Os01g02690.1	resistance-related receptor-like kinase	1.39273	1.8E+35
LOC_Os01g04570.2	Ser/Thr protein kinase	10.051	1.8E+35
LOC_Os04g54120.1	serine/threonine-protein kinase receptor precursor	9.45247	1.8E+35
LOC_Os05g16430.1	SHR5-receptor-like kinase	0.922758	1.8E+35
LOC_Os08g13870.1	S-locus lectin protein kinase family protein	14026.5	1.8E+35
LOC_Os07g35004.1	TKL_IRAK_DUF26-la.4 - DUF26 kinases have homology to DUF26 containing loci	1.73106	1.8E+35
LOC_Os07g35390.1	TKL_IRAK_DUF26-lc.17 - DUF26 kinases have homology to DUF26 containing loci	1.63624	1.8E+35

Table 5. List with the 10 genes validated by RT-qPCR. The FPKM values are related to the drought treatment for Douradão (D 30) and Primavera (P 50). The Log2 values are related to the gene expression differences between the two cultivars.

Gene Model	Protein Name	FPKM (D 30)	FPKM (P 50)	Log2 (fold change)
LOC_Os01g74470.1	ABC transporter, ATP-binding protein	8.73E-01	0	1.80E+35
LOC_Os03g04060.1	CHIT16 - Chitinase family protein precursor	399.033	75.1217	2.4092
LOC_Os06g51060.1	CHIT8 - Chitinase family protein precursor	138.455	20.9345	2.72546
LOC_Os06g13720.1	dehydrogenase E1 component domain containing protein	4.99062	86.9669	-4.12317
LOC_Os01g71350.1	glycosyl hydrolases family 17	61.8972	2.59894	4.57388
LOC_Os01g73200.1	peroxidase precursor	2.75E+00	0	1.80E+35
LOC_Os12g02060.1	peroxidase precursor	1.31E+00	0	1.80E+35
LOC_Os01g42380.1	pleiotropic drug resistance protein	2.18E+00	0	1.80E+35
LOC_Os03g04970.1	T-complex protein	1.60E+00	0	1.80E+35
LOC_Os01g07530.1	uncharacterized glycosyltransferase	12.2488	52.9269	-2.11136

4.4.4. Transcription Factors Identification

Twelve TF families were identified from the 17 TF differentially expressed genes between the drought and control treatments of Douradão, whereas 14 TF families were identified from 41 TF differentially expressed genes in Primavera (Table 6). The search for possible transcription factors among the differentially expressed genes across the two cultivars identified six genes belonging to four families of transcription factors, all of which were *upregulated* in Douradão compared to Primavera under water-deficient conditions. The transcription factor families were bHLH (LOC_Os01g09930.1), MYB (LOC_Os07g48870.1 and LOC_Os08g15020.1), NAC (LOC_Os06g33940.1 and LOC_Os10g42130.1) and WRKY (LOC_Os08g29660.1).

Table 6. Transcription factors (TF) identified in the overexpressed genes of Douradão and Primavera cultivated under drought. The numbers indicate how many genes have been identified in each FT Family.

Transcription factor family	Douradão	Primavera
AP2/EREBP, APETALA2/Ethylene-responsive element binding protein	1	8
Aux/IAA	1	2
bHLH,Basic Helix-Loop-Helix	4	3
bZIP	--	2
C2C2(Zn) CO-like, Constans-like zinc finger	1	--
C2C2(Zn) GATA	--	1
C2H2 zinc finger	2	2
Chromatin Remodeling Factors	1	2
G2-like, GARP	--	1
HB,Homeobox	1	2
HSF,Heat-shock	1	4
MYB domain	1	4
NAC domain	1	--
putative	--	2
unclassified	2	4
WRKY domain	1	3
Total	17	40

4.4.5. Validation of the Differentially Expressed Genes by RT-qPCR

The 10 genes with higher expression in Douradão under drought treatment (Table 5) were selected to check its expression by RT-qPCR. Seven out of these 10 genes were *upregulated* in the Douradão under drought treatment in comparison to the control treatment (Figure 7). The gene related to a glycosyltransferase (LOC_Os01g07530.1) was *upregulated* in both Douradão and Primavera cultivars submitted to drought in relation to their respective controls. The expression of another gene, glycosyl hydrolase family 17 (LOC_Os01g71350.1), increased 5.36-fold in Douradão under drought, and was increased 3.54-fold for the Primavera. The expression of a peroxidase precursor gene (LOC_Os01g73200.1) increased 5.17-fold in Douradão under drought, and downregulated (-0.08-fold) in Primavera. The gene of a T-complex protein (LOC_Os03g04970.1), annotated in the glyoxylate and dicarboxylate metabolism pathway, was *upregulated* (1.25-fold) in

Douradão and downregulated (-0.29-fold) in Primavera. The gene encoding an ABC family protein (LOC_Os01g74470.1) showed an increase of expression in the drought treatment for Douradão (1.83-fold). Also in agreement with the RNA-seq the gene CHIT8 – Chitinase family protein precursor (LOC_Os06g51060.1) increased expression of 3.31-fold in Douradão. The dehydrogenase E1 component domain containing protein (LOC_Os06g13720.1) was *upregulated* in Douradão (6.04-fold) and in Primavera (5.37-fold). The level of expression of the genes LOC_Os01g42380.1 (-2.32-fold) and LOC_Os03g04060.1 (-1.42-fold) and LOC_Os12g02060.1 (-0.82-fold) in Douradão were lower than the control.

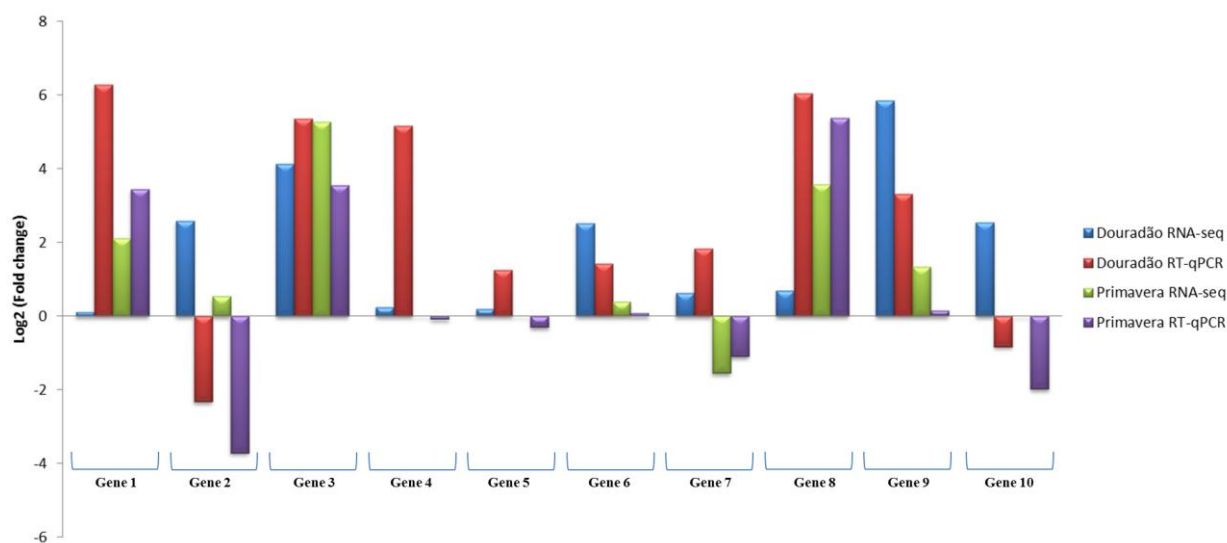


Figure 7. Levels of expression of 10 genes validated by RT-qPCR. Douradão RNA-seq and RT-qPCR indicate the difference in gene expression identified between the drought treatment (30% of Field Capacity) and the control (100% of Field Capacity) in the drought-tolerant cultivar; Primavera RNA-seq and RT-qPCR indicate the difference of gene expression identified by RNA-seq analysis between the drought treatment (30% of Field Capacity) and the control (100% of Field Capacity) in the drought-sensitive cultivar. Gene 1= LOC_Os01g07530.1, Gene 2= LOC_Os01g42380.1, Gene 3= LOC_Os01g71350.1, Gene 4= LOC_Os01g73200.1, Gene 5= LOC_Os01g74470.1, Gene 6= LOC_Os03g04060.1, Gene 7= LOC_Os03g04970.1, Gene 8= LOC_Os06g13720.1, Gene 9= LOC_Os06g51060.1, Gene 10= LOC_Os12g02060.1.

4.5. DISCUSSION

The differential expression analysis of transcripts related to drought was estimated in two genotypes from Brazilian upland rice breeding. The transcripts found from this global expression analysis help to understand the control mechanisms of rice drought tolerance, which is one of the starting point to the development of upland rice cultivars more tolerant to this stress. Initially a phenotyping protocol for the evaluation of drought tolerant (Douradão) and susceptible (Primavera) cultivars was established. At the end of the experiment, the productivity was used as a criterion to evaluate the drought tolerance at the reproductive stage, where drought appears more severe in rice

fields. In rice breeding, selection for grain yield is an important parameter to identify drought tolerant genotypes (Swamy and Kumar, 2013).

The gene expression analysis gives an overall picture of the changes that occur in the transcriptome of different parts of the plant under stress, helping the molecular characterization of the genes and pathways related to drought tolerance. Approximately 85% of the total number of sequenced reads was aligned with the publicly available rice reference genome (*Oryza sativa ssp. japonica*, Nipponbare- MSU Rice Genome version 7.0), enabling the identification of differentially expressed transcripts between drought and control treatments and between Douradão and Primavera cultivars. The percentage of annotated reads was greater than those found by Gao et al. (2013), who observed that 72.3-75.6% of the reads originating from libraries of rice endosperms were perfectly aligned to sequences deposited in Gramene (<http://www.gramene.org/>). In addition, 87.2% of transcripts for Douradão were similar to the Nipponbare reference genome, while for Primavera the similarity was observed for 86.9% of transcripts. Although less differentially expressed genes had been identified in Douradão in comparison to the susceptible Primavera, this set of genes were sufficient to keep the yield in acceptable levels under drought, and this is an important characteristic that can be explored in rice breeding programs.

4.5.1. Transcripts related to drought stress response in the tolerant cultivar

The RNA-seq data identified genes exclusively expressed in the tolerant cultivar Douradão under drought (30% of FC). Among these are the genes LOC_Os02g57720.1 and LOC_Os07g26630.1, coding for aquaporin proteins. These proteins are important water-specific channels for ions or solutes, facilitating water flux along the existing osmotic gradient and increasing water retention in locations with a high density of osmotic agents (Bray, 1997). Plant aquaporins are divided into five subfamilies that comprise plasma membrane intrinsic protein (PIP), tonoplast intrinsic protein (TIP), nodulin 26-like intrinsic protein (NIP), small basic intrinsic protein (SIP) and uncategorized X intrinsic protein (XIP), as described by Kaldenhoff and Fischer (2006) and Sakurai-Ishikawa et al. (2011). Yooyongwech et al. (2013) related the increase in expression of proteins OsPIP1.2 and OsPIP2.1 with the stability of effective water usage in rice plants of the subspecies Indica. Additionally, the genes LOC_Os07g08160.1 and LOC_Os07g08150.1 showed high expression, and encode the protein of the early light-induced protein (ELIP) type, associated with light-related stress. Members of this protein family accumulate within chloroplasts, more specifically in the thylakoid membranes, and are described as being involved in plant development under water-deficit conditions as well as in the photoprotection of leaves (Hutin et al., 2003; Rizza et al., 2011). Another *upregulated* gene in Douradão under drought was the LOC_Os03g01300.1, a LTPL40 – Protease inhibitor/seed storage/LTP family protein precursor. Plant non-specific lipid-transfer

proteins (LTPs) are induced by drought stress (Colmenero-Flores et al., 1997; Jang et al., 2004), and some are *upregulated* when exposed to both pathogens and dehydration stresses (Jung et al., 2003). Guo et al. (2013) showed that the overexpression of the LTP3 in Arabidopsis leaves increased the drought tolerance.

The cultivar Douradão also overexpressed the gene LOC_Os05g01140.1, which encodes a jasmonate O-methyltransferase. This enzyme is also called S-adenosyl-L-methionine: jasmonic acid carboxyl methyltransferase (JMT), and belongs to the family of transferases, which convert jasmonic acid (JA) in methyl jasmonate (Seo et al., 2001). JA is a hormone involved in plant responses to insect wounding, infection of various pathogens, and various abiotic stresses (Pauwels et al., 2009). Previous studies showed that both drought and high salinity increased the JA levels in the leaves and roots of rice (Moons et al., 1997; Kiribuchi et al., 2005).

Two genes encoding HSP20/alpha crystallin family protein (LOC_Os01g04350.1 and LOC_Os07g33350.2) were also identified among the most expressed genes in Douradão under drought treatment. The HSP20 proteins are ATP-independent molecular chaperones that usually form oligomeric protein complexes ranging from 9 to 50 subunits (200–800 kDa) and act by avoiding protein denaturation, playing an important role in plant adaptation to various environmental stress conditions (Cashikar et al., 2005; Lee and Vierling, 2000).

Douradão overexpressed genes under drought that were also associated with the functional subcategory protein kinase, the second largest among differentially expressed genes between Douradão and Primavera. Protein kinases regulate many cellular processes, including responses to environmental stimuli, such as water deficiency. Among the identified protein kinase genes, two were Ser/Thr kinases (LOC_Os01g04570.2 and LOC_Os04g54120.1). In Arabidopsis, genes of the CIPK3 Ser/Thr protein kinase were associated with calcium sensing (calcineurin B-like), which regulates the response mediated by ABA during germination and induces the expression of genes during the stress responses (Kim et al., 2003).

4.5.2. Transcription factors

In this study, it were identified genes of the ABA-dependent TF families bHLH, MYB, NAC and WRKY. ABA-independent TFs, such as DREB1 and DREB2, were not identified because are induced immediately after the occurrence of drought, cold or salt abiotic stresses (Dubouzet et al. 2003; Kumar et al. 2013). Since the rice leaf tissues for RNA extraction were collected some days after the beginning of the drought stress, ABA-independent TFs would not be identified in this work. Basic helix-loop-helix (bHLH) proteins constitute one of the largest families of eukaryotic transcription factors and are involved in numerous regulatory processes, such as involvement in plant developmental processes (Szécsi et al., 2006; Menand et al., 2007), light perception (Liu et al.,

2008), phosphate and iron homeostasis (Yi et al., 2005; Zheng et al., 2010) and phytohormone synthesis pathways (Friedrichsen et al. 2002; Hiruma et al. 2011). Seo et al. (2011) demonstrated that the rice gene *OsbHLH148* is responsible for drought tolerance as a signaling component that is modulated by jasmonic acid.

The genes coding for MYB-type proteins (LOC_Os07g48870.1 and LOC_Os08g15020.1) were *upregulated* in Douradão under drought treatment. The transcription factors MYC/MYB are proteins synthesized only after significant accumulation of endogenous ABA as a result of stress responses (Abe et al., 1997). The NAC transcription factors family (LOC_Os06g33940.1 and LOC_Os10g42130.1) was *upregulated* in Douradão under drought treatment and has been functionally associated with a wide variety of stresses, such as drought, high salinity, pathological bacterial agents, fungi and senescence (Fujita et al., 2004; Hu et al., 2006; Guo and Gan, 2006; Balazadeh et al., 2008). One gene of the transcription-factor family WRKY (LOC_Os08g29660.1) also was *upregulated* in Douradão under drought treatment. This TF family is known to play a crucial role in the regulation of many stress reactions in plants, such as the protein WRKY40, which is modulated by the phytohormones ABA and jasmonic acid (Galletti et al., 2008; Chen et al., 2010).

4.5.3. RT-qPCR gene expression validation

Seven out 10 genes analyzed by RT-qPCR were identified as overexpressed in Douradão under drought in comparison to the control treatment, and confirmed the expected result obtained from RNA-seq. The gene LOC_Os06g51060.1 encodes a CHIT8 – Chitinase family protein precursor. Chitinases catalyze the hydrolytic cleavage of the glycosidic β -1,4 bonds present in biopolymers of N-acetylglucosamine, predominantly chitin, and have previously been related to drought response in strawberry (Raeini-Sarjaz and Chalavi, 2011). The gene LOC_Os01g71350.1 encodes a glycosyl hydrolase family 17 protein, and it was identified as homologous of the Arabidopsis gene AT3G57260.1 (beta-1,3-glucanase 2, a Pathogenesis-Related protein – PR). In *A. thaliana* three protein of this type (PR1, PR2 and PR5) were associated to the increase of drought tolerance, probably by regulating the stomatal movements (Liu et al. 2013). Cal et al. (2013) identified several glycosyl hydrolases differentially expressed under drought, including two xyloglucan endotransglucosylase/hydrolases (XTHs). The gene LOC_Os01g73200.1, a peroxidase precursor, is an ortholog of the AT1G71695.1 from *A. thaliana*, which is associated with the removal of H₂O₂, oxidation of toxic reductants, biosynthesis and degradation of lignin, suberization, auxin catabolism, response to environmental stresses such as wounding, pathogen attack and oxidative stress (Ibáñez et al., 2008; Andersson-Gunnerås et al., 2006). This enzyme acts in the phenylpropanoid biosynthesis, pathway associated to drought tolerance mechanisms. The absence of this protein could reduce the level of flavonoids, secondary metabolites involved in the response to different types of stress, which

are synthesized from phenylpropanoids (Rasmussen et al., 2012). The gene LOC_Os01g74470.1 encodes a protein of the ABC (ATP-binding cassette) family, which is related to membrane transport, and are involved in secreting pheromones, regulating mitochondrial function, vacuolar detoxification, drug resistance, and stress adaptation (Jungwirth and Kuchler, 2006; Rea, 2007; Martinoia et al., 2002). Kang et al. (2010) showed evidence for ABC transporter-mediated phytohormone abscisic acid (ABA) uptake and its importance for rapid responses to environmental stress in *A. thaliana*. The gene LOC_Os01g07530.1, a glycosyltransferase, is ortholog of the gene AT5G40390 from Arabidopsis. This protein family catalyzes glycoside formation using sucrose as a substrate to produce fructose and glucan (Lairson et al., 2008). In the stachyose biosynthesis pathway, this protein is involved in the production of the raffinose, trisaccharide composed of galactose, fructose, and glucose. In rice, accumulation of raffinose is associated to the heat shock and drought stress responses (Wu et al., 2009). The gene LOC_Os06g13720.1, which encodes the enzyme dehydrogenase E1, is homologous of the pyruvate dehydrogenase gene AT1G24180 from Arabidopsis. This enzyme acts in four different pathways (pyruvate metabolism, citrate cycle/TCA cycle, glycolysis/gluconeogenesis and butanoate metabolism), and is responsible for the production of chemical energy (ATP) from the degradation of sugars. Two genes were identified in the Purine metabolism pathway, LOC_Os01g42380.1, which encodes a pleiotropic drug-resistance protein (PDR) and LOC_Os03g04970.1, which encodes a T-complex protein. The gene LOC_Os01g42380.1 has an ortholog in *A. thaliana*, AT1G02520.1, which is part of the ABC family (TAIR, 2013). The expression of the gene *Ospdr9*, which encodes a PDR-type ABC protein, has been associated in rice with responses to various types of environmental stresses (Moons, 2003). The gene LOC_Os03g04970.1 – similar to Arabidopsis mitochondrial chaperonin 60 (AT3G23990.1), have essential function in protein homeostasis under normal condition and are highly responsive to various stresses (Demirevska et al., 2008ab).

4.6. FINAL CONSIDERATIONS

This work identified in tropical rice varieties a series of transcripts previously related to drought tolerance in temperate rice varieties. As drought is a complex trait, the identified transcripts individually show limited effects in phenotype, and for this reason, must be analysed as a group of useful genes, with the contributions of the interacting alleles from these loci. The transcripts identified in the present work will derive molecular markers in order to position in the rice structural genome. With this approach will be possible to identify, for example, Cis-acting elements, in order to better explain the expression variation found in protein or metabolite levels after the occurrence of drought in rice, accumulating experimentally supported knowledge to be applied in important pathways related to this stress. These transcripts will also be used to search for allelic variants of these genes through analysis of polymorphic SNPs in genebank accessions of upland rice, aiming the development of cultivars with the best combination of these alleles, and that will result in materials with high yield potential upon the occurrence of drought in the reproductive phase. Most of the genes identified in the tolerant cultivar Douradão in response to drought stress acts in the detoxification, water transportation and metabolism maintenance during the stress. In addition, it was found genes from photosynthesis and sugar degradation pathways in both tolerant and susceptible cultivars. The identification of transcripts belonging to different metabolic pathways associated with responses to water deficit strengthens the idea of great complexity of the genetic control of drought tolerance, and are candidates to marker assisted selection of upland rice breeding populations or to be overexpressed in genetically modified rice as strategies to develop cultivars with superior performance to drought tolerance.

Supplementary file 1:**Table S1.** Primers sequences of genes validated by RT-qPCR.

Primer	Sequence
LOC_Os01g71350.1 F	GCAGCGGTTTCAGTCCATT
LOC_Os01g71350.1 R	GAGTCGATCCCCTTGGA CTT
LOC_Os01g07530.1 F	GTCGACGTCATCCATCTGC
LOC_Os01g07530.1 R	CAGCATGAAGTCGTTGCAGT
LOC_Os01g42380.1 F	CCGCAGGATGACTCTGCT
LOC_Os01g42380.1 R	GTGCCCCGTTGTAGGTC ACTT
LOC_Os01g73200.1 F	GGGTTGTCGTTGGGCTACTA
LOC_Os01g73200.1 R	CCA ACTTCTCGCTCTTCTCG
LOC_Os01g74470.1 F	TTTTCCACCACATCAACCAG
LOC_Os01g74470.1 R	TCTGCCTTTCCCCAGTAAGA
LOC_Os03g04060.1 F	CCCACGAAACTACAGGTGGA
LOC_Os03g04060.1 R	GGTCCTCGGCCGTAGTAGG
LOC_Os03g04970.1 F	TCGTCAGATTGGGAGTAGGC
LOC_Os03g04970.1 R	CTCAACACCCCTCAACATCA
LOC_Os06g13720.1 F	AAAAGCCCCGCATACTACAA
LOC_Os06g13720.1 R	CCATTTTCAAGAGCATGTTGC
LOC_Os06g51060.1 F	AACGTTGGGTCCGACTACTG
LOC_Os06g51060.1 R	CGGGCCGTAGTTGTAGTTGT
LOC_Os12g02060.1 F	CGAATAGCCGGTTGTGATG
LOC_Os12g02060.1 R	CATCAAATCCACGCAGAGAG
Actin (ACTX3) F	TGCGATAATGGA ACTGGTATGG
Actin (ACTX3) R	ACAGCCCTGGGCGCAT
Eukaryote Elongation factor (EEF α) F	TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT
Eukaryote Elongation factor (EEF α) R	GACTTCCTTCACGATTTTCATCGTAA
Glyceraldeide-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) F	GGGCTGCTAGCTTCAACATC
Glyceraldeide-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) R	TTGATTGCAGCCTTGATCTG

Supplementary file 2:

Table S2. Volumes of the RT-qPCR components reactions. The volume of primer is variable because of the primer concentration.

Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX					
	15F+15R (nM)	25F+25R (nM)	30F+30R (nM)	40F+40R (nM)	50F+50R (nM)
Rox + Sybr	10	10	10	10	10
Primer F	0,6	1	1,2	1,6	2
Primer R	0,6	1	1,2	1,6	2
Template (10ng)	5	5	5	5	5
DEPC water	3,8	3	2,6	1,8	1
Total	20	20	20	20	20

Table S3. Primers concentration for reaction.

Primer	Concentration
LOC_Os01g71350.1	15nM
LOC_Os01g74470.1	15nM
LOC_Os06g51060.1	25nM
LOC_Os12g02060.1	25nM
LOC_Os01g42380.1	25nM
LOC_Os06g13720.1	30nM
LOC_Os01g73200.1	40nM
LOC_Os03g04970.1	40nM
LOC_Os01g07530.1	50nM
LOC_Os01g74470.1	50nM
GAPDH	25nM
ACTX3	25nM
EEF-1A	50nM

4.7. REFERENCES

- Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K (1997) Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* 9:1859–1868.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman, DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 1997, 25: 3389-3402. Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.
- Andersson-Gunnerås AS, Mellerowicz EJ, Love J, Segerman B, Ohmiya Y, Coutinho PM et al (2006), Biosynthesis of cellulose-enriched tension wood in *Populus*: global analysis of transcripts and metabolites identifies biochemical and developmental regulators in secondary wall biosynthesis. *The Plant Journal* 45: 144–165.
- Balazadeh S, Parlitz S, Mueller-Roeber B, Meyer RC (2008) Natural variation for developmental leaf and plant senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol (Suppl 1)*:136–147.
- Bellin D, Ferrarini A, Chimento A, Kaiser O, Levenkova N, Bouffard P, Delledonne M (2009) Combining next-generation pyrosequencing with microarray for large scale expression analysis in non-model species. *BMC Genomics* 10: 555.
- Bray, EA (1997) Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci* 2: 48-54.
- Breseghele F, Guimarães CM, Pinheiro BS (2008) Recent efforts to improve drought resistance of rice in Brazil. In: Serraj, R.; Bennett, J.; Hardy, B., eds. *Drought frontiers in rice: crop improvement for increased rainfed production*. International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines p. 113-122.
- Boudsocq M, Laurière C (2005) Osmotic signaling in plants: multiple pathways mediated by emerging kinase families. *Plant Physiol* 138(3):1185-94.
- Cal AJ, Liu D, Mauleon R, Hsing YI, Serraj R (2013) Transcriptome Profiling of Leaf Elongation Zone under Drought in Contrasting Rice Cultivars. *Plos One* 8(1): e54537.
- Campos H, Cooper M, Habben JE; Edmeades, GO, Schussler JR (2004) Improving drought tolerance in maize: a view from industry. *Field Crops Research*, Amsterdam 90(1): 19-34.

- Cashikar AG, Duennwald M, Lindquist SL (2005) A chaperone pathway in protein disaggregation: Hsp26 alters the nature of protein aggregates to facilitate reactivation by Hsp104. *J Biol Chem* 280:23869–23875.
- Cattivelli L, Rizza F, Badeck FW, Mazzucotelli E, Mastrangelo AN, Francia E, et al (2008) Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Res.*, 105: 1-14.
- Cha-um S, Yooyongwech S, Supaibulwatana K (2012) Water-deficit tolerant classification in mutant lines of indica rice. *Scientia Agricola* 69(2): 135-141.
- Chaves, MM, Oliveira MM (2004) Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *J. Exp. Bot* 55: 2365-2384.
- Chen H, Lai Z, Shi J, Xiao Y, Chen Z, Andxu X (2010) Roles of Arabidopsis WRKY18, WRKY40 and WRKY60 transcription factors in plant responses to abscisic acid and abiotic stress. *BMC Plant Biol* 10 (281).
- Civelek M, Lusi A (2013) Systems genetics approaches to understand complex traits. *Nature Rev Gen* doi:10.1038/nrg3575.
- Collins NC, Tardieu F, Tuberosa R (2008) Quantitative trait loci and crop performance under abiotic stress: where do we stand? *Plant Physiol* 147: 469-486.
- Colmenero-Flores JM, Campos F, Garcarrubio A, Covarrubias AA (1997) Characterization of *Phaseolus vulgaris* cDNA clones responsive to water deficit: identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein. *Plant Mol Biol* 35: 393–405.
- Conesa A, Gotz S, Gracia-Gomez JM, Terol J, Talón M, Robles M (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21 (18): 3674-3676.
- Counce PA, Keislingb TC, Mitchellb AJ (2000) A Uniform, Objective, and Adaptive System for Expressing Rice Development. *Crop Science* 40:436–443.
- Demirevska K, Simova-Stoilova L, Vassileva V, Feller U (2008a) Rubisco and some chaperone protein responses to water stress and rewatering at early seedling growth of drought sensitive and tolerant wheat varieties. *Plant Growth Regul* 56(2):97–106.

- Demirevska K, Simova-Stoilova L, Vassileva V, Vaseva I, Grigorova B, Feller U (2008b) Drought induced leaf protein alterations in sensitive and tolerant wheat varieties. *Gen Appl Plant Physiol* 34(1–2):79–102.
- Ding X, Li X, Xiong L (2013) Insight into Differential Responses of Upland and Paddy Rice to Drought Stress by Comparative Expression Profiling Analysis. *Int. J. Mol. Sci* 14: 5214-5238.
- Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet EG, Miura S, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant J* 33:751–763.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations (2013) FAOSTAT. Accessed in April 30th 2013. Homepage: <http://faostat3.fao.org/home/index.html#VISUALIZE>.
- Friedrichsen DM, Nemhauser J, Muramitsu T, Maloof JN, Alonso J, Ecker JR, Furuya M, Chory J (2002) Three redundant brassinosteroid early response genes encode putative bHLH transcription factors required for normal growth. *Genetics* 162:1445–1456.
- Fujita M, Fujita Y, Maruyama K, Seki M, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Tran LSP, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2004) A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *The Plant Journal* 39, 863–876.
- Gao Y, Xu H, Shen Y, Wang J (2013) Transcriptomic analysis of rice (*Oryza sativa*) endosperm using the RNA-Seq technique. *Plant Mol Biol* 81:363–378.
- Galletti R, Denoux C, Gambetta S, Dewdney J, Ausubel FM, Delorenzo G, et al (2008) The AtrbohD-mediated oxidative burst elicited by oligogalacturonides in Arabidopsis is dispensable for the activation of defense responses effective against *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol* 148: 1695–1706.
- Godfray HCJ, Beddington JR, Crute IR, Haddad L, Lawrence D, Muir JF, Pretty J, Sherman Robinson S, Thomas SM, Toulmin C (2010) Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science* 327 (5967): 812-818
- Guo L, Yang H, Zhang X, Yang S (2013) Lipid transfer protein 3 as a target of MYB96 mediates freezing and drought stress in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 64 (6): 1755–1767.
- Guo Y, Gan S-S (2006) AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *Plant J* 46: 601–612.

- Heinemann AB, Stone LF, Fageria NK, Castro LM de (2009) Evaluation of physiological traits in upland rice for adaptation to no-tillage system. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 21: 113-122.
- Hiruma K, Nishiuchi T, Kato T, Bednarek P, Okuno T, Schulze-Lefert P, Takano Y (2011) *Arabidopsis* ENHANCED DISEASE RESISTANCE 1 is required for pathogen-induced expression of plant defensins in nonhost resistance and acts through interference of MYC2-mediated repressor function. *Plant J* 67:980–992.
- Hsiao TC (1982) The soil-plant-atmosphere continuum in relation to drought and crop production. In *Drought resistance in crops, with emphasis on rice*. International Rice Research Institute 1982, 39-52.
- Hu H, Dai M, Yao J, Xiao B, Li X, Zhang Q, Xiong L (2006) Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 35: 12987–12992.
- Hutin C, Nussaume L, Moise N, Moya I, Kloppstech K, Havaux M (2003) Early light-induced proteins protect *Arabidopsis* from photooxidative stress. – *Proc. Nat. Acad. Sci* 100: 4921-4926.
- Huang X, Wei X, Sang T, Zhao Q, Feng Q, Zhao Y, et al (2010) Genome-wide association studies of 14 agronomic traits in rice landraces. *Nature Genetics* 42(11):961-7.
- Ibáñez JTA, Sozzani R, Lee TJ, Chu TM, Wolfinger RD, Cella R, Bowdoin LH (2008) Global Analysis of *Arabidopsis* Gene Expression Uncovers a Complex Array of Changes Impacting Pathogen Response and Cell Cycle during Geminivirus Infection *Plant Physiol.* 148: 436-454.
- Ito Y, Katsura K, Maruyama K, Taji T, Kobayashi M, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2006) Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. *Plant Cell Physiol* 47: 141–153.
- Jang CS, Lee HJ, Chang SJ, Seo YW (2004) Expression and promoter analysis of the TaLTP1 gene induced by drought and salt stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Sci* 167: 995–1001.
- Jung HW, Kim W, Hwang BK (2003) Three pathogen-inducible genes encoding lipid transfer protein from pepper are differentially activated by pathogens, abiotic, and environmental stresses. *Plant Cell Environ* 26: 915–928.
- Jungwirth H, Kuchler K (2006) Yeast ABC transporters – a tale of sex, stress, drugs and aging. *FEBS Lett* 580: 1131–1138.

- Kaldenhoff R, Fischer M (2006) Functional aquaporin diversity in plants. *Biochim Biophys Acta* 1758:1134-1141.
- Kang J, Hwang JU, Lee M, Kim YY, Assmann SM, Martinoia E, Lee Y (2010) PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 2355–2360.
- Kawahara Y, Oono Y, Kanamori H, Matsumoto T, Itoh T, Minami E (2012) Simultaneous RNA-Seq Analysis of a Mixed Transcriptome of Rice and Blast Fungus Interaction. *PLOS ONE* 7(11): e49423.
- Kim CY, Liu Y, Thorne ET, Yang H, Fukushige H, Gassmann W, Hildebrand D, Sharp RE, Zhang S (2003) Activation of a stress-responsive mitogen-activated protein kinase cascade induces the biosynthesis of ethylene in plants. *Plant Cell* 15: 2707–2718.
- Kiribuchi K, Jikumaru Y, Kaku H, Minami E, Hasegawa M, Kodama O, et al (2005) Involvement of the basic helix-loop-helix transcription factor RERJ1 in wounding and drought stress responses in rice plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69: 1042–1044.
- Kumar K, Kumar M, Kim SR, Ryu H, Cho YG (2013) Insights into genomics of salt stress response in rice. *Rice* 2013, 6:27.
- Lee GJ, Vierling E (2000) A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiol* 122:189–198.
- Liu H, Yu X, Li K, Klejnot J, Yang H, Lisiero D, Lin C (2008) Photoexcited CRY2 interacts with CIB1 to regulate transcription and floral initiation in *Arabidopsis*. *Science* 322:1535–1539.
- Liu WX, Zhang FC, Zhang WZ, Song LF, Chen YF (2013) *Arabidopsis* *Di19* Functions as a Transcription Factor and Modulates PR1, PR2, and PR5 Expression in Response to Drought Stress. *Mol. Plant* 6 (5): 1487-1502.
- Martinoia E, Klein M, Geisler M, Bovet L, Forestier C, Kolukisaoglu U, et al (2002) Multifunctionality of plant ABC transporters: more than just detoxifiers. *Planta* 214:345–355.
- Mello CR, Oliveira GC, Resck DVS, Lima JM, Dias Júnior MS (2002) Estimativa da capacidade de campo baseada no ponto de inflexão da curva característica. *Ciência e Agrotecnologia* 26:835-841.
- Menand B, Yi K, Jouannic S, Hoffmann L, Ryan E, Linstead P, Schaefer DG and Dolan L (2007) An ancient mechanism controls the development of cells with a rooting function in land plants. *Science* 316: 1477–1480.

- Moons A (2003) OsPdr9, which encodes a PDR-type ABC transporter, is induced by heavy metals, hypoxic stress and redox perturbations in rice roots. *FEBS Letters* 553(3): 370-376.
- Moons A, Prinsen E, Bauw G, Van Montagu M (1997) Antagonistic effects of abscisic acid and jasmonates on salt stress-inducible transcripts in rice roots. *Plant Cell* 9: 2243–2259.
- Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods*. 5(7):621-8.
- Moumeni A, Satoh K, Kondoh H, Asano T, Hosaka A, Venuprasad R, et al (2011) Comparative analysis of root transcriptome profiles of two pairs of drought-tolerant and susceptible rice near-isogenic lines under different drought stress. *BMC Plant Biology* 11:174.
- Nagalakshmi U, Wang Z, Waern K, Shou C, Raha D, Gerstein M, Snyder M. (2008) The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science* 320(5881):1344-9.
- Pauwels L, Inze D, Goossens A (2009). Jasmonate-inducible gene: what does it mean? *Trends Plant Sci.* 14: 87–91.
- Perez-Rodriguez P, Riaño-Pachón DM, Corrêa LGG, Rensing SA, Birgit Kersten, Mueller-Roeber B (2009) PlnTFDB: updated content and new features of the plant transcription factor database. *Nucleic Acids Res* 38:D822-D827.
- Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Palme KL, Jansen MAK (2007) Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends Plant Sci* 12:98-105.
- Rabbani MA, Maruyama K, Abe H, Khan MA, Katsura K, Ito Y, et al (2003) 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 Physiol* 133: 1755–1767.
- Raeini-Sarjaz M, Chalavi V (2011) Effects of water stress and constitutive expression of a drought induced chitinase gene on water-use efficiency and carbon isotope composition of strawberry. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 2011; 84: 90-94.
- Rasmussen S, Parsons A, Jones CS (2012) Metabolomics of forage plants: a review. *Annals of Botany* p. 1-10.
- Rea PA (2007) Plant ATP-binding cassette transporters. *Annu Rev Plant Biol.* 58:347-75.

- Recchia GH, Caldas DGG, Beraldo ALA, Silva MJ, Tsai SM (2013) Transcriptional Analysis of Drought-Induced Genes in the Roots of a Tolerant Genotype of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Int J Mol Sci.* 14(4): 7155–7179.
- Reddy AR, Chaitanya KV, Vivekanandan, M (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J. Plant Physiol* 161: 1189-1202.
- Rizza A, Boccaccini A, Lopez-Vidriero I, Costantino P, Vittorioso P (2011) Inactivation of the ELIP1 and ELIP2 genes affects *Arabidopsis* seed germination. – *New Phytol* 190: 896-905.
- Sakurai-Ishikawa J, Murai-Hatano M, Hayashi H, Ahamed A, Fukushi K, Matsumoto T, Kitagawa Y (2011) Transpiration from shoots triggers diurnal changes in root aquaporin expression. *Plant Cell Environ* 34:1150-1163.
- Santos AB do, Rabelo RR (2008) Informações Técnicas para a Cultura do Arroz Irrigado No Estado do Tocantins. Embrapa Arroz e Feijão, Documentos 218, Santo Antônio de Goiás, p.136.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray, *Science* 270:467-470.
- Seki M, Kamei A, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2003) Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plants protection. *Curr Opin Biotech* 14: 1994-199.
- Seo HS, Song JT, Cheong JJ, Lee YH, Lee YW, Hwang I et al (2001) Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *PNAS* 98 (8): 4788-4793.
- Seo JS, Joo J, Kim MJ, Kim YK, Nahm BH, Song SI, et al (2011) OsbHLH148, a basic helix-loop-helix protein, interacts with OsJAZ proteins in a jasmonate signaling pathway leading to drought tolerance in rice. *Plant J* 65:907–921.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58 (2): 221–227.
- Soares AA, Comelio VMO, Soares PC, Santos PG, Reis MS (2001) Primavera: Cultivar de arroz com grão agulhinha para cultivo em terras altas. *Ceres* 48 (277): 381-388.
- Soares AA, Guimaraes EP, Moraes OP De, Soares PC (1989) Cultivares de arroz de sequeiro recomendadas para Minas Gerais e região Centro-Oeste do Brasil. *Informe Agropecuario* 14 (161): 12-16.

- Swamy BPM, Kumar A (2013) Genomics-based precision breeding approaches to improve drought tolerance in rice. *Biotechnol Adv*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.05.004>.
- Szécsi J, Joly C, Bordji K, Varaud E, Cock JM, Dumas C, Bendahmane M (2006). BIGPETALp, a bHLH transcription factor is involved in the control of Arabidopsis petal size. *EMBO J*. 25: 3912–3920.
- TAIR – The Arabidopsis Information Resource (2013) Accessed in November 3th 2013. Homepage: <http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?name=AT1G02520.1&type=gene>
- Trapnell C, Hendrickson DG, Sauvageau M, Goff F, Rinn J, Pachter L (2012) Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-Seq. *Nature Biotechnology* 9: 1-9.
- Wang D, Pan Y, Zhao X, Zhu L, Fu B, Li Z (2011). Genome-wide temporal-spatial gene expression profiling of drought responsiveness in rice. *Genomics* 12:149, doi: 10.1186/1471-2164-12-149.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009) RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 10:57-63.
- Wu X, Kishitani S, Ito Y, Toriyama K (2009) Accumulation of raffinose in rice seedlings overexpressing OsWRKY11 in relation to desiccation tolerance. *Plant Biotechnol* 26:431–4.
- Xiao B, Huang Y, Tang N, Xiong L (2007) Over-expression of a LEA gene in rice improves drought resistance under the field conditions. *Theor Appl Genet* 115: 35–46.
- Xu H, Gao Y, Wang J (2012) Transcriptomic Analysis of Rice (*Oryza sativa*) Developing Embryos Using the RNA-Seq Technique. *PLOs ONE* 7(2): e30646.
- Yi K, Wu Z, Zhou J, Du L, Guo L, Wu Y, Wu P (2005) OsPTF1, a novel transcription factor involved in tolerance to phosphate starvation in rice. *Plant Physiol* 138:2087–2096.
- Yooyongwech S, Cha-um S, Supaibulwatana K (2013) Water relation and aquaporin genes (PIP1;2 and PIP2;1) expression at the reproductive stage of rice (*Oryza sativa* L. spp. indica) mutant subjected to water deficit stress. *Plant Omics Journal* 6 (1): 79-85.
- Zheng J, Zhao J, Tao Y, Wang J, Liu Y, Fu J, et al (2004) Isolation and analysis of water stress induced genes in maize seedlings by subtractive PCR and cDNA macroarray. *Plant Mol Biol* 55:807-823.

Zheng L, Ying Y, Wang L, Wang F, Whelan J, Shou H (2010) Identification of a novel iron regulated basic helix-loop-helix protein involved in Fe homeostasis in *Oryza sativa*. BMC Plant Biol. 10:e166.

Zhou D, Zhou X, Ling Y, Zhang Z, Su Z (2010) agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. Nucleic Acids Res. 38: W64–W70.

5. ARTIGO 2

GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM FOLHAS E RAÍZES DE PLANTAS DE ARROZ DE TERRAS ALTAS SUBMETIDAS AO DÉFICIT HÍDRICO

Ricardo Diógenes Dias Silveira^{a,d}, Fernanda Raquel Martins Abreu^{b,d}, Sujan Mamidi^c, Phillip E. McClean^{c,f}, Rosana Pereira Vianello^{a,d}, Anna Cristina Lanna^d, Newton Portilho Carneiro^e, Claudio Brondani^{a,b,d}

^aUniversidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, CEP 74001-970 Goiânia, GO, Brazil.

^bUniversidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia, CEP 74001-970 Goiânia, GO, Brazil.

^cNorth Dakota State University, Department of Plant Sciences, Fargo, ND 58108-6050, USA.

^dEmbrapa Arroz e Feijão, Rodovia GO- 462, Km 12, Caixa Postal 179, CEP 75375-000, Santo Antônio de Goiás, GO, Brazil.

^eEmbrapa Milho e Sorgo, Rodovia MG – 242, Km 45, Caixa Postal 285, CEP 35701-970, Sete Lagoas, MG, Brazil.

^fNorth Dakota State University, Genomics and Bioinformatics Program, Fargo, ND 58108-6050, USA

5.1. 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, uma série de genes é induzida nas plantas, 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. O objetivo desse trabalho foi identificar genes diferencialmente expressos (GDEs) relacionados à resposta à seca em folhas e raízes de duas cultivares brasileiras de arroz de terras altas, a cultivar tolerante Douradão e a cultivar sensível Primavera. O sequenciamento pelo RNA-seq identificou 44.978 transcritos no tecido foliar e 37.898 transcritos no tecido radicular. Douradão apresentou 3.554 GDEs no tecido foliar e 840 GDEs, no tecido radicular, enquanto que Primavera apresentou 1.141 e 1.975 GDEs, respectivamente. Vários genes atuantes em rotas metabólicas atuantes em diferentes mecanismos de tolerância ao estresse foram identificados em folhas e raízes de Douradão, como genes relacionados à sinalização celular, fatores de transcrição, proteínas protetoras funcionais da célula e enzimas de detoxificação celular. Um conjunto de seis genes expressos em ambos os tecidos foram validados via RT-qPCR e a cinco deles tiveram resultados similares aos resultados de RNA-seq, indicando uma boa concordância entre os resultados de expressão gênica entre as duas técnicas. Foi realizada uma análise de homologia envolvendo os transcritos não anotados em arroz contra o banco de dados de *Arabidopsis thaliana*, a qual revelou um gene relacionado ao crescimento celular de raízes na cultivar Douradão. Os seis genes relacionados a tolerância à seca serão utilizados como marcadores moleculares em seleção assistida no programa de melhoramento de arroz de terras altas e são genes candidatos a serem utilizados na transformação de genótipos sensíveis à seca.

5.2. INTRODUÇÃO

Atualmente, um dos principais desafios que a agricultura enfrenta é a escassez global de água causada pelo aumento da população mundial e as mudanças climáticas (Yang et al., 2010). Esses fatores associados tornam cada vez mais desafiadores os objetivos dos programas de melhoramento de plantas. Explorar o potencial de rendimento e manter a estabilidade de rendimento de culturas em ambientes limitados em água são tarefas urgentes que devem ser resolvidas para garantir o abastecimento de alimentos para a crescente população mundial.

Dentre as culturas ameaçadas por esse cenário de escassez de água encontra-se o arroz (*Oryza sativa* L.), um dos alimentos mais importantes do mundo, o qual é muito sensível ao estresse hídrico devido à sua adaptação limitada a uma situação de déficit hídrico. Em contrapartida o arroz possui características únicas de tolerância e sensibilidade a estresses abióticos quando comparado a outras culturas, sendo capaz de tolerar solos encharcados e submersão em níveis que seriam críticos a outras culturas, apresentando moderada tolerância à salinidade e à acidez do solo, sendo altamente sensível à seca e frio (Lafitte et al., 2004). O cultivo de arroz de terras altas (produzido sem irrigação constante) é caracterizado pela condição aeróbica de desenvolvimento das raízes da planta. Este tipo de cultivo é encontrado predominantemente na região do Cerrado no Brasil e, em menor quantidade, na África (Guimarães, 2006). Portanto, é importante para o desenvolvimento de tecnologias para aumentar a produtividade neste sistema, uma vez que beneficia pequenos, médios e grandes agricultores em todo nesses países produtores (Gitti et al., 2013).

Estresses como a seca afetam diretamente a produtividade da maioria das culturas em graus variáveis, a qual interfere no crescimento e no rendimento das plantas (Guo et al., 2011), alterando vários aspectos fisiológicos, tais como, taxa de crescimento, transpiração, taxa fotossintética, as relações hídricas, o conteúdo de ácido abscísico, entre outros (Siemens and Zwiazek, 2004; Vandeleur et al., 2005). Adicionalmente, promove alterações no comportamento vegetal, cuja irreversibilidade vai depender do genótipo, da duração, da severidade e do estágio de desenvolvimento da planta. Porém, durante a evolução, as plantas desenvolveram sofisticados mecanismos para percepção de mudanças sutis nas condições de crescimento e desencadeando respostas necessárias para sua adaptação às diversas condições ambientais (Gao et al., 2007).

A tolerância ou sensibilidade de uma planta a estresses abióticos é um fenômeno muito complexo, envolvendo a expressão coordenada de vários genes relacionados aos mecanismos de tolerância, os quais podem ser classificados em dois grupos (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006). O primeiro grupo se refere a genes que codificam proteínas regulatórias, as quais estão envolvidas em vias de transdução de sinais, tais como fatores de transcrição; e o segundo grupo codifica proteínas funcionais, tais como as enzimas que atuam em várias vias metabólicas, dentre as quais estão as receptoras de moléculas oxidantes, síntese de biomoléculas e produção de energia. O

estímulo ambiental, incluindo estresse salino e de seca, é inicialmente detectado pelas proteínas receptoras, as quais estão presumivelmente localizadas na superfície celular, e então, transduzido ao núcleo, para induzir a expressão de genes relacionados e, conseqüentemente, aliviar a citotoxicidade. Portanto, a percepção do estresse abiótico e a transdução de sinais são passos críticos para o desenvolvimento de mecanismos de respostas adaptativas, assegurando a sobrevivência e a reprodução das plantas expostas a ambientes adversos (Chinnusamy et al., 2004).

Diversos genes já foram identificados e validados cuja expressão foi relacionada a resposta ao déficit hídrico, como MAP kinases (Agrawal et al., 2003; Rodriguez et al., 2010), genes DREB (Dubouzet et al., 2003; Gao et al., 2011; Ravikumar et al., 2014), proteína-kinase dependente de cálcio (Saijo et al., 2001), uma endo-1,3-beta-glucanase (Akiyama and Pillai, 2001), um fator de alongação da tradução (Li and Chen, 1999) e glutathiona redutase (Kaminaka et al., 1998). Genes responsáveis por funções celulares distintas, tais como absorção de água (aquaporinas) (Martre et al., 2002), sinalização (kinases) (Saijo et al., 2001; Liu et al., 2003), integridade da membrana (proteínas LEA) (Xu et al., 1996; Rohila et al., 2002; Babu et al., 2004), e metabolismo de carboidrato (TPS) (Jang et al., 2003), também foram associados à respostas ao déficit hídrico em arroz. Recentemente, foi relatado que tecidos foliar e radicular compartilham um número mínimo de genes e que cada tecido atua de modo diferente em resposta à níveis diferentes de desidratação (Minh-Thu et al., 2013).

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). Estudos de RNA-seq têm possibilitado grandes avanços no entendimento da expressão de genes de arroz nos últimos anos (Zhai et al., 2013, Kyndt et al., 2012, Oono et al., 2011, Mizuno et al., 2010). A análise de transcriptoma de raízes de arroz revelou que o tecido radicular responde a estímulos externos, mostrando uma expressão mais elevada de, por exemplo, genes sensíveis à auxina e de respostas ao ácido abscísico, bem como da via fenilpropanóide e fotossíntese (Kyndt et al., 2012).

Os objetivos desse trabalho foram: (i) identificar genes diferencialmente expressos em duas cultivares de arroz de terras altas com características contrastantes para a tolerância à seca ; (ii) validar alguns genes candidatos relacionados a tolerância à seca via RT-qPCR; (iii) Determinar a provável função de transcritos de arroz não anotados por meio da análise de homologia em banco de dados de *Arabidopsis thaliana*.

5.3. MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1. Material vegetal

As cultivares selecionadas para ensaio de tolerância à deficiência hídrica, Douradão e Primavera, fazem parte do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Arroz e Feijão, as quais são utilizadas no programa de melhoramento de arroz da Embrapa. Essas cultivares são da subespécie *japonica* e foram escolhidas devido as suas diferenças fisiológicas. A cultivar Douradão foi lançada em 1988 e originária do cruzamento entre a cultivar 'IAC-25' e a linhagem Africana '63-83' (Soares et al., 1989). Essa cultivar possui como principais características o ciclo curto; robustez inicial de plântulas, porte de planta, adaptabilidade ambiental e tolerância a estresses bióticos e abióticos. A cultivar Primavera foi lançada comercialmente em 1987, e desenvolvida a partir do cruzamento entre as linhagens IRAT 10 e LS 85-158 (Soares et al., 2001), e possui como principais características a alta produtividade e o excelente tipo de grão (Fonseca et al., 2007).

5.3.2. Experimento de tolerância à seca

O experimento de deficiência hídrica foi conduzido no ano de 2011, entre os meses de novembro e março, em casa de vegetação da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO. Para instalação dos experimentos, cerca de 10 plantas foram semeadas em cada vaso (repetição), e após a germinação foram mantidas somente cinco plantas em cada vaso, escolhidas aleatoriamente. A restrição hídrica foi aplicada em dois ciclos durante o cultivo, conforme descrito por Counce et al (2000), sendo que o 1º ciclo o corte da irrigação ocorreu entre os estádios vegetativos V3 e V6; e no 2º ciclo o corte de irrigação iniciou-se no estágio reprodutivo R3 (emissão da panícula) e estendeu-se até o estágio reprodutivo R6 (grão leitoso). Durante esses dois ciclos, quatro regimes de irrigação foram utilizados: Grupo A (grupo controle) – conjunto de plantas submetidas a 100 % da Capacidade de Campo (CC); Grupo B – conjunto de plantas submetidas a 70% da CC; Grupo C – conjunto de plantas submetidas a 50% da CC e Grupo D – conjunto de plantas submetidas a 30% da CC. Em ambos os anos de experimentação a irrigação foi realizada normalmente a partir da semeadura. Quando 50% das plantas de cada cultivar atingiram o estágio vegetativo V3 (início do 1º ciclo de deficiência hídrica), a irrigação foi interrompida para que os diferentes regimes hídricos fossem alcançados no solo até o estágio vegetativo V6. A irrigação continuou normalmente para o conjunto de plantas submetidas ao 2º ciclo de deficiência hídrica até o momento em que mais de 50% das plantas, desse conjunto de vasos, atingiram o estágio reprodutivo R3, quando foi aplicada a restrição hídrica, e que durou até o estágio R6.

Para estabelecer a quantidade de água no vaso para cada regime hídrico, foi determinada a capacidade de campo (CC) do solo, definida como o máximo conteúdo de água retido pelo solo após

o excesso ter sido drenado (Mello et al. 2002). Para cada vaso, portanto, foi registrada a massa máxima (solo + água), bem como o volume de água correspondente a 100 % da CC. A massa foi obtida utilizando balança eletrônica (Marte, modelo LC20) e o volume foi medido utilizando proveta. A duração do estresse variou com a severidade do tratamento, ou seja, para as plantas submetidas a 70% da CC a duração do estresse foi de 10 dias. Para as plantas submetidas a 50% da CC, a duração foi de seis dias. Para as plantas submetidas a 30% da CC, a duração foi de um dia.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, no qual foram utilizadas seis repetições, sendo três vasos utilizados para amostragem do material vegetal e três vasos mantidos até o final do ciclo do arroz para determinação de rendimento de grãos. As repetições foram feitas por regime hídrico e cultivar, totalizando 12 vasos por tratamento e considerou-se parcela o vaso contendo cinco plantas.

5.3.3. Atributo agronômico

Após os períodos de restrição hídrica a irrigação foi imediatamente retomada, e mantida até o final do ciclo da cultura para determinação da produtividade de cada tratamento (g grãos vaso⁻¹). A produtividade foi utilizada como caráter aferidor da tolerância ao déficit hídrico, de acordo com Campos et al. (2004). Os dados de produtividade foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o software *Statistica 12* (StatSoft), e a comparação de médias foi realizada pelo teste Tukey, adotando-se o nível de 5 % de probabilidade de erro ($p < 0,05$). Isso permitiu definir qual ciclo de restrição hídrica afetou mais a produtividade. Após definição do estágio de desenvolvimento das plantas de arroz de terras altas e da quantidade de água a ser reduzida nos vasos, procedeu-se as avaliações dos atributos fisiológicos e moleculares de plantas cultivadas sob deficiência hídrica no ano de 2011.

5.3.4. Atributos fisiológicos

No último dia da aplicação da deficiência hídrica foram realizadas nas folhas apicais (completamente expandidas e expostas à radiação solar): (a) avaliação de trocas gasosas: taxa fotossintética ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), taxa transpiratória ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e condutância estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), determinadas por meio do medidor portátil de gás na região do infravermelho (LCpro+, ADC BioScientific), no período entre 08:00 e 10:00 horas da manhã e (b) avaliação do potencial hídrico - Ψ_w (MPa), no período entre 05:30 e 6:00 horas da manhã.

5.3.5. Atributos moleculares

5.3.5.1. Extração de RNA

Para análise de transcriptoma, amostras de folhas e raízes de plantas controle e estressadas das cultivares Douradão e Primavera foram coletadas no último dia de restrição hídrica e imediatamente colocadas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer (-80°C). As folhas apicais (última folha completamente expandida do topo para a base do colmo principal) e um pool de raízes de três plantas foram utilizados com material vegetal para a extração do RNA total. A extração do RNA total foi obtida pelo PureLink® RNA Mini Kit (Ambion®) de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA total foi ressuspenso em água livre de RNase e mantidos a -80°C . A determinação da quantidade e qualidade do RNA total foi feita no aparelho NanoVue™ (GE Healthcare UK Ltd – England) e BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies CA, USA), respectivamente.

5.3.5.2. RNA-seq e análise de bioinformática

As amostras de RNA total do tecido foliar e radicular foram enviadas para Beijing Genomics Institute (BGI, Hong Kong, China), onde foram desenvolvidas oito bibliotecas de cDNA, sendo quatro bibliotecas de cada tecido (duas de plantas controle – folha e raiz, e duas de plantas estressadas – folha e raiz, de cada cultivar), seguido por sequenciamento na plataforma Illumina HiSeq™ 2000. Os dados coletados foram filtrados e submetidos ao alinhamento e mapeamento com o genoma de referência do arroz (*Oryza sativa*, Nipponbare- MSU Rice Genome versão 7.0) por meio do software TopHat versão 2.04 (Trapnell et al., 2012). O pacote de softwares Cufflinks 2.0.01 (Trapnell et al., 2012) foi utilizado para construir os *assemblies* de cada biblioteca e identificar os genes diferencialmente expressos (GDEs). Os reads de cada uma das amostras referentes às quatro bibliotecas de cDNA foram normalizados considerando tamanho dos genes, tamanho da biblioteca (amostra) e quantidade de Reads expressos no gene em questão, considerando a abundância dos Reads por Kilobase de regiões expressas a cada milhão de Reads mapeados (RPKM - Reads Per Kilobase of exon model Per Million Mapped Reads; Mortazavi et al., 2008). Os transcritos dos prováveis genes foram identificados usando os seguintes critérios: (1) false discovery rate (FDR) ≤ 0.001 e (2) $\log_2$ fold change (FC) ≥ 2 . Usando esses critérios, os GDEs foram identificados no tecido foliar e radicular, nas duas cultivares. Na comparação dos GDEs entre as cultivares, foram subtraídos os GDEs comuns entre os tratamentos controles e o tratamento de deficiência hídrica. A visualização dos genes expressos comuns e exclusivos aos dois regimes hídricos impostos e as duas cultivares selecionados foi obtida por meio do diagrama de Venn, utilizando a ferramenta Venny (Oliveros, 2007) disponível em <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.

Os transcritos foram anotados através do algoritmo BLASTx (Altschul et al., 1997) e confrontados à base de dados de proteínas de arroz não redundantes com as configurações padrões, através da ferramenta blast+ do pacote NCBI C++ Toolkit (NCBI). A fim de atribuir provável função

ao conjunto global de transcritos de cada tecido acessando os termos do Gene Ontology (GO) foi utilizada a ferramenta BLAST2GO, a partir dos hits do BLASTx (Conesa et al., 2005), o qual distribui os genes em três categorias funcionais principais: biological process, molecular function e cellular process. Os parâmetros adotados na anotação foram as configurações padrões do BLAST2GO (E-value < 1.0 E⁻⁶ e annotation cutoff = 20).

Para identificar os termos funcionais enriquecidos pelos genes diferencialmente expressos utilizou-se a ferramenta Singular Enrichment Analysis (SEA) do software agriGO (Zhou et al., 2010), que possui uma interface web (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO>) e está integrada a um banco de dados para a análise de Gene Ontology (GO) com ênfase em espécies vegetais. Com essa análise foi possível identificar os termos funcionais enriquecidos, determinando o valor-p para a anotação associada em uma lista de genes. Para isso foi utilizada a distribuição hipergeométrica e um valor-p corrigido foi calculado para corrigir o teste de múltiplas hipóteses.

O valor-p calculado na distribuição hipergeométrica foi obtido pela seguinte fórmula:

$$p = 1 - \sum_{t=0}^{k-1} \frac{\binom{M}{t} \binom{N-M}{n-1}}{\binom{N}{n}}$$

Onde N é o número total de genes na distribuição de fundo (todos os genes de um determinado organismo), M é o número de genes naquela distribuição que são anotados, n número de genes da lista de interesse e k número de genes da lista de interesse anotados. Foi utilizada a correção de múltiplas hipóteses de Bonferroni, sendo considerado valor-p corrigido menor que 0,05 como significativo.

Adicionalmente, os genes identificados em cada tecido vegetal avaliado (foliar e radicular) foram posicionados em rotas metabólicas utilizando *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG), disponível em: <http://www.genome.jp/kegg/>.

5.3.6. Análise de homologia

Como *Arabidopsis thaliana* possui um genoma extensivamente anotado e manualmente verificado por curadores, além de estar amparado por vastos dados experimentais, então foi possível realizar a comparação genes homólogos dessa espécie com genes de arroz. Para isso, todos os transcritos identificados provenientes do RNA-seq foram alinhados e comparados as sequências de *Arabidopsis* por meio da análise tBLASTx, derivadas da base de dados TAIR10, usando o e-value: 1

$\times 10^{-5}$ como valor de corte. A partir da identificação de homólogos putativos entre *Arabidopsis* e arroz foi possível identificar e anotar genes diferencialmente expressos nas bibliotecas que não foram identificados pelo análise prévia de BLASTx com os dados do genoma de arroz.

5.3.7. Validação dos dados de RNA-seq via RT-qPCR

A partir das comparações entre os GDEs foram selecionados alguns genes expressos tanto no tecido foliar quanto no tecido radicular (Tabela suplementar 1) para validação dos dados de RNA-seq, na qual utilizou-se a técnica de RT-qPCR (*real time quantitative PCR*). Um primer de cada par de cada um dos genes selecionados foi desenhado na junção éxon-éxon pelo programa OligoPerfect™ Designer (<http://tools.lifetechnologies.com/content.cfm?pageid=9716>). O RNA total de cada uma das amostras analisadas (tecido foliar e radicular de Douradão e Primavera submetidos à 100 e 50 % de CC) foi tratado com DNase I (Invitrogen™) para evitar a interferência de eventual molécula de DNA na PCR. A reação de transcrição reversa foi realizada com 1µg de RNA total usando random primer e o kit Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen™) de acordo com as recomendações do fabricante. Os experimentos de RT-qPCR foram conduzidos utilizando o kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen™) no aparelho 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®). As condições das reações foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 2 minutos seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos. O volume total por reação foi de 20 µl, contendo 10 µl de SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen™), 2µl de cDNA (12,5 ng/µl), o volume de água e primers *forward* e *reverse* foi variável para cada gene, de acordo com o ajuste feito para a concentração ideal de cada primer (Tabelas suplementares 2 e 3). Todas as reações de RT-qPCR foram realizadas em triplicata, e as análises de expressão foram realizadas no DataAssist™ Software (Life Technologies), baseado no método de delta-delta Ct. Uma curva de dissociação (60°C – 95°C) foi realizada ao final do ciclo de PCR para conferir a especificidade do produto amplificado. A detecção do ciclo de quantificação por reação foi normalizado contra o nível de expressão dos genes de referências de arroz *Actin* (ACTX3), *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) e *Eukariote Elongation factor* (EEFα) (Tabela suplementar 1).

5.4. RESULTADOS

5.4.1. Atributo agronômico

A partir da média da produtividade foi possível definir em qual estágio (vegetativo ou reprodutivo) e qual tratamento de restrição hídrica reduziu a produtividade em pelo menos 50%. O ciclo de restrição hídrica selecionado foi o 2º ciclo, correspondente ao estágio reprodutivo, e o

regime hídrico de 50% da CC, os quais resultaram em uma redução de, no mínimo, 50 % de produtividade (Tabela 1).

Tabela 1. Índice de Produtividade (IP) de plantas de arroz de terras altas, cultivares Douradão e BRS Primavera, submetidas aos regimes hídrico de: 70%, 50% e 30% de capacidade de campo (CC) em relação ao tratamento controle (100% de CC), média de dois anos de experimentação, 2010 e 2011.

Tratamento	Estádio Vegetativo		Estádio Reprodutivo	
	Douradão (IP)	Primavera (IP)	Douradão (IP)	Primavera (IP)
100% de CC	1,00	1,00	1,00	1,00
70% de CC	0,97	0,66	1,00	0,72
50% de CC	0,86	0,50	0,76	0,42
30% de CC	0,49	0,11	0,51	0,14

5.4.2. Atributos fisiológicos

Para confirmar que a restrição hídrica resultou em deficiência hídrica nas plantas avaliadas no experimento foi realizada a avaliação do potencial hídrico (Ψ_w) foliar, o qual apresentou redução significativa em função da deficiência hídrica imposta (Figura 1 A). As cultivares Douradão e Primavera apresentaram valores de Ψ_w foliar de - 1,2 MPa e - 0,47 MPa, respectivamente, no tratamento sem restrição hídrica. Entretanto, quando as plantas foram submetidas a um regime hídrico de 50% de CC, plantas de Douradão apresentaram valor de Ψ_w igual a - 2,4 MPa (redução de 100% na energia livre da água em relação às plantas do tratamento-controle); enquanto que nas plantas de Primavera, o valor de Ψ_w foi igual a -1,0 MPa (redução de 124% em relação às plantas do tratamento-controle). As medidas de trocas gasosas foram usadas para avaliar taxa fotossintética (A), taxa transpiratória (E) e condutância estomática (gs) em plantas de Douradão e Primavera, sob condição hídrica ótima e não ótima (Figura 1 B). Sob irrigação adequada a taxa fotossintética das plantas de Douradão e Primavera foi igual a $16,3 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e $13,2 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente; enquanto, sob baixa disponibilidade hídrica, os valores foram de $6,4 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (redução de 61 %) e $9,5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (redução de 28 %), respectivamente. A taxa transpiratória de plantas de Douradão e Primavera no tratamento controle foi, para ambas, de $5,1 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, enquanto que no tratamento de 50 % de CC foi de $2,4 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para Douradão (redução de 52 %) e $4,1 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para Primavera (redução de 20 %)(Figura 1 C). Quanto à condutância estomática (dependente do número e atividade dos estômatos), observou-se que plantas de Douradão e Primavera apresentaram valores médios de $1,9 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e $1,1 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente, quando submetidas ao cultivo sob condição adequada de água. Já em condições de deficiência hídrica, a redução foi de 79 % e 60 % para plantas de Douradão e Primavera, respectivamente.

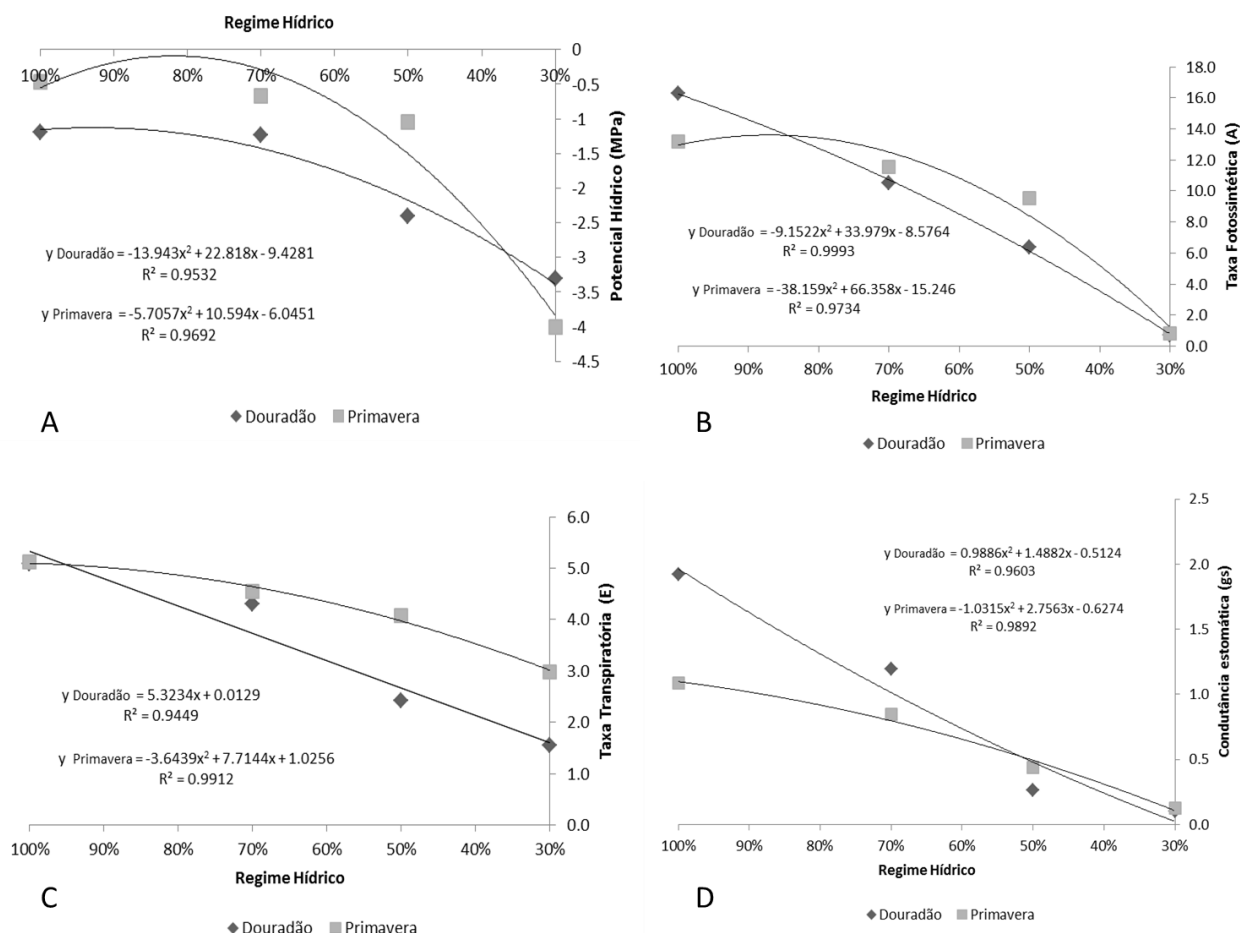


Figura 1. Atributos fisiológicos avaliados plantas de arroz de terras altas, Douradão e Primavera durante o 2º ciclo de deficiência hídrica do segundo ano de experimentação (2011). **A.** Potencial hídrico foliar Ψ_w (MPa) em função do regime hídrico imposto. **B.** Taxa fotossintética ($A - \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) em função do regime hídrico imposto. **C.** Taxa transpiratória ($E - \text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) em função do regime hídrico imposto. **D.** Condutância estomática ($g_s - \text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) em função do regime hídrico imposto.

5.4.3. Bibliotecas de RNA-seq

Foram gerados, a partir do RNA-seq das 8 bibliotecas, um total de 206.456.674 reads paired-ends (PE) de 100 pb. A cobertura total dos reads no genoma do arroz foi de aproximadamente 39 vezes, e a cobertura em relação às regiões codantes do DNA (CDS) foi de aproximadamente 166 vezes (Tabela 2).

Os reads mapeados e alinhados pelo programa TopHat totalizaram 73,6 % do número total sequenciado a partir do alinhamento das sequências de cada biblioteca. Em Douradão foram sequenciados 27.618 transcritos, sendo 24.090 (87,2 %) similares às sequências do genoma de referência Nipponbare (MSU Rice Genome version 7.0), enquanto que para Primavera foram sequenciados 27.230 transcritos, dos quais 23.663 transcritos (86,9%) apresentaram homologia ao Nipponbare.

Tabela 2. Descrição das bibliotecas sequenciadas (RNA-seq) do tecido foliar e radicular de plantas de arroz de terras altas, cultivadas sob condição normal de irrigação e sob condição de 50 % da CC, na fase reprodutiva durante seis dias.

Bibliotecas	Número de reads	Número de reads mapeados	~ Cobertura em região CDS (91MB)	~ Cobertura no genoma (389MB)
Folha – Douradão 100% de CC	26,378,165	22,063,082	24.25	5.67
Folha – Douradão 50% de CC	24,453,366	20,758,339	14.02	3.28
Folha – Primavera 100% de CC	26,194,781	21,806,511	23.97	5.60
Folha – Primavera 50% de CC	26,598,822	21,944,543	24.11	5.64
Raiz – Douradão 100% de CC	24,598,210	17,565,743	19.30	4.51
Raiz – Douradão 50% de CC	26,127,510	18,937,302	20.81	4.86
Raiz – Primavera 100% de CC	25,598,394	18,577,201	20.41	4.77
Raiz – Primavera 50% de CC	26,507,426	18,247,792	20.05	4.69
Total	206,456,674	161,900,513	166.92	39.02
Média	25,807,084	20,237,564	20.865	4.88

5.4.4. Anotação global dos genes identificados em folhas e em raízes de plantas de Douradão e de Primavera submetidas a diferentes regimes hídricos

Para acessar a informação completa das categorias funcionais dos genes encontrados nas bibliotecas de cada tecido realizou-se uma anotação global dos genes. Todos os transcritos identificados, em cada tecido vegetal, foram analisados em conjunto pelo BLAST2GO, considerando tanto o total de transcritos por cultivar (Douradão e Primavera) quanto o total de transcritos por tratamento (regime hídrico).

No tecido foliar 44.978 transcritos (39.440 identificados no genoma de referência do arroz) foram distribuídos em três categorias funcionais principais: *biological process* (com 17 subcategorias), *molecular function* (com 11 subcategorias) e *cellular component* (com 6 subcategorias). No tecido radicular 37.898 transcritos (33.642 identificados no genoma de referência do arroz) foram distribuídos em três categorias funcionais principais: *biological process* (com 17 subcategorias), *molecular function* (com 8 subcategorias) e *cellular component* com (7 subcategorias) (Figura 2).

Por meio da análise de posicionamento dos genes em rotas metabólicas verificou-se que do conjunto total de genes identificados no tecido foliar (44.978), 6.804 genes expressam 545 enzimas que estão envolvidas em 124 rotas metabólicas, enquanto que do conjunto total de genes identificados no tecido radicular (37.898), 6.578 genes expressam 513 enzimas que estão envolvidas em 124 rotas metabólicas diferentes (Tabela 3).

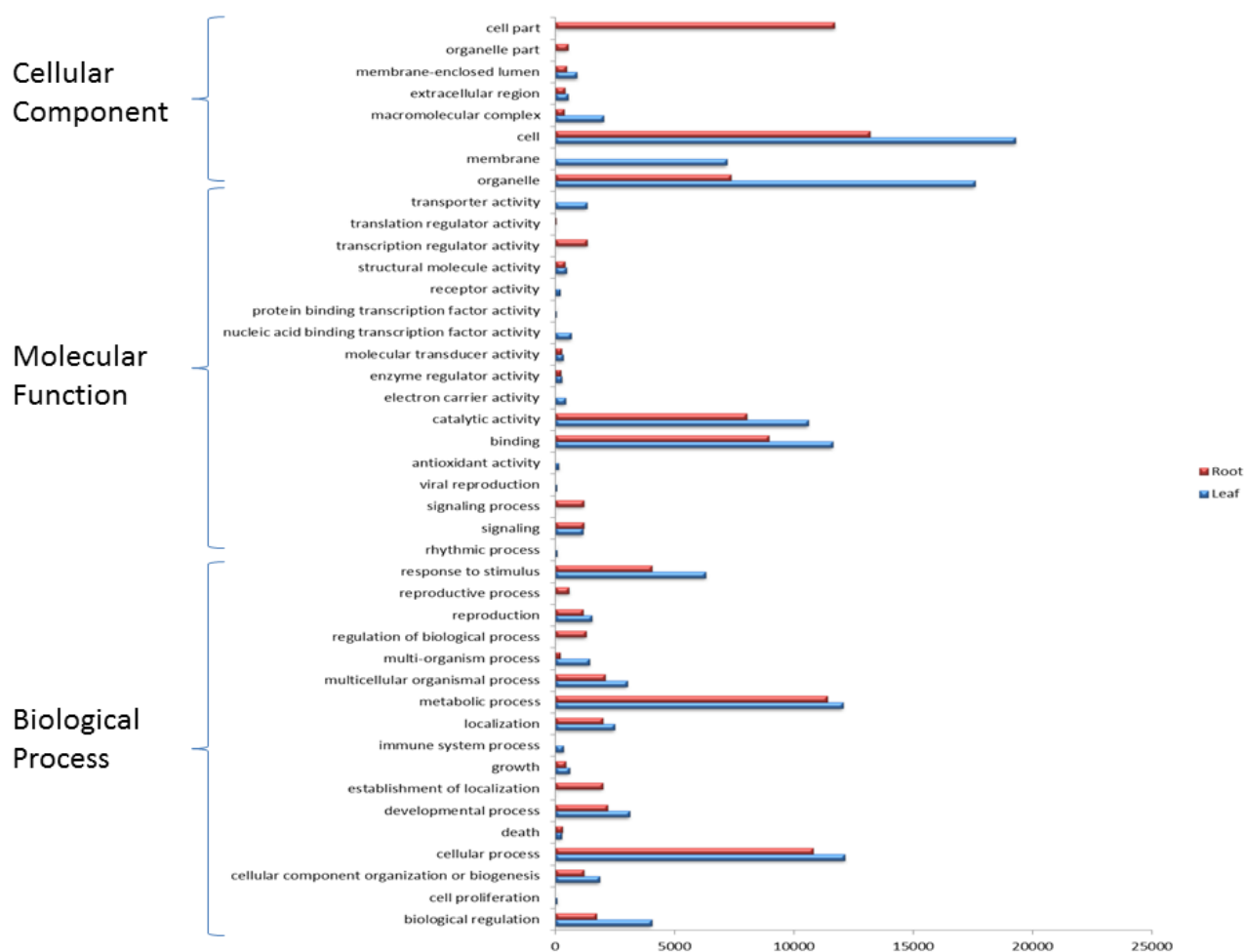


Figura 2. Classificação pelo GO dos genes identificados no tecido foliar e radicular das cultivares Douradão e Primavera submetidas ao cultivo sob condição hídrica normal (tratamento 100% de CC) e sob condição de deficiência hídrica (50 % de CC).

Tabela 3. Rotas metabólicas, anotadas pelo KEGG, com maior número de sequências obtidas de amostras de tecido foliar e radicular das cultivares Douradão e Primavera.

Rota Metabólica	Transcritos obtidos do tecido foliar	Transcritos obtidos do tecido radicular	Código da rota
Purine metabolism	457	381	ko00230
Starch and sucrose metabolism	313	298	ko00500
Methane metabolism	209	207	ko00680
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	182	119	ko00520
Thiamine metabolism	168	135	ko00730
Pyrimidine metabolism	166	123	ko00240
Phenylalanine metabolism	152	150	ko00360
Galactose metabolism	139	133	ko00052
Glycolysis / Gluconeogenesis	139	123	ko00010
Phenylpropanoid biosynthesis	126	135	ko00940
Glycerolipid metabolism	119	93	ko00561
Glutathione metabolism	118	111	ko00799
Carbon fixation in photosynthetic organisms	114	96	ko00710
Cysteine and methionine metabolism	110	97	ko00270
Pentose phosphate pathway	102	67	ko00030

Glycerophospholipid metabolism	99	83	ko00564
alpha-Linolenic acid metabolism	91	81	ko00592
Pyruvate metabolism	88	78	ko00620
Nitrogen metabolism	86	53	ko00910
Oxidative phosphorylation	86	61	ko00190

5.4.5. Identificação dos Genes Diferencialmente Expressos (GDEs)

Considerando o tecido foliar de Douradão, a comparação das plantas do tratamento controle e das submetidas à deficiência hídrica resultou na identificação de 3.554 GDEs (2.382 *upregulated* e 1.172 *downregulated*), sendo 2.988 identificados no genoma de referência do arroz. Em Primavera foram identificados 1.908 GDEs (1.519 *upregulated* e 389 *downregulated*), sendo 1.710 identificados no genoma de referência do arroz. Portanto o número de GDEs em folhas foi superior em Douradão, sendo 1.141 GDEs comuns entre as cultivares (Figura 3A).

Considerando o tecido radicular foram identificados em Douradão 840 GDEs (419 *upregulated* e 421 *downregulated*), dos quais 697 identificados no genoma de referência do arroz. Para Primavera foram identificados 1.975 GDEs (591 *upregulated* e 1.384 *downregulated*), sendo 1.709 identificados no genoma de referência do arroz. Observou-se que o número de GDEs (840) em raízes de Douradão foi inferior ao número de GDEs (1.975) em raízes de Primavera, e que 299 GDEs foram comuns entre as cultivares (Figura 3B). O número de GDEs em folhas de Primavera representou 53,7 % do total de GDEs em folhas de Douradão, enquanto que na raiz o número de GDEs em Douradão representou 42,5 % do total de GDEs de Primavera.

Considerando o número de GDEs em tecido foliar entre Douradão e Primavera na condição de cultivo sob restrição hídrica (50% CC) foram identificados 1.299 GDEs (808 *upregulated* e 491 *downregulated* em Douradão), sendo 1.184 identificados no genoma de referência do arroz. No tecido radicular foram identificados 1.263 GDEs (628 *upregulated* e 635 *downregulated* em Douradão), sendo 1.208 identificados no genoma de referência do arroz. O número de GDEs, entre as cultivares, nas folhas foi similar ao número de GDEs em raiz, e somente 115 GDEs foram comuns entre os tecidos (Figura 3C).

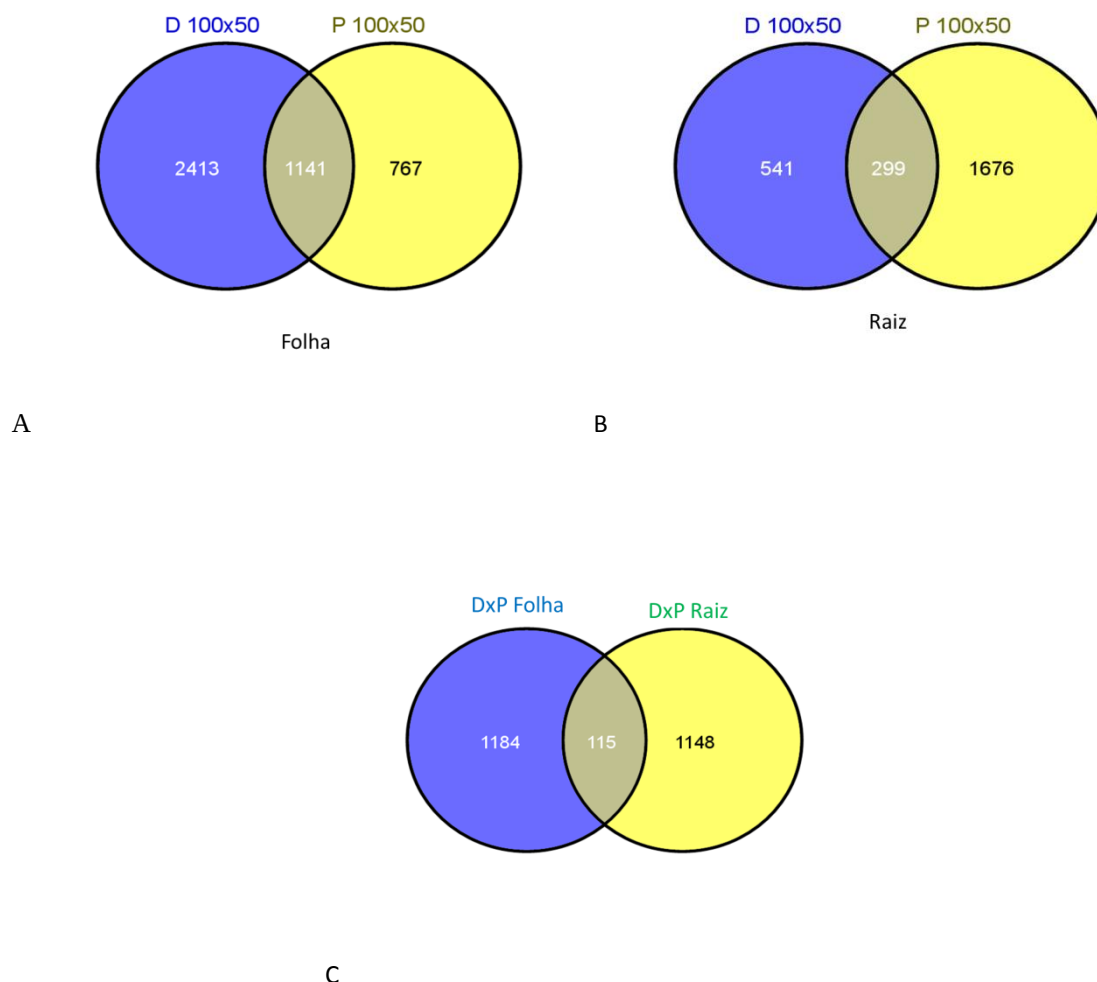


Figura 3. Diagramas de Venn representando os genes diferencialmente expressos (GDEs). **A:** GDEs nas folhas das plantas de Douradão e de Primavera, cultivadas sob condição hídrica normal (100% de CC) e sob condição de deficiência hídrica (50% de CC). **B:** GDEs nas raízes das plantas de Douradão e de Primavera, cultivadas sob condição hídrica normal (100% de CC) e sob condição de deficiência hídrica (50% de CC). **C:** GDEs identificados nas folhas e nas raízes de plantas de Douradão e Primavera, cultivadas sob deficiência hídrica (50% de CC). As letras “D” e “P” indicam, respectivamente, Douradão e Primavera.

5.4.6. Anotação funcional dos GDEs em folhas de plantas de Douradão e de Primavera submetidas a diferentes regimes hídricos

No tecido foliar de Douradão, dos 2.988 GDEs identificados, 2.057 foram anotados pelo GO com 13 subcategorias enriquecidas (Figura 4), dentre as quais se destacam *metabolic process* (1.247), *catalytic activity* (921) e *response to stimulus* (543). No tecido foliar de Primavera, dos 1.710 GDEs identificados, 1.203 foram anotados pelo GO com 11 subcategorias enriquecidas, dentre as quais se destacam *catalytic activity* (535), *response to stimulus* (360) e *response to stress* (265).

Em folhas de Douradão, dentre os genes da subcategoria *metabolic process*, 757 foram *upregulated* e 489 foram *downregulated* quando as plantas foram cultivadas sob deficiência hídrica. Dentre os genes *upregulated*, a maioria está envolvida em *primary metabolic process* (488), *nucleotide and nucleic acid metabolic process* (205) e *protein modification process* (125). Dentre os genes *downregulated*, 12 estão envolvidos no processo fotossintético: *chlorophyll A-B binding protein* (LOC_Os01g41710.1, LOC_Os01g52240.1 e LOC_Os02g52650.1 – Figura 5), *2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain containing protein* (LOC_Os07g30670.1), *ATP synthase F1, delta subunit family protein* (LOC_Os02g51470.3), *NADPH-dependent oxidoreductase* (LOC_Os10g38206.1), *pyrophosphate--fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit alpha* (LOC_Os02g48360.1), *ribose-5-phosphate isomerase A* (LOC_Os07g08030.1), *thylakoid lumen protein* (LOC_Os05g33280.1) e *expressed protein* não caracterizadas (LOC_Os02g51020.1, LOC_Os07g28610.1 e LOC_Os08g17390.1). Entre os 12 genes *downregulated* destacam-se três envolvidos em rotas metabólicas: (a) *chlorophyll A-B binding protein*, localizados na rota *Photosynthesis – antenna proteins*; (b) *ATP synthase F1, delta subunit family protein*, na *Oxidative phosphorylation* e na *Photosynthesis*; e (c) *Ribose-5-phosphate isomerase precursor*, na *Pentose phosphate pathway*, *Biosynthesis of amino acids*, *Carbon metabolism* e *Carbon fixation in photosynthetic organisms*.

Em Douradão e Primavera a subcategoria *catalytic activity* foi representada por 921 genes (546 *upregulated* e 374 *downregulated*) e 535 genes (441 *upregulated* e 93 *downregulated*), respectivamente. Grande parte dos genes dessa subcategoria, para ambas as cultivares, são relacionados às proteínas kinase, dos quais 80 genes foram *upregulated* e 106 *downregulated* sob condição de deficiência hídrica em Douradão, e 56 genes foram *upregulated* e 21 *downregulated* sob condição de deficiência hídrica em Primavera. Porém, somente entre os genes *upregulated* de Douradão foram observados genes de *serine/threonine-protein kinase* (LOC_Os01g04580.1, LOC_Os01g04460.1, LOC_Os09g12240.1, LOC_Os08g25380.1 e LOC_Os05g42210.1).

Dentre os 543 genes de Douradão e os 360 genes de Primavera associados a subcategoria *response to stimulus*, 264 genes (179 *upregulated* e 85 *downregulated*) de Douradão e 186 genes (169 *upregulated* e 17 *downregulated*) de Primavera, foram classificados em *response to abiotic stress*. Dentre os genes *upregulated* em *response to abiotic stress*, destacam-se aqueles que expressam as proteínas: *glycosyl hydrolase*, *hsp20/alpha crystallin family protein*, *glycosyl hydrolases family 17*, *protein phosphatase 2C*, *late embryogenesis abundant protein – LEA* e *HVA22*. Nenhum desses genes está envolvido em rotas metabólicas descritas pelo KEGG.

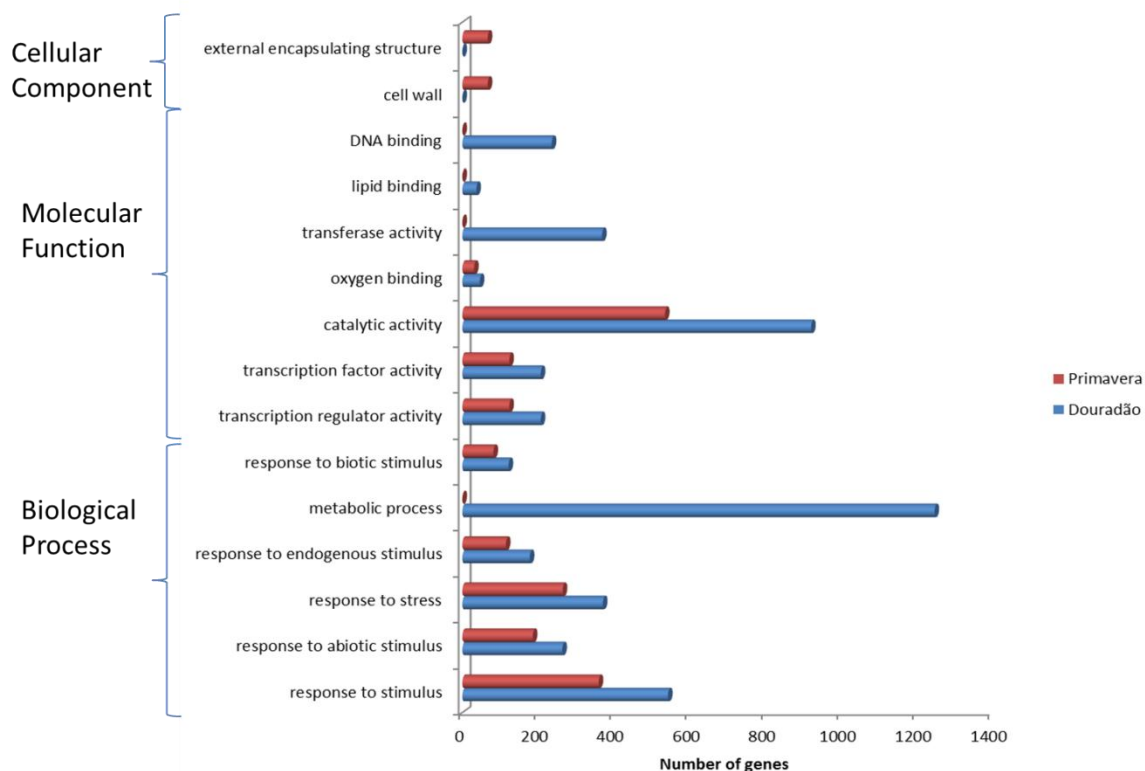


Figura 4. Classificação dos genes diferencialmente expressos no tecido foliar de Douradão e Primavera enriquecidos pelos termos do Gene Ontology. Os genes estão distribuídos em diferentes subcategorias dentro das três categorias funcionais principais: *Biological Process*, *Cellular Component* e *Molecular Function*.

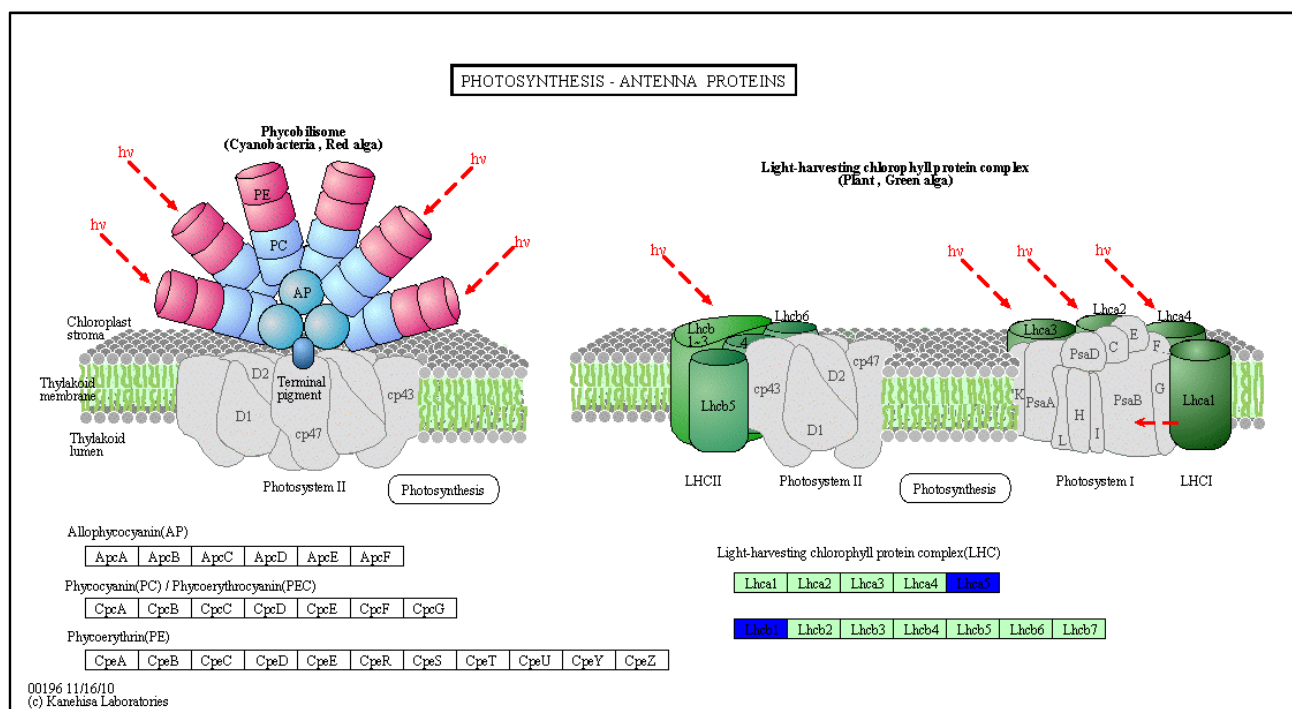


Figura 5. Genes diferencialmente expressos, identificados como *chlorophyll A-B binding protein* atuantes na *Photosynthesis – Antenna Proteins*, em folhas de plantas de Douradão e Primavera, a diferentes regimes hídricos. As caixas azuis indicam os genes identificados na rota metabólica *Photosynthesis – Antenna Proteins*. A proteína Lhcb1 é relacionada aos genes LOC_Os01g41710.1 e LOC_Os02g52650.1, os quais expressam a *light-harvesting complex II chlorophyll a/b binding protein 1*. A proteína Lhcb5 é relacionada ao gene LOC_Os01g52240.1, que expressa a *light-harvesting complex II chlorophyll a/b binding protein 5*.

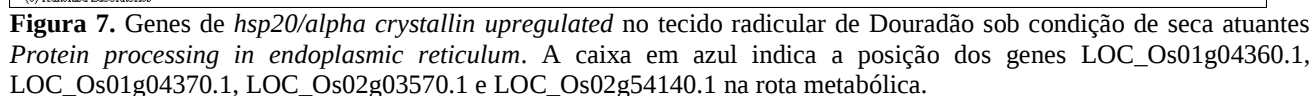
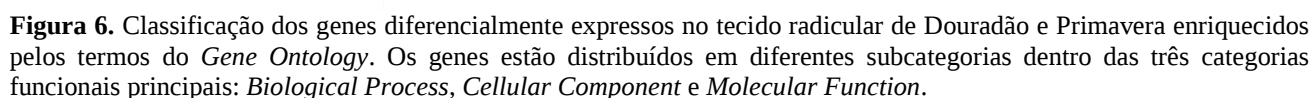
5.4.7. Anotação funcional dos GDEs identificados em raízes de plantas de Douradão e de Primavera submetidas a diferentes regimes hídricos

A anotação funcional dos genes diferencialmente expressos no tecido radicular de cada cultivar procedeu-se de maneira similar à anotação dos genes identificados no tecido foliar. Dos 697 GDEs identificados no tecido radicular de plantas de Douradão, considerando o tratamento-controle e o de restrição hídrica, 514 foram anotados pelo GO com cinco subcategorias enriquecidas (Figura 6), dentre as quais se destacaram as mais significantes: *response to stimulus* (150), *response to stress* (101) e *response to abiotic stimulus* (70). Em Primavera, dos 1.709 GDEs identificados no tecido radicular, 1.186 foram anotados pelo GO com 15 subcategorias enriquecidas, dentre as quais se destacaram: *metabolic process* (739), *catalytic activity* (565) e *response to stimulus* (378).

Em Douradão, dos 150 GDEs observados em *response to stimulus*, 70 foram anotados em *response to abiotic stimulus* (38 *upregulated* e 32 *downregulated*). Dentre os genes *upregulated* identificados, quatro genes expressam proteínas da família *hsp20/alpha crystallin* (LOC_Os01g04360.1, LOC_Os01g04370.1, LOC_Os02g03570.1 e LOC_Os02g54140.1) e quatro genes expressam proteínas do tipo *late embryogenesis* (LEA) (LOC_Os04g49980.1, LOC_Os08g23870.1 e LOC_Os01g12580.1). Entre os *downregulated*, três genes expressam *cysteine-rich repeat secretory protein 55 precursor* (LOC_Os08g04210.1, LOC_Os08g04240.1 e LOC_Os08g04250.1). Para Primavera, considerando a mesma subcategoria, dos 378 GDEs 87 foram *upregulated* e 291 foram *downregulated* nas plantas cultivadas sob baixa disponibilidade hídrica. Dentre os *downregulated* destacaram-se 32 genes que expressam *peroxidase precursor protein*.

Dos 150 genes relacionados à *response to stimulus*, quatro genes de *hsp20/alpha crystallin* foram *upregulated*, identificados em raízes de plantas de Douradão, foram anotados na rota metabólica de *Protein processing in endoplasmic reticulum* (Figura 7). Dos 32 genes *downregulated* da *peroxidase precursor protein* identificados no tecido radicular de Primavera, 11 foram anotados em três rotas metabólicas: *Biosynthesis of secondary metabolites*, *Phenylalanine metabolism* e *Phenylpropanoid biosynthesis*.

Adicionalmente, em raízes de plantas de Primavera foram encontrados 739 genes associados a subcategoria funcional *metabolic process*, dos quais 167 foram *upregulated* e 572 *downregulated*. Pode-se destacar quatro genes *upregulated* e 34 genes *downregulated* da *cytochrome P450*. Adicionalmente foi identificado um grande número de genes *downregulated* na subcategoria enriquecida *catalytic activity*, dos quais 83 genes foram associados às proteínas kinases, sendo 16 genes *upregulated* e 67 genes *downregulated*.



5.4.8. Fatores de Transcrição identificados em folhas e em raízes de plantas de Douradão e de Primavera submetidas a diferentes regimes hídricos

Nas folhas de plantas de Douradão, entre os genes *upregulated* se destacaram as famílias de fatores de transcrição com maior número de genes: MYB *family transcription factor* (16 ocorrências), WRKY *family transcription factor* (10), AP2 *domain containing protein* (9), *ethylene-responsive transcription factor – ERFs* (5), bZIP *transcription factor domain containing protein* (4) e bZIP *transcription factor* (3). Em folhas de plantas de Primavera cultivadas sob baixa disponibilidade hídrica destacaram-se 106 genes *upregulated*, sendo as famílias AP2 *domain containing protein* (13), MYB *family transcription factor* (8), WRKY (8) e C2H2 *zinc finger* (8) com maior número de genes. Nenhum desses genes estão envolvido em rotas metabólicas descritas pelo KEGG.

Nas raízes de Douradão, entre os genes *upregulated* identificados estão os fatores de transcrição bZIP *transcription factor domain containing protein* (LOC_Os11g05640.1), *dehydration-responsive element-binding protein – DREB* (LOC_Os10g38000.1) e MYB *family transcription factor* (LOC_Os03g04900.1). Em raízes de plantas de Primavera, entre os genes *upregulated* estão as famílias de fatores de transcrição MYB (5 ocorrências) e WRKY (2).

5.4.9. Anotação funcional dos GDEs entre plantas de Douradão e de Primavera cultivadas sob deficiência hídrica

No tecido foliar, dos 1.184 GDEs identificados entre as duas cultivares, 1.007 foram anotados pelo GO com 10 subcategorias enriquecidas (Figura 8), dentre as quais se destacaram *metabolic process* (619), *response to stimulus* (274) e *response to stress* (178). Em raiz, dos 1.148 GDEs identificados entre as duas cultivares, 799 foram anotados pelo GO com 12 subcategorias enriquecidas, dentre as quais se destacaram *metabolic process* (517), *catalytic activity* (426) e *response to stimulus* (239).

No tecido foliar, 619 GDEs entre as duas cultivares que foram anotados na subcategoria *metabolic process*, 364 foram *upregulated* e 255 *downregulated* em Douradão. Entre os genes dessa subcategoria 228 genes *upregulated* e 168 genes *downregulated* foram relacionados ao metabolismo de nucleotídeos e ácidos nucleicos.. Ainda com relação à na subcategoria *metabolic process*, no tecido radicular, dos 517 GDEs anotados, 357 foram *upregulated* e 160 *downregulated* em Douradão. Entre os genes dessa subcategoria foram envolvidos no metabolismo de proteínas 194 genes *upregulated* e 168 genes *downregulated*.

No tecido foliar, dos 119 GDEs identificados entre as duas cultivares, 65 foram *upregulated* e 54 *downregulated* em plantas de Douradão, e anotados na subcategoria *response to stimulus*. Dentre os genes *upregulated*, àqueles identificados em rotas metabólicas, descritas pelo KEGG, foram: (a) *asparagine synthetase* (LOC_Os03g18130.1) em *asparagine biosynthesis I* e *asparagine biosynthesisIII*; (b) *phenylalanine ammonia-lyase* (LOC_Os02g41680.1) em *suberin biosynthesis*, *phenylpropanoid biosynthesis* e *salicylate biosynthesis*; (c) *enolase* (LOC_Os03g14450.1) em *sucrose degradation to ethanol and lactate (anaerobic)*, *glycolysis I*, *gluconeogenesis* e *glycolysis IV (plant cytosol)*; (d) *superoxide dismutase* (LOC_Os06g02500.1) em *removal of superoxide radicals*; e (e) *beta-amylase* (LOC_Os10g41550.1) em *starch degradation*.

Em raiz, dos 1.148 GDEs identificados entre as duas cultivares, na subcategoria *response to abiotic stimulus* foram identificados 60 genes, sendo 44 *upregulated* e 16 *downregulated* em plantas de Douradão (Tabela 3). Dentre os genes *upregulated*, cinco foram identificados em rotas metabólicas descritas pelo KEGG.: (a) *3-ketoacyl-CoA synthase* (LOC_Os02g49920.1), *lactate/malate dehydrogenase* (LOC_Os06g01590.1), *inositol-3-phosphate synthase* (LOC_Os10g22450.1) e *chalcone synthase* (LOC_Os11g32650.1), envolvidos na *Biosynthesis of secondary metabolites*; (b) *lactate/malate dehydrogenase* em *Propanoate metabolism*, *Cysteine and methionine metabolism*, *Glycolysis/Gluconeogenesis* e *Pyruvate metabolism*; (c) *chalcone synthase* em *Flavonoid biosynthesis* e *Circadian rhythm – plant*; (d) *lipoxygenase, chloroplast precursor* (LOC_Os08g39840.1) em *linolenic acid metabolism* e *linoleic acid metabolism*; (e) *3-ketoacyl-CoA synthase* em *Fatty acid elongation*; e (f) *inositol-3-phosphate synthase* em *inositol phosphate metabolism*.

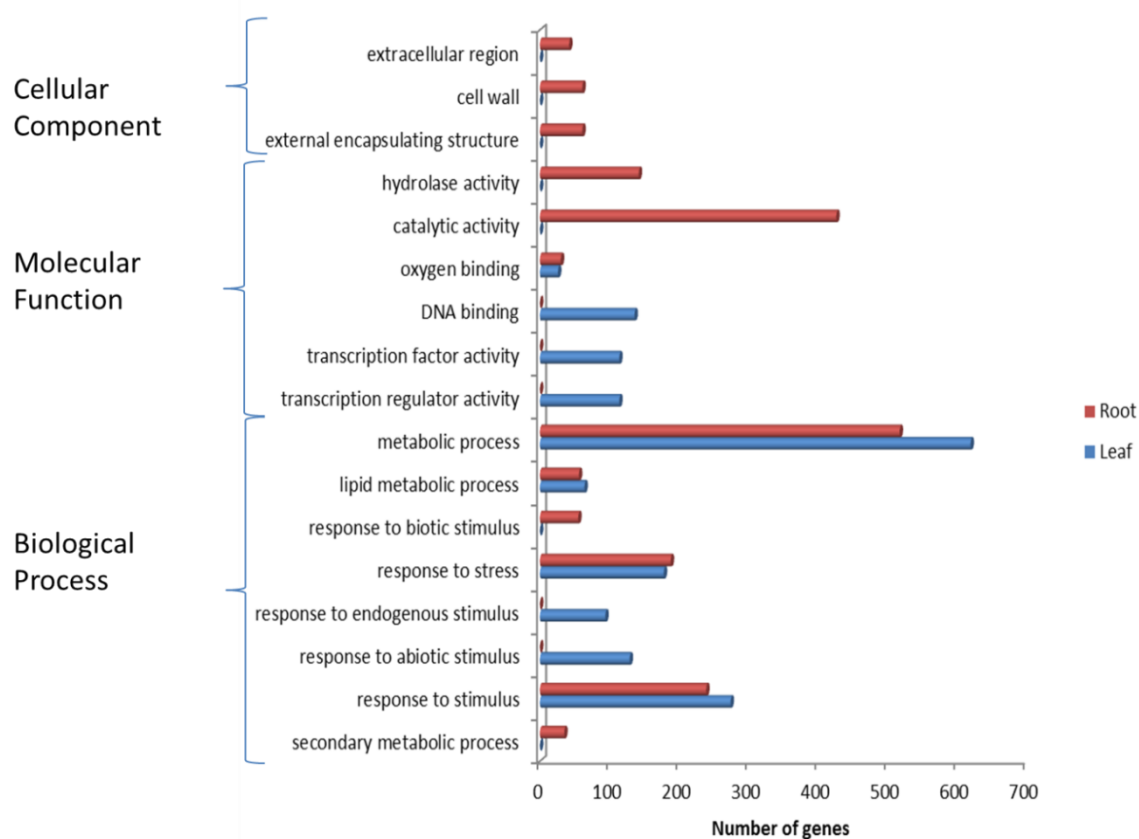
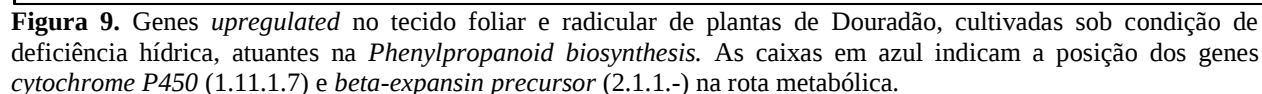


Figura 8. Classificação dos genes diferencialmente expressos entre Douradão e Primavera no tecido foliar e radicular enriquecidos pelos termos do *Gene Ontology*. Os genes estão distribuídos em diferentes subcategorias dentro das três categorias funcionais principais: *Biological Process*, *Cellular Component* e *Molecular Function*.

Entre os tecidos foliar e radicular foram compartilhados 115 GDEs, dos quais nove foram identificados em rotas metabólicas descritas pelo KEGG (Tabela 4). Dentre esses, seis foram *upregulated* tanto em folhas quanto em raízes: *lipoxygenase* (LOC_Os03g52860.1), *uncharacterized glycosyltransferase* (LOC_Os07g10840.1), *glutathione S-transferase* (LOC_Os10g38160.1), *haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 3* (LOC_Os02g07730.1), *cytochrome P450* (LOC_Os06g30640.1) e *beta-expansin precursor* (LOC_Os09g29710.1). Os dois últimos genes atuam na *Phenylpropanoid biosynthesis*, única rota com mais de um gene *upregulated* (Figura 9).

Tabela 4. Genes diferencialmente expressos comuns entre os tecidos foliar e radicular de Douradão e Primavera, e relacionados a rotas metabólicas descritas pelo KEGG.

Gene model	Protein name	Leaf	Root	Pathway 1	Pathway 2	Pathway 3
LOC_Os01g45110.1	anthocyanin 3-O-beta-glucosyltransferase	Up	Up	Zeatin biosynthesis		
LOC_Os01g45140.1	anthocyanin 3-O-beta-glucosyltransferase	Up	Down	Zeatin biosynthesis		
LOC_Os02g07730.1	haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 3	Up	Up	Biosynthesis of secondary metabolites	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	
LOC_Os03g52860.1	lipoxygenase	Up	Up	Linoleic acid metabolism		
LOC_Os06g30640.1	cytochrome P450	Up	Up	Phenylpropanoid biosynthesis	Phenylalanine metabolism	
LOC_Os07g10840.1	uncharacterized glycosyltransferase	Up	Up	Galactose metabolism		
LOC_Os09g29710.1	beta-expansin precursor	Up	Up	Phenylpropanoid biosynthesis		
LOC_Os10g38160.1	glutathione S-transferase	Up	Up	Glutathione metabolism	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	Drug metabolism - cytochrome P450
LOC_Os12g19381.1	ribulose biphosphate carboxylase small chain (chloroplast precursor)	Up	Down	Carbon fixation in photosynthetic organisms	Carbon metabolism	



ortólogos de *A. thaliana*, sendo oito genes ainda não anotados para o genoma de arroz. Desses, quatro genes (*P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein* (AT1G21730.1), *Chitinase family protein* (AT2G43590.1), *debranching enzyme 1* (AT4G31770.1) e PETD – *photosynthetic electron transfer D* (ATCG00730.1) foram anotados, pelo GO, na subcategoria *other cellular processes*, mas não foram identificados em rotas metabólicas.

Em raízes de Douradão foram identificados 517 genes ortólogos de *Arabidopsis thaliana*, e apenas dois genes não foram ainda anotados para o genoma de arroz. Desses dois, o gene (ATMCM8 – *minichromosome maintenance 8* (AT3G09660.1) foi anotado, pelo GO, na subcategoria *pollen development* e *DNA replication initiation*, mas não foi identificado em rota metabólica. Em raízes de Primavera foram identificados 1.231 genes ortólogos de *Arabidopsis thaliana*, dos quais cinco genes não foram ainda anotados para o genoma de arroz. Desses, dois genes, *Arabinogalactan protein 23* (AT2G41905.1) e *Protein of unknown function*, DUF3414 (AT4G38760.1), foram anotados pelo GO, na subcategoria *other cellular processes*, mas não foram posicionados em rota metabólica.

5.4.11. RT-qPCR

Análises de RT-qPCR foram realizadas com seis genes identificados nos tecidos foliar e radicular para validar o padrão de expressão obtido pelo RNA-seq (Tabela suplementar 1). Dos seis genes avaliados, cinco foram *upregulated* no tecido foliar de Douradão submetidas à condição de seca, os quais tiveram padrões de expressão em RT-qPCR similares àqueles obtidos no RNA-seq (Figura 10). Apenas o gene da *beta-expansin precursor* (LOC_Os09g29710.1) foi *downregulated* (-5.64 vezes) em RT-qPCR, contrariamente ao que foi detectado no RNA-seq. Ao avaliar a expressão dos seis genes no tecido radicular de plantas de Douradão submetidas à condição de seca, por RT-qPCR, quatro genes foram *upregulated* (LOC_Os12g19381.1, LOC_Os07g10840.1, LOC_Os06g30640.1 e LOC_Os02g07730.1) e dois genes *downregulated* (LOC_Os01g45140.1 e LOC_Os09g29710.1). O gene da *ribulose biphosphate carboxylase small chain, chloroplast precursor* (LOC_Os12g19381.1), *anthocyanin 3-O-beta-glucosyltransferase* (LOC_Os01g45140.1) e *beta-expansin precursor* (LOC_Os09g29710.1) apresentaram padrão de expressão diferenciado entre as análises de RT-qPCR e RNA-seq.

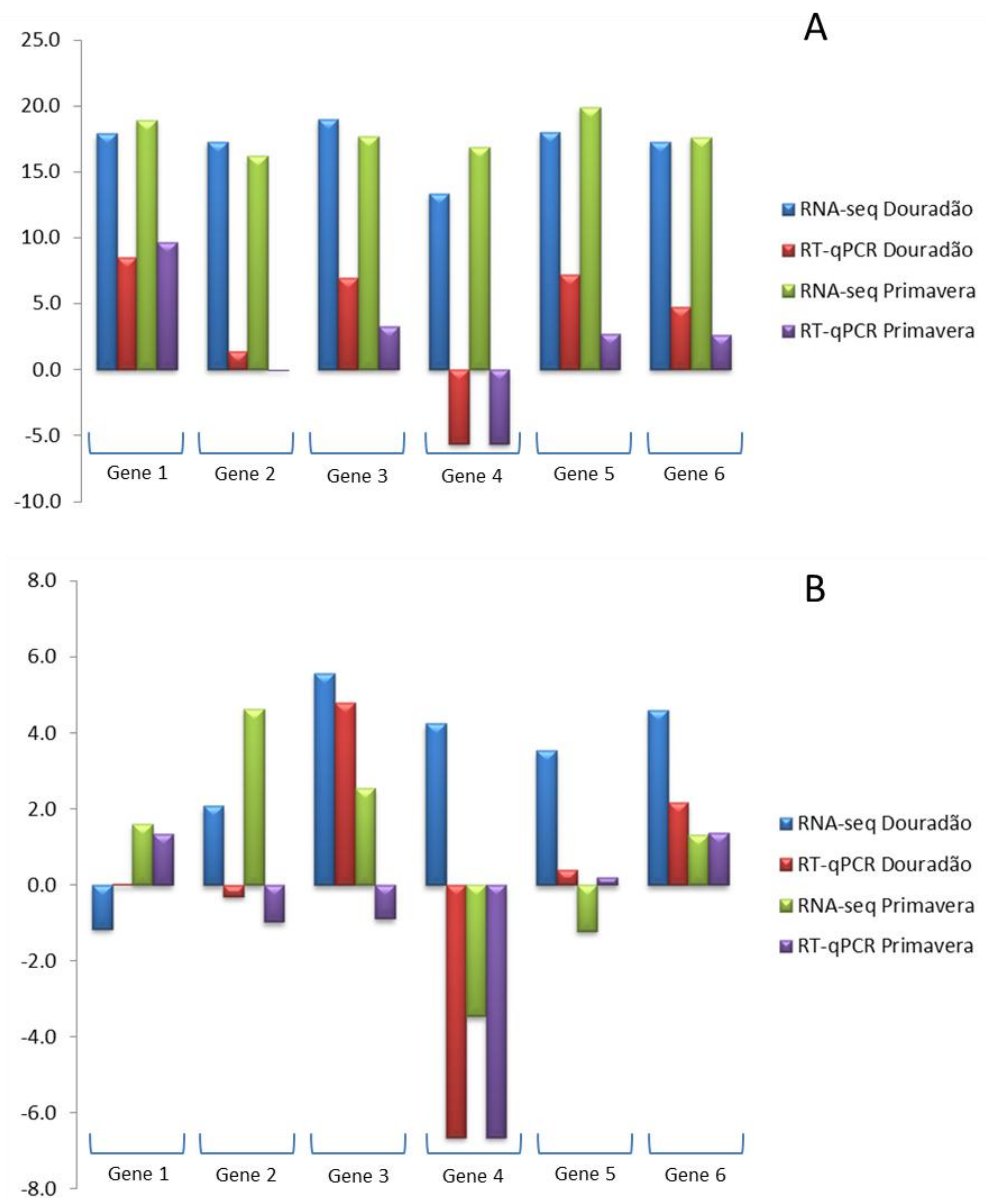


Figura 10. Níveis de expressão dos seis genes validados por RT-qPCR. RNA-seq e RT-qPCR indicam a diferença de expressão do gene entre o tratamento de seca (50% de Capacidade de Campo) e o controle (100% de Capacidade de Campo) das cultivares Douradão e Primavera. Gene 1= LOC_Os12g19381.1, Gene 2= LOC_Os01g45140.1, Gene 3= LOC_Os07g10840.1, Gene 4= LOC_Os09g29710.1, Gene 5= LOC_Os06g30640.1 e Gene 6= LOC_Os02g07730.1.

5.5. DISCUSSÃO

As plantas são capazes de responder e adaptar-se a diversas mudanças ambientais até mesmo com a manutenção de alto potencial produtivo (Ahuja et al., 2010). Esse fato se deve, à regulação da expressão gênica, em nível transcricional e pós-transcricional. O presente estudo viabilizou a identificação, via RNA-seq, de genes diferencialmente expressos em dois tecidos (foliar e radicular) na fase reprodutiva das cultivares Douradão (tolerante à seca) e Primavera (sensível).

Os resultados fisiológicos indicaram que plantas de Douradão perceberam a baixa disponibilidade de água no solo mais acentuadamente do que plantas de Primavera, uma vez que foi observada uma redução mais significativa em suas taxas fotossintética e transpiratória seis dias após o corte da irrigação em Douradão. Isso sugere que eventos de percepção e sinalização são prováveis de ocorrerem mais lentamente em plantas de Primavera. Aliado a isso, o fato de plantas de Douradão terem apresentado redução mais acentuada na condutância estomática, comparativamente à cultivar Primavera, em condições de deficiência hídrica, apoia a hipótese de que aquela cultivar deva possuir mecanismos de otimização de utilização de CO₂ fixado para produção de sementes (Cuellar-Ortiz et al., 2008), já que apresentou uma menor redução da produtividade mesmo sob condição de estresse de seca quando comparada à redução observada na cultivar suscetível Primavera. De acordo com Chaves and Oliveira (2004), o decréscimo na taxa fotossintética, em condições de campo, em resposta à deficiência hídrica atmosférica ou edáfica é, primariamente, devido ao fechamento estomático. Segundo Acosta et al. (2009), o fechamento estomático pode ocorrer anteriormente à alterações do *status* hídrico foliar, o que sugere a existência de uma comunicação antecipada entre parte aérea e o sistema radicular, quando da desidratação do solo, por mediadores como o fitormônio ácido abscísico (ABA), conhecido como o principal fator que controla a abertura e fechamento estomático (Lizana et al., 2006). Fitormônios como ABA e etileno têm sido relacionados com a sinalização raiz-caule isoladamente ou simultaneamente, tornando-se importantes controladores do metabolismo de plantas sob condições adversas de crescimento, tais como baixa disponibilidade de água e aumento da concentração de ozônio na atmosfera (Wilkinson and Davies, 2010).

O estudo de diferenças entre genótipos contrastantes quanto à tolerância ao déficit hídrico, nos níveis fisiológicos, bioquímico, e de expressão gênica, pode produzir informações

valiosas sobre importantes mecanismos de tolerância a esse tipo de estresse. Com o objetivo de conhecer melhor o comportamento de duas cultivares de arroz de terras altas, o presente trabalho obteve um total de 206.456.674 *reads paired-ends* (PE) de 100 pb provenientes de 8 bibliotecas do tecido foliar e radicular de Douradão e Primavera, sendo detectados no total por cultivar, respectivamente, 39.440 e 33.642 transcritos homólogos à sequências do banco de dados do genoma de arroz. Além disso, 54 % dos transcritos do tecido foliar e 71 % dos transcritos do tecido radicular de arroz foram homólogos a sequências da espécie modelo *Arabidopsis thaliana*, o que permite inferir que essa espécie modelo pode auxiliar no entendimento da expressão gênica de arroz com relação aos genes ortólogos identificados entre essas espécies.

A comparação da expressão gênica entre os dois tratamentos de disponibilidade hídrica revelou que Douradão apresentou uma quantidade de GDEs maior que Primavera no tecido foliar, sendo a maioria desses *upregulated* para as duas cultivares. Contrariamente, um número muito maior de genes foi identificado no tecido radicular de Primavera do que em Douradão, sendo a maioria desses *downregulated* em Primavera. As maiores diferenças entre Douradão e Primavera podem estar relacionadas a expressão de genes na raiz, principal local de percepção do sinal do estresse e de início de cascata de expressão gênica em resposta à seca (Périn et al., 2004; Rabello et al., 2008).

5.5.1. Genes identificados entre os tratamentos da cultivar tolerante à seca

A anotação funcional dos GDEs do tecido foliar de Douradão identificou genes previamente envolvidos em rotas metabólicas importantes associadas a mecanismos de resposta à seca nas plantas. Porém, a maioria desses genes foram *downregulated* sob condição de deficiência hídrica. Dentre esses, três genes que expressam uma proteína de ligação à *chlorophyll A-B* foram associadas a rota de *Photosynthesis – antenna proteins*. Essas proteínas, também chamadas de *chlorophyll a/b-binding protein* (LHCP), são as mais abundantes no cloroplasto das plantas, cuja função é recolher e transferir a energia da luz para os centros de reação de fotossíntese (Bellafiore et al., 2005; Niyogi et al., 2005). Outros genes atuantes na fotossíntese foram *downregulated* em Douradão sob condição de seca, como os genes da proteína *2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain*, as quais atuam como carreadoras de elétrons na cadeia de transporte de elétrons fotossintética; *ATP synthase F1 – delta subunit family protein*, enzima atuante na matriz mitocondrial que fornece energia para a síntese de ATP; *ribose-5-phosphate*

isomerase A, enzima que catalisa a conversão entre a ribose-5-fosfato (R5p) e 5-fosfato de ribulose (Ru5P) *thylakoid lumen protein*. Esses resultados, aliados aos atributos fisiológicos avaliados nesse trabalho, sugerem que um dos mecanismos de tolerância à seca da cultivar Douradão pode estar relacionado a redução da expressão de genes relacionados à fotossíntese durante o estresse, e que pode ser resultante do fechamento estomático provocado pela seca (Benešová et al., 2012). A análise de expressão gênica por RNA-seq indicou que a maioria dos genes *downregulated* nas folhas de plantas do Douradão participam da fase fotoquímica da fotossíntese. Parte da inibição das taxas fotossintéticas pode ser atribuída a fatores não estomáticos, como problemas no transporte de elétrons e na fotofosforilação (Flexas et al., 2006). A redução na síntese de ATP – uma resposta inicial à deficiência hídrica – pode diminuir a capacidade de regeneração da ribulose bifosfato (RuBP), o que reduz a fotossíntese potencial (Lawlor and Tezara, 2009; Pinheiro and Chaves, 2011). Os resultados indicam também que Douradão pode ter reduzido a sua maquinaria fotossintética relacionada à cadeia de transporte de elétrons localizada na membrana tilacoidal, após a ocorrência de falta de água, com o objetivo de minimizar a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), moléculas altamente prejudiciais, quando em excesso, para as células.

Os mecanismos de controle molecular da tolerância a estresses abióticos são baseados na ativação e regulação de genes específicos (Wang et al., 2003), e são classificados em duas principais categorias: (1) genes envolvidos nas cascatas de sinalização, (2) genes que funcionam diretamente na proteção de membranas e proteínas, como proteínas heatshock (HSPs) e chaperonas, e proteínas LEA (late embryogenesis abundant) (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

O primeiro grupo é composto por genes envolvido na transdução de sinais, como os fatores de transcrição que desempenham papel fundamental na resposta da planta ao estresse, e incluem ainda as proteínas kinases, fosfatases, enzimas envolvidas no metabolismo de fosfolipídeos, e outras moléculas sinalizadoras (Seki et al., 2003; Maruyama et al., 2004). Muitos fatores de transcrição são induzidos pelo estresse, sugerindo que diferentes mecanismos regulatórios transcricionais podem funcionar regulando a sinalização das vias de transdução ao estresse de seca, frio ou salinidade (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Nesse estudo, vários genes relacionados à diferentes famílias de fatores transcrição foram *upregulated* nas folhas e nas raízes de Douradão. Dentre esses foram identificados alguns genes expressando

famílias de AP2, DREB, ERF, MYB, WRKY e bZIP, as quais desempenham papel importante nas plantas por regular a expressão de genes alvos de resposta à estresse (Ahuja et al. 2010). Essas famílias podem ser subdivididas em ABA dependente (MYB e bZIP) e independente (AP2, DREB e ERF). Vários genes pertencentes às famílias MYB e bZIP no tecido foliar de Douradão e apenas um de cada no tecido radicular, foram *upregulated* sob condição de déficit hídrico. A superexpressão de genes dessas famílias de fatores de transcrição em arroz tem sido associada ao aumento de tolerância à seca, ao congelamento e a altos níveis de salinidade (Dai et al., 2012; Xing et al., 2008). Os fatores de transcrição DREB (*Dehydration Responsive Element Binding proteins*) estão incluídos na superfamília AP2/ERF, a qual é caracterizada pela presença do domínio de ligação ao DNA AP2/ERF, exclusivo dos vegetais (Riechmann et al., 2000; Hake, 2004). A superexpressão de alguns DREBs tem sido relacionada à regulação de alguns genes alvos na tolerância à diversos estresses abióticos, principalmente proteínas protetoras de membranas e chaperonas (Wang et al., 2008; Matsukura et al., 2010).

Diversos genes relacionados à síntese de proteínas kinase foram identificadas nas folhas de Douradão sob deficiência hídrica, sendo a maioria relacionada a genes *downregulated*. Todavia, os genes de *serine/threonine-protein kinase* foram exclusivamente identificados como *upregulated*. Essas são proteínas kinase dependente de Ca^{2+} (*Ca²⁺ dependent protein kinases* – CDPKs), reconhecidamente envolvidas na sinalização induzida por estresse abiótico (Saijo et al., 2000; Romeis et al., 2001; Taiz and Zeiger, 2002). Estudos têm mostrado que as CDPKs atuam na linha de frente da percepção do estresse e sinalizam para a expressão de genes de resposta à seca em diversas espécies de plantas (Boudsocq, 2012; Chen et al., 2013). A superexpressão de genes que codificam proteínas regulatórias, como as CDPKs, em genótipos sensíveis ao déficit hídrico, pode ser uma estratégia promissora para obter cultivares de arroz de terras altas tolerantes à seca.

O segundo grupo de genes atuantes em resposta à seca é constituído por aqueles que codificam proteínas protetoras das células dos danos causados pelo déficit hídrico. Nesse grupo foram identificados os seguintes genes *upregulated* no tecido foliar e radicular de Douradão: *hsp20/alpha crystallin family protein*, *protein phosphatase 2C*, *late embryogenesis abundant protein* – LEA e HVA22. As *hsp20/alpha crystallin family protein* são consideradas proteínas funcionais após a percepção do estresse nas plantas, e seu papel na rota *Protein processing in endoplasmic reticulum* pode estar associada à proteção, modificação conformacional,

endereço, degradação e estabilização de várias proteínas sob condições de estresse (Rowley and Mockler, 2011). A expressão de grande parte das proteínas funcionais pode ser associada à presença de ABA, a qual atua na regulação de processos fisiológicos e na expressão de diversos genes em resposta ao déficit hídrico (Chandler and Robertson, 1994; Bray, 2002). A regulação positiva da expressão de alguns tipos de *phosphatase 2C* tem sido associada ao aumento da concentração de ABA no tecido foliar de plantas arroz (Xue et al., 2008). As proteínas HVA22 fazem parte de uma classe de LEA, também induzidas por ABA no momento do estresse, as quais protegem a célula contra a apoptose (Shen et al., 2001; Brands and Ho, 2002; Guo and Ho, 2008).

5.5.2. Genes identificados entre os tratamentos da cultivar sensível à seca

A maioria dos genes identificados na cultivar Primavera, sensível à seca, foram *downregulated* tanto no tecido foliar quanto no tecido radicular. Dentre os genes identificados estão 32 genes de *peroxidase precursor protein*, enzimas atuantes em *Biosynthesis of secondary metabolites*, *Phenylalanine metabolism* e *Phenylpropanoid biosynthesis*. A redução da expressão desses genes pode afetar processos importantes como a remoção de H₂O₂, oxidação de redutores tóxicos, biossíntese e degradação de lignina, suberificação, catabolismo de auxina, resposta à estresses ambientais, tais como ferimentos, ataque de patógenos e estresse oxidativo (Ibáñez et al., 2008; Andersson-Gunnerås et al., 2006). Além disso, vários genes da proteína *cytochrome P450* e de proteínas kinases foram *downregulated* nas raízes de Primavera sob deficiência hídrica. As proteínas *cytochrome P450* são associadas às reações de detoxificação de compostos xenobióticos (compostos químicos estranhos a um determinado organismo) em vários organismos (Werk-Reichhart and Feyereisen, 2000). As proteínas kinases atuam principalmente na transdução de sinal de estresses bióticos e abióticos (Ichimura et al., 2000). Isso sugere que a cultivar Primavera pode ser mais sensível à seca devido a falta de sinalização imediata desse estresse e por não apresentarem mecanismos de defesa antioxidante enzimático eficientes.

As famílias AP2 e C2H2 foram exclusivamente identificadas no tecido foliar de Primavera, enquanto que as famílias MYB e WRKY foram identificadas tanto no tecido foliar quanto no tecido radicular dessa cultivar. A maioria dos genes encontrados nessas famílias foram *downregulated* sob condição de seca, o que também pode ser relacionado à maior suscetibilidade à seca de Primavera.

5.5.3. Genes diferencialmente expressos entre os tecidos vegetais das cultivares

A análise de expressão entre os genes do tecido foliar das duas cultivares revelou genes *upregulated* na cultivar tolerante, relacionados de resposta à seca e anotados em rotas metabólicas descritas pelo KEGG. O aumento da expressão de genes da *asparagine synthetase*, enzima atuante em duas rotas relacionadas à biossíntese do aminoácido asparagina, pode provocar o acúmulo de asparagina para a manutenção da pressão osmótica durante o momento de estresse abiótico nas plantas (Lea et al., 2006). Da mesma maneira, em Douradão foi identificada a superexpressão de genes da *phenylalanine ammonia-lyase*, principal enzima relacionada a síntese dos fenilpropanóides, os quais têm papel de captação de radicais livres e, consequentemente, agem como antioxidantes, protegendo as plantas de vários estresses bióticos e abióticos (Herrig et al., 2002). A atividade da enzima *superoxide dismutase* (SOD), a qual teve um gene *upregulated* no tecido foliar de Douradão, na rota de *removal of superoxide radicals*, já foi relacionada com o processo de detoxificação das células sob estresse oxidativo provocado pela seca (Fridovich, 1995; Nath et al., 2013). Outro gene *upregulated* identificado nas folhas de Douradão foi o da *enolase*, uma proteína de choque térmico previamente identificada como induzida por diferentes estresses abióticos (Riccardi et al. 1998). Além desses genes, um gene da *beta-amylase*, atuando na rota de *starch degradation*, foi *upregulated* no tecido foliar de Douradão. A superexpressão de genes codificantes dessa enzima, que tem papel catalítico no processo de degradação do amido, foi previamente relacionada ao aumento de tolerância à seca em plantas (Perrone et al., 2012). Esses resultados indicam que sob condição de seca a cultivar Douradão induziu a expressão de enzimas do sistema antioxidante e enzimas atuantes na regulação de ajustamento osmótico, promovendo o acúmulo de solutos no interior das células, no tecido foliar.

Por ser o principal órgão na detecção de alterações nas condições do solo, a raiz desempenha papel importante na resposta à seca. No tecido radicular de Douradão foram encontrados cinco genes associados à *response to abiotic stimulus*, os quais expressam *3-ketoacyl-CoA synthase* (KCS), *lactate/malate dehydrogenase*, *inositol-3-phosphate synthase*, *chalcone synthase* e *lipoxygenase*, *chloroplast precursor*. A enzima KCS atua nas rotas *Biosynthesis of secondary metabolites* e *Fatty acid elongation*, catalizando a síntese de ácidos fáticos de cadeia longa, participando da biossíntese de suberina e/ou cera de suberina em raízes

de plantas (Todd, 1999). A presença das enzimas *lactate/malate dehydrogenase*, atuantes na *Biosynthesis of secondary metabolites*, *Propanoate metabolism*, *Cysteine and methionine metabolism*, *Glycolysis/Gluconeogenesis* e *Pyruvate metabolism*, tem sido associada ao aumento de disponibilidade de malato nas raízes provocando tolerância à toxidez causada pelo alumínio (Deng et al., 2009). A atuação da enzima *inositol-3-phosphate synthase* na rota *inositol phosphate metabolism*, produz o mio-inositol, resultando em maior crescimento celular, e pode estar relacionada com o crescimento das raízes para a busca de água, como resposta ao déficit hídrico. A *chalcone synthase* é uma enzima chave na formação de flavonóides e isoflavonóides, e a superexpressão de vários genes associados a essa enzima já foram identificados como resposta a estresses bióticos e abióticos (Dao et al., 2011). A identificação da expressão desses genes no tecido radicular é diretamente relacionada à capacidade de resposta e tolerância ao estresse causado pela seca na cultivar Douradão. Provalmente essa cultivar apresenta um crescimento radicular mais eficiente do que Primavera por terem sido encontrados genes relacionados ao aumento do crescimento celular. A abordagem direta desses genes é uma estratégia inédita na busca por cultivares de arroz mais tolerantes à seca, representando uma hipótese que pode ser avaliada em estudos posteriores.

Apenas 115 genes diferencialmente expressos foram comuns entre o tecido foliar e radicular nas duas cultivares. Desse total, seis foram estudados para validação via RT-qPCR. Os resultados de validação indicam que cinco genes apresentaram o mesmo padrão de expressão no tecido foliar e apenas metade dos genes avaliados no tecido radicular apresentaram o mesmo padrão de expressão dos resultados de RNA-seq. Por esse motivo, todos os genes candidatos ao aumento da tolerância à seca identificados por esse trabalho serão validados antes de serem utilizados como produto tecnológico.

5.5.4. Genes homólogos de *Arabidopsis thaliana*

A análise de homologia, baseada na comparação dos transcritos de arroz da análise de RNA-seq comparados com banco de dados de sequências de *A. thaliana*, revelou que a maioria dos genes descritos em arroz foram previamente anotados em *Arabidopsis*. Uma quantidade pequena de genes identificados não tiveram anotação a partir dos dados de genoma funcional de arroz. Genes relacionados a *developmental process* e *multicellular organismal development* e a *pollen development* e *DNA replication initiation* foram identificados, respectivamente, nas folhas

e raízes de Douradão. No tecido foliar de Douradão identificou-se um gene da TOR – *target of rapamycin*, considerada uma proteína kinase altamente conservada em organismos procariotos e eucariotos, sendo a maioria dos membros pertencentes à família *phosphoinositide* (PI) *3-kinase related kinase* (PIKK) (Tibbetts and Abraham, 2000). Essas proteínas podem regular: (i) a síntese de proteínas; (ii) biossíntese de ribossomos; (iii) captura de aminoácidos; (iv) transcrição de vários genes de enzimas envolvidas em múltiplas rotas metabólicas; (v) autofagia, e (vi) expressão de fator induzido por hipoxia (HIF)-1 em falta de oxigênio nas células (Raught et al., 2000; Hudson et al., 2002). Um gene de *debranching enzyme 1* foi identificado nos tecidos foliares de Douradão e Primavera, e essa enzima desempenha um papel importante na biossíntese de amido (Kubo et al., 1999). Alguns genes de enzimas *debranching* em arroz têm sido *downregulated* tanto em genótipo tolerante quanto em genótipo sensível à altas temperaturas, porém com uma magnitude de redução maior no genótipo sensível (Liao et al., 2014). Dois genes relacionados à embriogêneses foram identificados nas folhas de Douradão, o gene da EMB3012 – *embryo defective 3012* e o gene da EE22 – *maternal effect embryo arrest 22*, ambos sem função conhecida, mas que são essenciais para o desenvolvimento embrionário (TAIR, 2014). O gene ortólogo da PIE1 – *photoperiod-independent early flowering 1*, foi associado à diversas rotas metabólicas de florescimento e à diversos outros processos de desenvolvimento de plantas monocotiledôneas, incluindo a morfologia foliar (Xu et al., 2010). A presença desses genes nas folhas de Douradão indica que mesmo sob condições restritas de sobrevivência devido a falta de água, o florescimento e o desenvolvimento do embrião são normais, e podem estar associados a maior produtividade de Douradão em relação à Primavera quando cultivadas sob estresse de seca.

Nas raízes de Douradão o gene da ATMCM8 – *minichromosome maintenance 8* foi anotado em *pollen development* e *DNA replication initiation*, proteína ATP-dependente essencial para o processo de replicação do DNA, atuando como uma helicase (Chong et al., 2000). Nas raízes de Primavera foram identificados o gene de *arabinogalactan protein 23*, proteína relacionada ao crescimento e desenvolvimento (Ma and Zhao, 2010), e o gene DUF3414, o qual expressa uma proteína sem função conhecida.

5.6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho identificou uma série de genes diferencialmente expressos relacionados à diferentes respostas e mecanismos associados ao processo de tolerância à seca em folhas e raízes de cultivares de arroz de terras altas do Brasil. A cultivar tolerante Douradão reduziu as taxas fotossintética e transpiratória como mecanismos de resposta imediata após a percepção do estresse, reduzindo significativamente a expressão de genes relacionados à fotossíntese no tecido foliar. Os dados de RNA-seq da cultivar Douradão indicam, nos tecidos foliar e radicular, uma sinalização celular mais eficiente do que Primavera, por meio da indução de genes relacionados à proteínas kinase sinalizadoras de estresse. Além disso, Douradão apresentou vários fatores de transcrição ativadores de genes de resposta à seca, genes relacionados a proteínas protetoras das células, genes relacionados à detoxificação causado pelas EROs durante o momento do déficit hídrico, e alguns genes relacionados ao crescimento do tecido radicular, estimulado pela falta de água. Alguns dos genes encontrados em ambos os tecidos foram validados via RT-qPCR e mostraram um perfil de expressão diferenciado entre os tecidos. Por último, alguns genes que não tiveram anotação no genoma de arroz foram anotados como ortólogos de *Arabidopsis thaliana*, sendo encontrados, principalmente, genes relacionados ao desenvolvimento e crescimento celular. As informações obtidas nesse trabalho através da expressão de genes relacionados a mecanismos de resposta à seca e a descoberta de novos genes relacionados a esse caráter, mesmo que putativamente, abrem novas perspectivas para a pesquisa do arroz. Os genes que tiverem sua expressão validada poderão tanto dar origem a marcadores moleculares para seleção assistida para o programa de melhoramento genético do arroz, quanto para a geração de plantas de arroz geneticamente modificados para estudar o efeito da superexpressão ou supressão desses genes.

Tabela suplementar 1. Sequência dos primers desenhado para os genes validados via RT-qPCR

Primer	Sequência
LOC_Os12g19381.1 F	CACAGGTCTCCCGGGTACTA
LOC_Os12g19381.1 R	ATATGCCTTCTTGGCCTCCT
LOC_Os01g45140.1 F	CCGTTGCACATCCTCTTCTT
LOC_Os01g45140.1 R	GGGTGGTGAGGATGGTACAC
LOC_Os07g10840.1 F	CTTCGACACGATCACCCAAG
LOC_Os07g10840.1 R	CGAACCAATCCAAGAAGGAC
LOC_Os09g29710.1 F	GTAGCGCTTGCAATGGTGT
LOC_Os09g29710.1 R	CTGGTCCTCGAACCCGTAG
LOC_Os06g30640.1 F	GATCGAGTCCATAGCCAAGC
LOC_Os06g30640.1 R	TGTCGTCCAGGACCTTGTAG
LOC_Os02g07730.1 F	CCTACCTGCACTTGGTCTCA
LOC_Os02g07730.1 R	CGCCTCGTACATCCTCCT
Actin (ACTX3) F	TGCGATAATGGAAGTGGTATGG
Actin (ACTX3) R	ACAGCCCTGGGCGCAT
Eukaryote Elongation factor (EEF α) F	TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT
Eukaryote Elongation factor (EEF α) R	GACTTCCTTCACGATTTCATCGTAA
Glyceraldeide-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) F	GGGCTGCTAGCTTCAACATC
Glyceraldeide-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) R	TTGATTGCAGCCTTGATCTG

Tabela suplementar 2. Volumes dos reagentes das reações de RT-qPCR. O volume dos primers é variável devido a concentração otimizada para cada par de primers.

Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX			
	30F+30R (nM)	40F+40R (nM)	50F+50R (nM)
Rox + Sybr	10	10	10
Primer F	1,2	1,6	2
Primer R	1,2	1,6	2
Template (10ng)	5	5	5
H₂O DEPC	2,6	1,8	1
Total	20	20	20

Tabela suplementar 3. Concentração dos primers na reação de RT-qPCR.

Primer	Concentração
LOC_Os12g19381.1	30 nM
LOC_Os01g45140.1	5nM
LOC_Os07g10840.1	30 nM
LOC_Os09g29710.1	30 nM
LOC_Os06g30640.1	40 nM
LOC_Os02g07730.1	50 nM
GAPDH	25 nM
ACTX3	25 nM
EEF-1A	50 nM

5.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta-Dias E, Acosta-Gallegos A, Trejo-López C, Padilla-Ramírez JS, Amador-Ramírez MS (2009) Adaptation traits in dry bean cultivares grown under drought stress. *Agricultura Técnica em México*, 35 (41): 216-425.

Acosta-gallegos JA, Domingo M (2009) Adaptation traits in dry bean cultivars grown under drought stress* características de adaptación en variedades de frijol bajo sequía, 35: 416-425.

Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohmmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R.K., and Mukherjee, S.K. (2003). RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 657-685.

Ahuja I, de Vos RCH, Bones, A M, Hall RD (2010) Plant molecular stress responses face climate change. *Trends in Plant Science*, 15(12): 664-74. doi:10.1016/j.tplants.2010.08.002

Akiyama T, Pillai MA (2001) Molecular cloning, characterization and in vitro expression of a novel endo-1,3-beta-glucanase up-regulated by ABA and drought stress in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science*, 161:1089-1098.

Andersson-Gunnerås AS, Mellerowicz EJ, Love J, Segerman B, Ohmiya Y, Coutinho PM et al (2006), Biosynthesis of cellulose-enriched tension wood in *Populus*: global analysis of transcripts and metabolites identifies biochemical and developmental regulators in secondary wall biosynthesis. *The Plant Journal* 45: 144-165.

Babu RC, Zhang JX, Blum A, Ho THD, Wu R, Nguyen, HT (2004) HVA1, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. *Plant Science*, 166:855-862.

Bellafiore S, Barneche F, Peltier G, Rochaix JD (2005) State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7. *Nature* 433: 892-895.

Benešová M, Holá D, Fischer L, Jedelský PL, Hnilička F, Wilhelmová N, ... Hniličková H. (2012). The physiology and proteomics of drought tolerance in maize: early stomatal closure as a cause of lower tolerance to short-term dehydration? *PloS One*, 7(6), e38017. doi:10.1371/journal.pone.0038017

Boudsocq M, Sheen J (2012) CDPKs in immune and stress signaling. *Trends Plant Sci*: 1-11.

Brands A, Ho T-HD (2002) Function of a plant stress-induced gene, HVA22: Synthetic enhancement screen with its yeast homolog reveals its role in vesicular traffic. *Plant Physiol.* 130, 1121-1131.

Bray EA (2002) Absciscic acid regulation of gene expression during water-deficit stress in the era of the Arabidopsis genome. *Plant Cell Environ* 25: 153-161

Chaves MM, Oliveira MM (2004) Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany*, 55(407): 2365–84. doi:10.1093/jxb/erh269

Chandler PM, Robertson M (1994) Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 113–141.

Chen F, Fasoli M, Tornielli GB, Dal Santo S, Pezzotti M, et al. (2013) The Evolutionary History and Diverse Physiological Roles of the Grapevine Calcium-Dependent Protein Kinase Gene Family. *PLoS ONE* 8(12): e80818. doi: 10.1371/journal.pone.0080818.

Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu JK (2004) Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *J Exp Bot* 55: 225–236

Counce PA, Keislingb TC, Mitchellb AJ (2000) A Uniform, Objective, and Adaptive System for Expressing Rice Development. *Crop Science* 40: 436–443.

Cuellar-Ortiz SM, De La Paz Arrieta-Montiel M, Acosta-Gallegos J, Covarrubias AA (2008) Relationship between carbohydrate partitioning and drought resistance in common bean. *Plant, Cell & Environment*, 31(10): 1399–409. doi:10.1111/j.1365-3040.2008.01853.x

Dai X, Wang Y, Yang A, Zhang W-H (2012) OsMYB2P-1, an R2R3 MYB transcription factor, is involved in the regulation of phosphate-starvation responses and root architecture in rice. *Plant Physiology*, 159(1): 169–83. doi:10.1104/pp.112.194217

Dao TTH, Linthorst HJM, Verpoorte R (2011) Chalcone synthase and its functions in plant resistance. *Phytochem Rev.* 2011 September; 10(3): 397–412.

Datta K, Niranjana B, Moumita G, Sellapan K, Yamaguchi Shinozaki K, Datta SK (2012) Overexpression of Arabidopsis and Rice stress genes' inducible transcription factor confers drought and salinity tolerance to rice. *Plant Bio-technol J* 10:579–586.

Deng, W. et al. Overexpression of Citrus junos mitochondrial citrate synthase gene in Nicotiana benthamiana confers aluminum tolerance. *Planta*, v. 230, p. 355 – 365, 2009.

Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet EG, Miura S, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant J.* 2003; 33 (4):751-63.

Flexas J, Ribas-Carbó M, Bota J, Galmés J, Henkle M, Martínez-Cañellas S, Medrano, H (2006) Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO₂ concentration. *The New Phytologist*, 172(1): 73–82. doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01794.x

- Fridovich I (1995) "Superoxide radical and superoxide dismutases". Annual Review of Biochemistry 64: 97–112. doi:10.1146/annurev.bi.64.070195.000525
- Fonseca JR, Emilio MC, Morais OP (2007) Maturação de Pós-colheita das Cultivares de Arroz de Terras Altas BRS Sertaneja, BRS Pepita e BRS Monarca. Comunicado Técnico 136, Dezembro.
- Gao JP, Chao DY, Lin HX (2007) Understanding abiotic stress tolerance mechanisms: Recent studies on stress response in rice. J. Integr.Plant Biol. 49(6), 742–750.
- Gitti DC, Arf O, Portugal J.R, Corsini DCDC, Rodrigues RAF. and Kaneko, H. (2013) Cover Crops, Nitrogen Rates and Seeds Inoculation with *Azospirillum Brasilense* in Upland Rice under No-Tillage. Bragantia, 71, 509- 517.
- Guo WJ, Ho TH, David Ho, TH. (2008) An abscisic acid-induced protein, HVA22, inhibits gibberellin-mediated programmed cell death in cereal aleurone cells. Plant Physiology, 147(4): 1710–22. doi:10.1104/pp.108.120238
- Guo L, Wang D, Ma H, Yin W, Xia X. (2011) Complementary DNA-amplified fragment length polymorphism (AFLP-cDNA) analysis of differential gene expression from the xerophytes *Amnoptanthus mongolicus* in response to cold, drought and cold together with drought. African Journal of Biotechnology 10 (19): 3715-3725.
- Hake S, Magnani E, Sjo K (2004) From Endonucleases to Transcription Factors : Evolution of the AP2 DNA Binding Domain in Plants, 16: 2265–2277. doi:10.1105/tpc.104.023135.multidimensional
- Haoli M, Zhao J (2010) Genome-wide identification, classification, and expression analysis of the arabinogalactan protein gene family in rice (*Oryza sativa* L.). J. Exp. Bot. 61 (10): 2647-2668 first published online April 27, 2010 doi:10.1093/jxb/erq104
- Herrig V, Ferrarese MLL, Suzuki LS, Rodrigues JD, Ferrarese-Filho, O (2002) Peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase activities, phenolic acid contents, and allelochemicals-inhibited root growth of soybean. Biological Research, 35 (1): 59-66.
- Hudson, et al. Regulation of Hypoxia-Inducible factor 1 Expression and Function by the Mammalian Target of Rapamycin. Mol Cell Biol. 22:7004 (2002).
- Ibáñez JTA, Sozzani R, Lee TJ, Chu TM, Wolfinger RD, Cella R, Bowdoin LH (2008) Global Analysis of Arabidopsis Gene Expression Uncovers a Complex Array of Changes Impacting Pathogen Response and Cell Cycle during Geminivirus Infection Plant Physiol. 148: 436-454.
- Ichimura, K., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Yuasa, T. and Shinozaki, K. (2000) Protein phosphorylation and dephosphorylation in environmental stress responses in plants. Adv. Bot. Plant Path. 32: 355–377.

- James PJ, Chong MK, Hayashi MN, Simon RMX, Bruce S(2000) A double-hexamer archaeal minichromosome maintenance protein is an ATP-dependent DNA helicase. PNAS 97 (4): 1530-1535; doi:10.1073/pnas.030539597
- Jang IC, Oh SJ, Seo JS, Choi WB, Song SI, Kim CH, Kim YS, Seo HS, Do ChoI Y, Nahm BH, Kim JK (2003). Expression of a bifunctional fusion of the Escherichia coli genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. Plant Physiology, 131:516-524.
- Jiang-Lin Liao, Hui-Wen Zhou, Hong-Yu Zhang, Ping-An Zhong, and Ying-Jin Huang. Comparative proteomic analysis of differentially expressed proteins in the early milky stage of rice grains during high temperature stress. J. Exp. Bot. (2014) 65 (2): 655-671.
- Kaminaka H, Morita S, Nakajima M, Masumura T, Tanaka K (1998) Gene cloning and expression of cytosolic glutathione reductase in rice (*Oryza sativa* L.). Plant and Cell Physiology, 39:1269-1280.
- Kubo A, Fujita N, Harada K, Matsuda T, Satoh H, Nakamura Y. 1999. The starch-debranching enzymes isoamylase and pullulanase are both involved in amylopectin biosynthesis in rice endosperm. Plant Physiology 121, 399–410.
- Lafitte HR, Ismail A, Bennett J (2004). Abiotic stress tolerance in rice for Asia: Progress and the future. In: Fischer, T., Turner, N., Angus, J., McIntyre, L., Robertson, M., Borrell, A., et al. eds. New Directions for a Diverse Planet: Proceedings for the 4th International Crop Science Congress. The Regional Institute Ltd. www.cropsscience.org.au/icsc2004.
- Lafitte HR, Yongsheng G, Yan S, Li ZH (2007). Whole plant responses, key processes, and adaptation to drought stress: the case of rice. Journal of Experimental Botany 58, 169–175.
- Lawlor DW, Tezara W (2009) Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. Annals of Botany, 103(4): 561–79. doi:10.1093/aob/mcn244
- Lea PJ, Sodek L, Parry MAJ, Shewry PR, Halford NG (2006) Asparagine in plants. Annals of Applied Biology 150: 1-26.
- LI, Z. Y., CHEN, S. Y. (1999). Inducible expression of translation elongation factor 1A gene in Rice seedlings in response to environmental stresses. Acta Botanica Sinica, 41:800-806. Li ZY, Chen SY.
- LIU, W., XU, Z. H., LUO, D., XUE, H. W. (2003). Roles of OsCKI1, a rice casein kinase I, in root development and plant hormone sensitivity. The Plant Journal, 36:189-202

- Lizana C, Wentworth M, Martinez JP, Villegas D, Meneses R, Murchie EH, ... Pinto, M. (2006) Differential adaptation of two varieties of common bean to abiotic stress: I. Effects of drought on yield and photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 57(3): 685–97. doi:10.1093/jxb/erj062
- Matsukura S, Mizoi J, Yoshida T, Todaka D, Ito Y, Maruyama K, et al. (2010) Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. *Mol Genet Genomics* 283:185-196.
- Martre P, Morillon R, Barrieu F, North GB, Nobel PS, Chrispeels MJ (2002) Plasma membrane Aquaporins play a significant role during recovery from water deficit. *Plant Physiology*, 130:2101-2110.
- Minh-Thu PT, Hwang DJ, Jeon JS, Nahm BH, Kim YK (2013). Transcriptome analysis of leaf and root of rice seedling to acute dehydration. *Rice* 6:1-38.
- Nath K, Kumar S, Poudyal RS, Yang YN, Timilsina R, Park YS, ... Lee, CH (2013) Developmental stage-dependent differential gene expression of superoxide dismutase isoenzymes and their localization and physical interaction network in rice (*Oryza sativa* L.). *Genes & Genomics*, 36(1): 45–55. doi:10.1007/s13258-013-0138-9
- Niyogi KK, Li XP, Rosenberg V, Jung HS (2005) Is PsbS the site of non-photochemical quenching in photosynthesis? *Journal of Experimental Botany*, 56(411): 375–82. doi:10.1093/jxb/eri056
- Périn C, Rebouillat J, Brasileiro AMC, Diévar A, Gantet P, Breitler, JC(2004) Novel insights into the genomics of rice root adaptive development, 117–141.
- Perrone I, Pagliarani C, Lovisolo C, Chitarra W, Roman F, Schubert a (2012) Recovery from water stress affects grape leaf petiole transcriptome. *Planta* 235:1383–1396.
- Pinheiro C, Chaves MM (2011) Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? *Journal of Experimental Botany*, 62(3): 869–82. doi:10.1093/jxb/erq340
- Rabello AR, Guimarães CM, Rangel, PHN, da Silva, FR, Seixas D, de Souza E, ... Mehta, A. (2008). Identification of drought-responsive genes in roots of upland rice (*Oryza sativa* L). *BMC Genomics*, 9, 485. doi:10.1186/1471-2164-9-485
- Raught, et al. The target of rapamycin (TOR) proteins. *PNAS* 98:7037 (2001).
- Ravikumar G, Manimaran P, Voleti SR, Subrahmanyam D, Sundaram RM, Bansal KC, Viraktamath BC, Balachandran SM (2014) Stress-inducible expression of AtDREB1A transcription factor greatly improves drought stress tolerance in transgenic indica rice. *Transgenic Research*.

- Riccardi F, Gazeau P, De Vienne D, Zivy M (1998) Protein changes in response to progressive water deficit in maize. Quantitative variation and polypeptide identification. *Plant Physiology*, v. 117, p. 1253–1263, 1998.
- Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C, Keddle J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR et al. (2000). *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290: 2105-2110.
- Rodriguez MC, Petersen M, Mundy J (2010) Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* 61: 621–649.
- Rohila JS, Jain RK, Wu R (2002) Genetic improvement of Basmati rice for salt and drought tolerance by regulated expression of a barley Hva1 cDNA. *Plant Science*, 163:525-532.
- Romeis T, Ludwig A, Martin R, Jones JDG. 2001. Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *EMBO Journal* 20, 5556–5567.
- Rowley ER, Mockler TC (2011) Plant abiotic stress: Insights from the genomics era. *Abiotic Stress Response in Plants - Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives*, Arun Shanker and B. Venkateswarlu (Ed.), ISBN: 978-953-307-672-0, InTech, DOI: 10.5772/23215.
- Saijo Y, Hata S, Kyojuka J, Shimamoto K, Izui K. 2000. Over-expression of a single Ca²⁺-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *The Plant Journal* 23, 319–327.
- Saijo Y, Kinoshita N, Ishiyama K, Hata S, Kyojuka J, Hayakawa T, Nakamura T, Shimamoto K, Yamaya T, Izui K (2001) A Ca²⁺-dependent protein kinase that endows rice plants with cold and salt stress tolerance functions in vascular bundles. *Plant and Cell Physiology*, 42:1228-1233.
- Shen, Q., Chen, C.-N., Brands, A., Pan, S.-M., and Ho, T.-H.D. (2001). The stress- and abscisic acid-induced barley gene HVA22: Developmental regulation and homologues in diverse organisms. *Plant Mol. Biol.* 45, 327–340.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58 (2): 221–227.
- Siemens JA, Zwiazek JJ (2004). Changes in root water flow properties of solutions culture-grown trembling aspen (*Populus tremuloides*) seedling under different intensities of water-deficit stress. *Physiologia Plantarum* 121(1): 44-49.
- Soares AA, Comelio VMO, Soares PC, Santos PG, Reis MS (2001) Primavera: Cultivar de arroz com grão agulhinha para cultivo em terras altas. *Ceres* 48 (277): 381-388.

Soares AA, Guimaraes EP, Morais OP De, Soares PC (1989) Cultivares de arroz de sequeiro recomendadas para Minas Gerais e regio Centro-Oeste do Brasil. Informe Agropecuario 14 (161): 12-16.

TAIR - – The Arabidopsis Information Resource (2013) Accessed in March 5th 2014. Homepage: <http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?name=AT5G40480&type=locus>

Taiz L, Zeiger E (2002) Plant physiology, 3rd edn. Sunderland, MA: Sinauer Associates Publishers.

Tibbetts RS, Abraham RT (2000) PI3K-related kinases: Roles in cell-cycle regulation and DNA damage responses. In Signaling networks and cell cycle control: The molecular basis of cancer and other diseases (ed. J.S. Gutkind), pp. 267–301. Humana Press, Totowa, NJ.

Todd J, Post-Beittenmiller D, Jaworski JG (1999). KCS1 encodes a fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase affecting wax biosynthesis in Arabidopsis thaliana. The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology, 17(2): 119–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10074711>

Trapnell C, Hendrickson DG, Sauvageau M, Goff L, Rinn JL, Pachter L (2012) Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. Nature Biotechnology, (December), 1–9. doi:10.1038/nbt.2450

Vandeleur R, Niemitz C, Tilbrook J, Tyerman SD (2005) Roles of aquaporins in root responses to irrigation. Plant and soil 274 (1): 141-161.

Wang Q, Guan Y, Wu Y, Chen H, Chen F, Chu C (2008) Overexpression of a rice OsDREB1F gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both Arabidopsis and rice. Plant Mol Biol 67:589-602.

Wang W, Vinocur B, Altman A (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. Planta, 218(1): 1–14. doi:10.1007/s00425-003-1105-5

Werk-Reichhart, D., and Feyereisen, R. (2000). Cytochrome P450: A success story. Genome Biol. 1, 3000.1–3000.9.

Wilkinson S, Davies, WJ (2010) Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. Plant, Cell & Environment, 33(4): 510–25. doi:10.1111/j.1365-3040.2009.02052.x

Xing DH, Lai ZB, Zheng ZY, Vinod KM, Fan, BF, Chen ZX (2008) Stress- and pathogen-induced Arabidopsis WRKY48 is a transcriptional activator that represses plant basal defense. Molecular Plant, 1(3), 459–70. doi:10.1093/mp/ssn020

Xu D, Duan X, Wang B, Hong B, Ho TH, Wu R (1996) Expression of a late embryogenesis abundant (LEA) protein gene, HvA1, from barley confers tolerance to drought and salinity in transgenic rice. *Plant Physiology*, 110:249-257.

Xu Y, Deng M, Peng J, Hu Z, Bao L, et al. (2010) OsPIE1, the Rice Ortholog of Arabidopsis photoperiod-independent early flowering1, Is Essential for Embryo Development. *PLoS ONE* 5(6): e11299. doi: 10.1371/journal.pone.0011299

Xue TT, Wang D, Zhang SZ, Ehrling J, Ni F, Jakab S, Zheng CC, Zhong Y. (2008) Genome-wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice and Arabidopsis. *BMC Genomics* 9: 550.

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol.* 57:781-803.

Zhan G et al. (2010) Deep RNA sequencing at single base-pair resolution reveals high complexity of the rice transcriptome. *Genome research*, v. 20, p. 646 – 654.