

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**  
**CIÊNCIA DO SOLO**

**TESE**

**Características Morfológicas, Fisiológicas e  
Transcriptoma em Variedades de Arroz (*Oryza sativa*  
L.) Contrastantes quanto a Tolerância ao Estresse  
Hídrico**

**Leandro Martins Ferreira**

**2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
CIÊNCIA DO SOLO**

**CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, FISIOLÓGICAS E  
TRANSCRIPTOMA EM VARIEDADES DE ARROZ (*Oryza  
sativa* L.) CONTRASTANTES QUANTO A TOLERÂNCIA AO  
ESTRESSE HÍDRICO**

**LEANDRO MARTINS FERREIRA**

*Sob a Orientação do professor*  
**Leandro Azevedo Santos**

*e Co-orientação da professora*  
**Sonia Regina de Souza**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo autor

Mc Martins Ferreira, Leandro, 1988 –  
Características morfológicas, fisiológicas e transcriptoma em variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) contrastantes quanto a tolerância ao estresse hídrico / Leandro Martins Ferreira. – 2017. 110f.: il.

Orientador: Leandro Azevedo Santos.  
Coorientadora: Sonia Regina De Souza.  
Tese (Doutorado). – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo, 2017.

1. Seca. 2. Sequenciamento de nova geração 3. RNA-seq. 4. PCR em tempo real. I. Azevedo Santos, Leandro, 1981-, orient. II. Regina De Souza, Sonia, 1962-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo. IV. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta tese, desde que seja citada a fonte.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA-CIÊNCIA DO SOLO**

**LEANDRO MARTINS FERREIRA**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo.

TESE APROVADA EM 22/02/2017.

---

Leandro Azevedo Santos. Dr. UFRRJ  
Orientador

---

André Marques dos Santos. Dr. UFRRJ

---

Roberto Oscar Pereyra Rossiello. Dr. UFRRJ

---

Gilberto Sachetto Martins. Dr. UFRJ

---

Luiz Mors Cabral. Dr. UFF

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Fernando Bulhosa Ferreira (in memoriam) e Maria Cristina  
Martins Ferreira por todo incentivo e amor.  
A Cristiana Maia de Oliveira minha noiva*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre iluminou o meu caminho e me deu forças para superar todas as barreiras durante essa jornada.

À população brasileira por todo conhecimento científico que adquiri durante a graduação e pós-graduação nesta instituição pública.

A minha família que sempre acreditou no meu potencial e me incentivou a seguir essa carreira profissional.

À minha linda, Cristiana Maia de Oliveira, pelo incentivo, ajuda nos experimentos, atenção, amor e carinho durante esse período.

Ao Prof. Manlio Silvestre Fernandes pelos ensinamentos científicos que muito contribuiu para minha formação e pela orientação durante a iniciação científica.

Ao professor Leandro Azevedo Santos pela orientação, amizade e apoio durante a execução dos experimentos e análises.

A Prof<sup>a</sup>. Sonia Regina de Souza e a Elvia Marian Lis Martinez Stark pela oportunidade de iniciar minha vida científica ainda na graduação, orientação, ensinamentos, amizade e carinho durante esse tempo de convivência.

Aos amigos do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas por toda troca de conhecimentos, contribuição na execução deste trabalho e pelos momentos de descontração.

Ao Root development laboratory e ao Dr. Tom Beeckman pela oportunidade de desenvolver parte do meu trabalho na Universidade de Gent.

Aos professores e funcionários do Departamento de Solos, pela cordialidade, presteza e amizade.

Ao CPGA-CS e sua coordenação pela atenção com que fui tratado.

Ao CNPq e a FAPERJ pelo fomento.

A CAPES pela oportunidade do Doutorado sanduíche no exterior.

A todos que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Leandro Martins Ferreira nasceu no Rio de Janeiro – RJ, em 03 de janeiro de 1988. Concluiu o ensino fundamental no Centro Educacional Santo Antônio de Pádua e o ensino médio no Colégio Técnico da Universidade Rural (CTUR), obtendo o título de técnico em Agropecuária Orgânica. Iniciou o curso de graduação em Engenharia Agrônômica na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) em junho de 2006, diplomando – se em 2011. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica por três anos e meio no Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas do Departamento de Solos, estudando técnicas para aumentar a eficiência de uso de nitrogênio em arroz sob a orientação do professor Manlio Silvestre Fernandes. Em março de 2011 foi aprovado para o mestrado no Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo (CPGA-CS), sob a orientação do professor Leandro Azevedo Santos. Em 2012 foi selecionado como aluno FAPERJ nota 10. Em 2013, foi aprovado para o doutorado no mesmo curso de Pós-Graduação e iniciou seus estudos para identificar novos alvos biotecnológicos envolvidos com a tolerância ao estresse hídrico em arroz de sequeiro. Em 2015, foi contemplado com a bolsa nota 10 FAPERJ e foi selecionado para participar do programa de doutorado sanduíche no exterior (CAPES – PDSE), no qual, desenvolveu durante um ano, atividades relacionadas a sua linha de pesquisa, orientado pelo Dr. Tom Beeckman, no Departamento de Sistemas Biológicos (PSB – VIB) da Universidade de Gent – Bélgica.

## RESUMO

FERREIRA, Leandro Martins. **Características morfológicas, fisiológicas e transcriptoma em variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) contrastantes quanto a tolerância ao estresse hídrico**. 2017. 110f. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2017.

Dentre os estresses abióticos que podem limitar o crescimento das culturas agrícolas, a seca é considerada um dos principais, sendo capaz de reduzir consideravelmente a produção global de alimentos. O arroz é uma das mais importantes culturas agrícolas do mundo e sua produção demanda grande quantidade de água, pois é uma espécie extremamente sensível ao déficit hídrico. Portanto, a obtenção de plantas de arroz que lidam com o estresse hídrico, sem redução significativa de produtividade é um desafio para os programas de melhoramento atuais. Este trabalho teve como objetivos: (i) identificar variedades de arroz de sequeiro contrastantes quanto à tolerância ao estresse hídrico por meio da avaliação de características morfológicas e fisiológicas, (ii) analisar parâmetros radiculares que possam explicar a diferença entre variedades tolerantes e sensíveis ao estresse hídrico e, (iii) identificar novos alvos biotecnológicos envolvidos com essa tolerância por meio da análise do perfil de transcritos nas variedades de arroz contrastantes. Foram realizados seis experimentos, sendo dois em casa de vegetação e quatro em câmara de crescimento. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. O primeiro experimento iniciou com dez variedades de arroz submetidas a condição controle e estresse hídrico durante o período reprodutivo. As variedades contrastantes foram selecionadas com base em características morfológicas e fisiológicas analisadas. Os experimentos II a IV foram realizados a fim de correlacionar a tolerância ao estresse com o desenvolvimento e morfologia do sistema radicular. O experimento V foi realizado para avaliar a regulação de genes relacionados a tolerância ao estresse hídrico e o experimento VI teve como objetivo analisar a expressão diferencial de genes por meio da técnica de RNA-seq em raízes de arroz. Os dados obtidos dos componentes de produtividade, índices de tolerância ao estresse e análise multivariada das características morfológicas e fisiológicas permitiram identificar as variedades Catetão e Piauí como as mais tolerantes ao estresse hídrico, e Quebra Cacho e Mira como as mais sensíveis. Foi observado que a tolerância ao estresse hídrico está correlacionada com o menor ângulo radicular, aumento da densidade e emissão de raízes laterais em condições de déficit hídrico na variedade Catetão. Além disso, essa variedade mostra indução rápida e elevados níveis de expressão de genes e fatores de transcrição relacionados à tolerância ao estresse hídrico em arroz. Por meio do sequenciamento do RNA foi possível identificar diversos genes com potencial para serem utilizados em programas de melhoramento visando o aumento da tolerância ao estresse hídrico em arroz.

**Palavras-chave:** Seca. Sequenciamento de nova geração. RNA-seq. PCR em tempo real.



## ABSTRACT

FERREIRA, Leandro Martins. **Morphological, physiological and transcriptome traits of rice varieties (*Oryza sativa* L.) contrasting to the drought tolerance.** 2017. 110p. Thesis (Doctor Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2017.

Among the abiotic stress, drought is a major environmental stress seriously limiting plant growth and crop productivity. Rice is one of the most important staple food crops in the world and requires a larger quantity of water to produce, once it is a crop extremely sensitive to drought stress. For this reason, to obtain rice plants that cope with drought stress without major reduction in productivity is the challenge for breeding programs nowadays. This work aimed: (i) identify upland rice varieties with contrasting drought tolerance through the evaluation of morphological and physiological traits, (ii) analyse root parameters which could explain the differences between tolerant and sensitive varieties to the drought stress and, (iii) identify new biotechnological targets related with the tolerance through transcript profile analysis in the contrasting varieties. Six experiments were performed, two in greenhouse and four in growth chamber conditions. The experimental design adopted was completely randomized. The first experiment started with ten rice varieties submitted to control and stress conditions during the reproductive stage. The contrasting varieties were selected based on morphological and physiological traits. Experiments from II to IV aimed to correlate the tolerance to the drought stress with the root development and morphology. Experiment V aimed to evaluate the regulation of genes related to the drought tolerance and the experiment VI aimed to analyse the differential expression of genes through the RNAseq analysis in rice roots. Data obtained from the productivity components, tolerance index and multivariate analysis through the evaluation of morphological and physiological traits allowed to identify Catetão and Piauí variety as the most tolerant and Quebra Cacho and Mira as the most sensitive. Drought tolerance was correlated with a lower root angle and increase in the root density and emission of lateral roots by Catetão variety during drought stress. Moreover, Catetão variety has showed higher expression levels and early induction of genes and transcription factors related with drought tolerance. The RNAseq analysis allowed to identify several potential genes which can be used in future breeding programs aiming the improvement of drought tolerance in rice.

**Key words:** Drought. High-throughput sequencing. RNA-seq. Real time PCR.

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>18S</b>	RNA 18S ribossomal
<b>ABA</b>	Ácido abscísico
<b>AIA</b>	Ácido indol acético
<b>bp</b>	Pares de bases
<b>bZIP</b>	Família de fator de transcrição contendo domínio básico de zíper de leucina
<b>COR413</b>	Gene envolvido com a tolerância a estresses abióticos
<b>cpm</b>	Contagens por milhão
<b>CyCs</b>	Genes relacionados ao ciclo celular
<b>DAG</b>	Dias Após a Germinação
<b>DREB</b>	Família de fator de transcrição que interage com elementos cis DRE/CRT
<b>DRO</b>	Gene envolvido com o ângulo radicular
<b>DUF</b>	Domínio de função desconhecida
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetracético
<b>EF1</b>	Fator de alongamento 1
<b>ERF</b>	Fator responsivo a etileno
<b>EWST1</b>	Aumento da tolerância ao estresse 1
<b>FDR</b>	Taxa de descoberta falsa
<b>FT</b>	Fator de transcrição
<b>GAPDH</b>	Gliceraldeído 3 – fosfato desidrogenase
<b>GS</b>	Glutamina sintetase
<b>GUS</b>	Enzima $\beta$ -glucuronidase
<b>mRNA</b>	Ácido Ribonucléico mensageiro (“ <i>Ribonucleic Acid Messenger</i> ”)
<b>MYB</b>	Família de FT com motivo conservado MYB
<b>NAC</b>	Família de FT <u>N</u> AM, <u>A</u> TAF, <u>C</u> UC

<b>NCED</b>	Gene Cis epóxicarotenóide dioxigenase
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	Amônio
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Nitrato
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>qRT9</b>	Gene envolvido com a espessura radicular
<b>QTL</b>	Lóci para característica quantitativa
<b>Reads</b>	Sequências curtas obtidas do sequenciamento
<b>RT-PCR</b>	Reação em cadeia de polimerase em tempo real
<b>SPAD</b>	Análise de desenvolvimento solo-planta
<b>TRIS</b>	2-(2-hidroxietil) amino-2-(hidroximetil) propano-1,3-diol
<b>UBC</b>	Enzima de conjugação a ubiquitina E2
<b>UBQ10</b>	Ubiquitina 10
<b>UBQ5</b>	Ubiquitina 5
<b>WRKY</b>	Família de fator de transcrição com motivo conservado WRKYGQK
<b>WT</b>	Tipo selvagem (“ <i>wild type</i> ”) ou planta não transformada

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Análise química de terra do Planossolo Háplico utilizado para condução do experimento.....	18
<b>Tabela 2.</b> Características morfológicas das variedades de arroz de sequeiro utilizadas para condução dos experimentos. ....	19
<b>Tabela 3.</b> Escala de fertilidade das espiguetas de arroz após estresse hídrico.....	20
<b>Tabela 4.</b> Sequência de primers utilizados para seleção de controles endógenos estáveis nos experimentos com estresse hídrico. ....	26
<b>Tabela 5.</b> Sequências dos “primers” para os fatores de transcrição, genes relacionados a tolerância ao estresse hídrico e ciclo celular utilizados nas reações de PCR em tempo real. ....	26
<b>Tabela 6.</b> Massa seca (g vaso <sup>-1</sup> ) de folha, colmo e raiz das variedades de arroz de sequeiro cultivadas em casa de vegetação sob condição controle e estresse hídrico. ....	30
<b>Tabela 7.</b> Massa seca (g vaso <sup>-1</sup> ) de raiz em duas profundidades (0 – 30 cm) e (30 – 130 cm) nas variedades de arroz de sequeiro cultivadas em casa de vegetação sob condição controle e estresse hídrico. ....	31
<b>Tabela 8.</b> Tamanho, número de perfilhos, panículas e profundidade radicular das variedades de arroz de sequeiro cultivadas em casa de vegetação sob condição controle e estresse hídrico. ....	32
<b>Tabela 9.</b> Produção, massa de 100 grãos, esterilidade da espiguetas, índice de fertilidade das espiguetas e índice de colheita das variedades de arroz de sequeiro cultivadas em casa de vegetação sob condição controle e estresse hídrico. ....	33
<b>Tabela 10.</b> Produtividade e produção relativa das variedades de arroz de sequeiro cultivadas em casa de vegetação sob condição controle e estresse hídrico. ....	34
<b>Tabela 11.</b> Principais índices de tolerância ao estresse nas variedades de arroz de sequeiro cultivadas em casa de vegetação sob condição controle e estresse hídrico. ....	35
<b>Tabela 12.</b> Correlação entre os diferentes índices de tolerância ao estresse hídrico. ....	35
<b>Tabela 13.</b> Índice SPAD ao longo do tempo em variedades de arroz de sequeiro cultivadas em casa de vegetação sob condição controle e estresse hídrico. ....	38
<b>Tabela 14.</b> Massa seca (g vaso <sup>-1</sup> ) de folha, colmo e raiz e razão raiz parte aérea das variedades Catetão, Mira, Piauí e Quebra Cacho submetido a tratamento controle e estresse hídrico durante 14 dias. ....	48

<b>Tabela 15.</b> Número de raízes que atravessaram a peneira nos ângulos de 0-30°; 30-60°, 60-90° e Taxa de Raízes Profundas (TRP) das variedades Catetão, Mira, Piauí e Quebra Cacho submetidas a tratamento controle e estresse hídrico durante 14 dias. ....	50
<b>Tabela 16.</b> Massa seca (g vaso <sup>-1</sup> ) de parte aérea, raiz e razão raiz parte aérea das variedades Catetão, Mira, Piauí e Quebra Cacho submetidas a tratamento controle e estresse hídrico (PEG 20%) durante 14 dias.....	52
<b>Tabela 17.</b> Parâmetros radiculares das variedades Catetão, Mira, Piauí e Quebra Cacho submetidas a tratamento controle e estresse hídrico (PEG 20%) durante 14 dias. ....	53
<b>Tabela 18.</b> Parâmetros radiculares das raízes primárias e raízes laterais das variedades Catetão e Mira submetidas a tratamento controle e estresse hídrico durante 7 dias utilizando 20% de PEG.....	56
<b>Tabela 19.</b> Parâmetros anatômicos determinados a partir de 0,5cm das pontas nas variedades Catetão e Mira submetidas a tratamento controle e estresse hídrico durante 7 dias utilizando 20% de PEG.....	58
<b>Tabela 20.</b> Parâmetros anatômicos determinados a partir do terço médio nas variedades Catetão e Mira submetidas a tratamento controle e estresse hídrico durante 7 dias utilizando 20% de PEG.....	60
<b>Tabela 21.</b> Parâmetros referentes ao mapeamento, trimagem e contagem das reads obtidas após o sequenciamento do RNA em raízes das variedades Catetão e Mira às 2 e 12h após a aplicação de 20% de PEG. O Genoma de japônica foi utilizado como referência para o mapeamento. ....	67
<b>Tabela 22.</b> Consistência do genoma de japônica mapeado de acordo com o número de reads. ....	67
<b>Tabela 23.</b> Percentual do genoma de japônica mapeado de acordo com o número de reads. .	67
<b>Tabela 24.</b> Lista contendo os vinte genes mais expressos na variedade Catetão às 2 ou 12h após a aplicação do estresse hídrico com 20% de PEG. A taxa de mudança representa a comparação dos valores de expressão de Catetão versus Mira às 2 e 12h.....	73
<b>Tabela 25.</b> Lista contendo a quantidade de fatores de transcrição diferencialmente expressos às 2 e 12h na comparação Catetão versus Mira. ....	76
<b>Tabela 26.</b> Lista contendo os dez fatores de transcrição mais expressos na variedade Catetão às 2 ou 12h após a aplicação do estresse hídrico com 20% de PEG. A taxa de mudança representa a comparação dos valores de expressão de Catetão versus Mira às 2 e 12h. ...	77
<b>Tabela 27.</b> Lista contendo os dez genes desconhecidos mais expressos na variedade Catetão às 2 ou 12h após a aplicação do estresse hídrico com 20% de PEG. A taxa de mudança representa a comparação dos valores de expressão de Catetão versus Mira às 2 e 12h. ...	80
<b>Tabela anexo 1.</b> Massa fresca (g vaso <sup>-1</sup> ) de parte aérea e raiz das variedades de arroz de sequeiro cultivadas em casa de vegetação sob condição controle e estresse hídrico.....	103

<b>Tabela anexo 2.</b> Massa fresca (g vaso <sup>-1</sup> ) de raiz em duas profundidades (0 – 30 cm) e (30 – 130 cm) nas variedades de arroz de sequeiro cultivadas em casa de vegetação sob condição controle e estresse hídrico.....	103
<b>Tabela anexo 3.</b> Resumo dos principais índices de tolerância ao estresse utilizado.....	104
<b>Tabela anexo 4.</b> Análise de Variância Multivariada (MANOVA) baseada nas características morfológicas e fisiológicas em dez variedades de arroz cultivadas em casa de vegetação submetidas ao tratamento controle e estresse hídrico. Consistência do padrão de agrupamento proporcionado pelas técnicas do vizinho mais próximo, vizinho mais distante, UPGMA e Ward em relação à distância de Mahalanobis (D2), para variáveis quantitativas, em função do coeficiente de correlação cofenética, e consistência via Mantel. ....	104
<b>Tabela anexo 5.</b> Componentes principais (CP), autovalores ( $\lambda_i$ ) e porcentagem de variância explicada pelos componentes (% VCP) das características morfológicas e componentes de produtividade nas dez variedades de arroz submetidas ao tratamento controle e estresse hídrico durante o período reprodutivo em casa de vegetação. ....	105
<b>Tabela anexo 6.</b> Componentes principais (CP), autovalores ( $\lambda_i$ ) e porcentagem de variância explicada pelos componentes (% VCP) das características fisiológicas nas dez variedades de arroz submetidas ao tratamento controle e estresse hídrico durante o período reprodutivo em casa de vegetação. ....	105
<b>Tabela anexo 7.</b> Correlação de pearson para as características morfológicas: folha, colmo, raiz, panícula, tamanho, perfilho, profundidade, produção, massa de 100 grãos, esterelidade da espiguetta e índice de colheita (IC). ....	105
<b>Tabela anexo 8.</b> Correlação de pearson para as características fisiológicas: teor relativo de água (TRA), extravasamento de eletrólitos (EE), peroxidação de lipídeos (MDA), proteína, índice SPAD, clorofila a (Chla), clorofila b (Chlb) e carotenóides (caroten.).	106
<b>Tabela anexo 9.</b> Massa fresca (g vaso <sup>-1</sup> ) de parte aérea, raiz e razão raiz parte aérea das variedades Catetão, Mira, Piauí e Quebra Cacho submetidas a tratamento controle e estresse hídrico durante 14 dias. ....	106
<b>Tabela anexo 10.</b> Parâmetros referentes ao mapeamento, trimagem e contagem das reads obtidas após o sequenciamento do RNA em raízes das variedades Catetão e Mira às 2 e 12h após a aplicação de 20% de PEG. O Genoma de Índica foi utilizado como referência para o mapeamento. ....	107
<b>Tabela anexo 11.</b> Consistência do genoma de índica mapeado de acordo com o número de reads. ....	107
<b>Tabela anexo 12.</b> Percentual do genoma de índica mapeado de acordo com o número de reads. ....	107

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Vias de regulação transcricional ABA dependente e independente e expressão gênica. Pelo menos quatro vias de transdução de sinais existem em resposta a seca em arroz. .... 11
- Figura 2.** Revisão esquemática de um sistema biológico para estudar a resposta ao estresse hídrico em plantas de arroz. .... 14
- Figura 3.** Ensaio típico de RNA-seq, onde longos RNAs são primeiramente convertidos numa biblioteca de fragmentos de cDNA por meio da fragmentação do RNA ou cDNA. Adaptadores são adicionados a cada fragmento de cDNA e uma sequência curta é obtida de cada cDNA. Os fragmentos resultantes são alinhados com o genoma de referência ou transcriptoma, e classificados como três tipos: fragmento exônico, fragmento de junção e fragmento final incluindo a poli A. Esses três tipos são usados para gerar uma resolução de base para o perfil de expressão de cada gene, como ilustrado no final..... 16
- Figura 4.** Variedades de arroz de sequeiro selecionadas para a avaliação das características morfológicas, componentes de produtividade e características fisiológicas sob estresse hídrico. Plantas de arroz aos 50 dias após a semeadura (A). Início da aplicação do estresse hídrico na antese (B). Variedades de arroz após 20 dias de estresse hídrico, controle (C) e estresse (D)..... 29
- Figura 5.** Índice de suscetibilidade ao estresse (SSI) das variedades de arroz de sequeiro cultivadas em casa de vegetação sob condição controle e estresse hídrico. .... 37
- Figura 6.** Clorofila a (A), clorofila b (B), razão a/b (C) e carotenóides (D) de folhas bandeira das variedades de arroz de sequeiro cultivadas em casa de vegetação sob condição controle e estresse hídrico. .... 39
- Figura 7.** Teor Relativo de Água (TRA, %) (A), extravasamento de eletrólitos (EE, %) (B) e peroxidação de lipídeos em folhas +2 (MDA, g-1 MF) (C) das variedades de arroz de sequeiro cultivadas em casa de vegetação sob condição controle e estresse hídrico. Barra vertical indica o erro padrão da média de quatro repetições por tratamento. .... 41
- Figura 8.** Teores de Prolina em folhas maduras ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  MF) das variedades de arroz de sequeiro cultivadas em casa de vegetação sob condição controle e estresse hídrico. Barra vertical indica o erro padrão da média de quatro repetições por tratamento. .... 43
- Figura 9.** Proteína bruta no grão (%) das variedades de arroz de sequeiro cultivadas em casa de vegetação sob condição controle e estresse hídrico. Barra vertical indica o erro padrão da média de quatro repetições por tratamento. .... 44
- Figura 10.** Dendrograma de dissimilaridades genéticas pela distância de mahalanobis e método de agrupamento “UPGMA”, com base nas características morfológicas e fisiológicas analisadas nas variedades de arroz de sequeiro cultivadas em casa de vegetação sob condição controle e estresse hídrico. .... 45
- Figura 11.** Análise de componentes principais baseado nas características morfológicas e componentes de produtividade (A) e características fisiológicas (B) em 10 variedades de arroz de sequeiro cultivadas em casa de vegetação e submetidas ao tratamento controle e

estresse hídrico durante o período reprodutivo. 1, 2 - Bico Ganga Controle/Estresse.; 3, 4 - Catetão Controle/Estresse; 5, 6 - Manteiga Controle/Estresse; 7, 8 - Mira Controle/Estresse; 9, 10 - Palha Murcha Controle/Estresse; 11, 12 - Piauí Controle/Estresse; 13, 14 - Prata Ligeiro Controle/Estresse; 15, 16 - Quebra Cacho Controle/Estresse; 17, 18 - Sempre Verde Controle/Estresse e 19, 20 - Três Meses Controle/Estresse. ....	47
<b>Figura 12.</b> Raízes das variedades de arroz Catetão, Mira, Piauí e Quebra Cacho que atravessaram as peneiras nos ângulos de 0-30°; 30-60° e 60-90° quando submetidas ao tratamento controle e estresse hídrico durante 14 dias. ....	49
<b>Figura 13.</b> Parte aérea e raízes das variedades Catetão, Mira, Piauí e Quebra Cacho cultivadas em câmara de crescimento e submetidas a tratamento controle e estresse hídrico durante 14 dias. ....	51
<b>Figura 14.</b> Raízes íntegras (A) e raízes nodais com laterais (B), evidenciando as diferenças morfológicas das variedades Catetão e Mira após submissão a tratamento controle e estresse hídrico durante 7 dias utilizando 20% de PEG. Barras representam 1 cm. Raízes nodais de três repetições de plantas. ....	55
<b>Figura 15.</b> Número total de pontas (A) e densidade de raízes laterais (B) representado pela razão entre pontas/comprimento das variedades Catetão e Mira submetidas a tratamento controle e estresse hídrico durante 7 dias utilizando 20% de PEG. ....	56
<b>Figura 16.</b> Corte transversal retirado a 5,0 mm acima da ponta de uma raiz primária evidenciando as diferenças anatômicas das variedades de arroz Catetão e Mira após 7 dias de estresse hídrico utilizando 20% de PEG ou controle. Barras representam 100 µm. Imagens foram obtidas utilizando o microscópio Axiovert 200 M. ....	57
<b>Figura 17.</b> Diâmetro das células do córtex (A) e diâmetro dos metaxilemas (B) obtidos das variedades Catetão e Mira submetidas a tratamento controle e estresse hídrico durante 7 dias utilizando 20% de PEG. ....	58
<b>Figura 18.</b> Corte transversal retirado do terço médio das variedades Catetão e Mira após 7 dias de estresse hídrico utilizando 20% de PEG ou controle. Os fragmentos foram retirados de aproximadamente 80 mm para o tratamento sob estresse hídrico e 5,0 cm para o tratamento controle (uma vez que as raízes no tratamento de estresse hídrico são mais longas do que no tratamento controle). ....	59
<b>Figura 19.</b> Expressão relativa de genes utilizados como controle endógeno em arroz nas variedades Catetão e Mira. Coletas foram realizadas às 0, 2, 6, 12, 24 e 48h após a aplicação de 20% de PEG. Os valores no tempo 0 foram utilizados como referência (n = 4). ....	61
<b>Figura 20.</b> Expressão relativa de fatores de transcrição das famílias NAC, ZF, MYB, AREB/ABF, AP2/ERF representado pelos genes OsNAC10 (A), OsWRKY11 (B), OsMYB4 (C), OsDREB1A (D), OsZIP71 (E) e OsqRT9 (F) nas raízes das variedades Catetão e Mira. Coletas foram realizadas às 0, 2, 6, 12, 24 e 48h após a aplicação de 20% de PEG. Valores representam a razão entre o controle e estresse dentro de cada tempo (n = 4). Os genes da UBC e da UBQ5 foram utilizados como controle endógeno. ....	62



- Figura 21.** Expressão relativa de genes relacionados a tolerância ao estresse hídrico OsCOR413 (A), OsDRO1 (B), NCED (C) e Ca<sup>+2</sup>-ATPase (D) nas raízes das variedades Catetão e Mira. Coletas foram realizadas às 0, 2, 6, 12, 24 e 48h após a aplicação de 20% de PEG. Valores representam a razão entre o controle e estresse dentro de cada tempo (n = 4). Os genes da UBC e da UBQ5 foram utilizados como controle endógeno. .... 64
- Figura 22.** Expressão relativa de genes relacionados ao ciclo celular representado por ciclina tipo-B, OsCyCB1.1 (A); Ciclina tipo-D, OsCyCD4.1 (B); Ciclina dependente de kinase, OsCDKB1 (C) e complexo de reconhecimento de origem, OsORC3 (D) nas raízes das variedades Catetão e Mira. Coletas foram realizadas às 0, 2, 6, 12, 24 e 48h após a aplicação de 20% de PEG. Valores representam a razão entre o controle e estresse dentro de cada tempo (n = 4). Os genes da UBC e da UBQ5 foram utilizados como controle endógeno. .... 65
- Figura 23.** Número total de genes induzidos pelo estresse hídrico nas variedades Catetão e Mira às 2 e 12h após a aplicação de 20% de PEG. .... 68
- Figura 24.** Classificação de genes diferencialmente expressos na variedade Catetão às 2 e 12h (A) e na Mira às 2 e 12h através da ontologia do gene em 26 subcategorias considerando as três categorias principais: processos biológicos, componente celular e função molecular..... 70
- Figura 25.** Diagrama de Venn representando o número de genes diferencialmente expressos entre Catetão e Mira às 2 e 12h após a aplicação do estresse hídrico com 20% de PEG. . 71
- Figura 26.** Número de genes diferencialmente expressos na comparação Catetão versus Mira às 2 e 12h após a aplicação do estresse hídrico com 20% de PEG. .... 71
- Figura 27.** Diagrama de Venn representando o número de genes induzidos e reprimidos às 2 e 12h na comparação Catetão versus Mira após a aplicação do estresse hídrico com 20% de PEG. .... 72
- Figura 28.** Gráficos dos dezenove genes mais expressos às 2 ou 12h na variedade Catetão e Mira após a aplicação do estresse hídrico com 20% de PEG. Cada variedade teve seus valores de taxa de mudança comparado com seus respectivos controles dentro do tempo. .... 76
- Figura 29.** Gráficos dos dez fatores de transcrição mais expressos às 2 ou 12h na variedade Catetão e Mira após a aplicação do estresse hídrico com 20% de PEG. Cada variedade teve seus valores de taxa de mudança comparado com seus respectivos controles dentro do tempo..... 79
- Figura 30.** Gráficos dos oito genes desconhecidos mais expressos às 2 ou 12h na variedade Catetão e Mira após a aplicação do estresse hídrico com 20% de PEG. Cada variedade teve seus valores de taxa de mudança comparado com seus respectivos controles dentro do tempo..... 81
- Figura anexo 1.** Análise do número de grupos baseado no agrupamento pelo método UPGMA utilizando o pacote MapTree no programa R. .... 108

- Figura anexo 2.** Análise de componente principal baseado nas características morfológicas e componentes de produtividade (A) e características fisiológicas (B) em dez variedades de arroz de sequeiro cultivadas em casa de vegetação e submetidas ao tratamento controle e estresse hídrico durante o período reprodutivo. 1, 2 - Bico Ganga Controle/Estresse.; 3, 4 - Catetão Controle/Estresse; 5, 6 - Manteiga Controle/Estresse; 7, 8 - Mira Controle/Estresse; 9, 10 - Palha Murcha Controle/Estresse; 11, 12 - Piauí Controle/Estresse; 13, 14 - Prata Ligeiro Controle/Estresse; 15, 16 - Quebra Cacho Controle/Estresse; 17, 18 - Sempre Verde Controle/Estresse e 19, 20 - Três Meses Controle/Estresse. .... 108
- Figura anexo 3.** Expressão relativa dos genes da UBC e UBQ5 ao longo do tempo. Genes utilizados como controle endógeno no experimento V. Coletas foram realizadas às 0, 2, 6, 12, 24 e 48h após a aplicação de 20% de PEG (n = 4). As letras A, B e C representam três repetições técnicas..... 109
- Figura anexo 4.** Agrupamento da expressão relativa dos fatores de transcrição das famílias NAC, ZF, MYB, AREB/ABF e AP2/ERF nas variedades Catetão e Mira para identificação dos tempos de maior alteração na expressão de genes relacionados a tolerância ao estresse hídrico. Coletas foram realizadas às 0, 2, 6, 12, 24 e 48h após a aplicação de 20% de PEG. Valores representam a razão entre o controle e estresse dentro de cada tempo (n = 4). Os genes da UBC e da UBQ5 foram utilizados como controle endógeno. .... 110

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
2.1	Importância da Cultura do Arroz.....	3
2.2	Desafios para a Produção Agrícola .....	4
2.3	O Estresse Hídrico .....	5
2.4	O Estresse Hídrico e o Metabolismo de Carbono e Nitrogênio .....	6
2.5	O Estresse Hídrico e a Expressão de Aquaporinas.....	7
2.6	O Sistema Radicular em Ambientes Sujeitos ao Estresse Hídrico .....	8
2.7	Acúmulo de Moléculas Orgânicas em Condição de Estresse Hídrico.....	9
2.8	A Regulação da Abertura e Fechamento Estomático na Eficiência de Uso de Água (EUA). .....	10
2.9	Fatores de Transcrição e Genes Envolvidos com a Tolerância ao Estresse Hídrico .....	11
2.10	Estudo do Transcriptoma Vegetal Submetido ao Estresse Hídrico .....	13
2.11	O Sequenciamento do RNA.....	15
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
3.1	<b>Avaliação de Características Morfológicas, Componentes de Produtividade e Características Fisiológicas</b> .....	<b>18</b>
3.1.1	Avaliação de características morfológicas, índice de colheita e determinação do índice de suscetibilidade ao estresse hídrico .....	20
3.1.2	Determinação do teor de N-total no grão e proteína .....	20
3.1.3	Teor relativo de água .....	21
3.1.4	Estabilidade das membranas.....	21
3.1.5	Peroxidação de lipídeos .....	21
3.1.6	Prolina livre .....	21
3.1.7	Índice SPAD .....	22
3.1.8	Determinação de clorofila a, b e carotenóides.....	22
3.2	<b>Avaliação do Ângulo Radicular e Taxa de Raízes Profundas pelo Método das Peneiras em Quatro Variedades de Arroz Contrastantes Quanto a Tolerância ao Estresse Hídrico</b> .....	<b>22</b>
3.3	<b>Avaliação de Parâmetros Radiculares em Quatro Variedades de Arroz Contrastantes Quanto a Tolerância ao Estresse Hídrico</b> .....	<b>22</b>
3.3.1	Parâmetros radiculares utilizando o programa Rootgraph .....	23
3.4	<b>Avaliação de Parâmetros Radiculares e Anatômicos em Duas Variedades de Arroz Contrastantes quanto a Tolerância ao Estresse Hídrico</b> .....	<b>23</b>
3.4.1	Parâmetros radiculares e anatômicos utilizando os programas Rootgraph e PHIV root cell.....	24
3.5	<b>Expressão de Genes em Duas Variedades de Arroz Contrastantes Quanto a Tolerância ao Estresse Hídrico</b> .....	<b>24</b>
3.5.1	Extração de RNA total.....	24
3.5.2	Tratamento com DNase, limpeza do RNA e síntese do cDNA.....	25
3.5.3	PCR em tempo real.....	25
3.5.4	Seleção de genes de referência .....	25
3.5.5	Iniciadores para os estudos de expressão gênica .....	26
3.6	<b>Análise do Transcriptoma em Duas Variedades de Arroz Contrastantes Quanto a Tolerância ao Estresse Hídrico</b> .....	<b>27</b>

3.6.1	Extração de RNA e preparo das amostras para sequenciamento utilizando a plataforma Illumina NextSeq 500 .....	27
3.6.2	Montagem, anotação gênica e quantificação do nível de expressão .....	27
<b>3.7</b>	<b>Análise Estatística .....</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
4.1	Determinação das Características Morfológicas, Fisiológicas e Componentes de Produtividade em Variedades de Arroz de Sequeiro .....	29
4.2	Avaliação da Morfologia Radicular e Expressão de Genes Relacionados a Tolerância ao Estresse Hídrico .....	53
4.3	Identificação de Novos Alvos Biotecnológicos .....	66
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>82</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>84</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>103</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O aumento constante da população mundial e a mudança climática do planeta têm modificado a forma de se fazer agricultura e cada vez mais se busca alcançar altas produtividades em áreas antes consideradas marginais. Para lidar com essa mudança, é necessário gerar conhecimento e produzir plantas melhoradas para ambientes sujeitos a estresses abióticos. O estresse hídrico é um dos principais estresses ambientais e tem afetado seriamente o crescimento e produtividade das culturas agrícolas.

Durante a revolução verde, pesquisadores e melhoristas focaram na melhoria da produtividade provendo ambientes ideais: solos pobres receberam grandes aplicações de fertilizantes NPK, terras secas foram irrigadas e um manejo intensivo de pragas (insetos e ervas invasoras) foi estabelecido de modo que cultivos altamente produtivos desenvolvidos nessas condições foram capazes de prosperar. No entanto, a iminente escassez de água está mudando esse panorama (PENNISI, 2008).

Em 2008, o Secretário-geral da Organização das Nações Unidas General Kofi Annan em seu discurso para os países em desenvolvimento na Conferência do milênio declarou: “Nós necessitamos de uma revolução azul na agricultura que foque no aumento da produtividade por unidade de água” (UNITED NATIONS, 2008). Nove anos se passaram desde a chamada por uma “revolução azul” na agricultura pelo ex-secretário da ONU e muitos ainda são os desafios para se alcançar tal revolução, entre eles temos: os recursos hídricos da terra cada vez mais limitados, crescimento populacional em expansão e aumento de áreas sofrendo com a desertificação. Diante desse quadro, a necessidade de se gerar cultivos produtivos com menor utilização de água tem se tornado urgente.

Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) até 2025 1,8 milhões de pessoas estarão vivendo em países ou regiões com absoluta falta de água e dois terços viverão em zonas com falta de água (FAO, 2015). O cenário mundial mostra que o uso da água é muito mais intenso do que há poucas décadas atrás. Atualmente, cerca de 70% destina-se à agricultura, 20% à indústria e 10% para o consumo humano. Esse uso intenso da água, principalmente na agricultura e na indústria, ocorre num ritmo mais acelerado que a reposição feita pelo seu ciclo natural (GOMES et al., 2009). De acordo com o Instituto Internacional de Gestão da Água (IWMI), até 2025 a demanda de água para a agricultura irá aumentar em 17%, o que vai aumentar ainda mais a competitividade para a utilização desse recurso com o consumo humano (SIWI-IWMI, 2004). Portanto, a melhoria da tolerância ao estresse hídrico nas culturas agrícolas e, em especial para o arroz, tem se tornado uma importante estratégia para estabilizar a sua produção em cultivo de sequeiro.

A produção de 1 quilograma de arroz pode demandar até 3.000L de água em campos inundados, o maior consumo de água de todos os cereais produzidos (BOUMAN et al., 2007). Diante disso, o desenvolvimento de cultivares de arroz tolerante à deficiência hídrica é um dos principais desafios da pesquisa agrícola mundial, uma vez que a planta de arroz é considerada, evolutivamente, semi-aquática (WASSMANN et al., 2009).

Diversas características morfológicas e fisiológicas para a resistência a seca em arroz foram usadas como marcadores seletivos para o melhoramento, no entanto os mecanismos exatos de resistência à seca ainda não estão bem esclarecidos (TARDIEU; TUBEROSA, 2010). Grupos de pesquisa têm focado em diferentes estratégias de seleção de plantas, dentre elas tem-se: linhagens que possuam raízes mais finas e em profundidade, capacidade de regulação estomática, acúmulo de osmólitos compatíveis, expressão e atividade de

aquaporinas, metabolismo de carbono e nitrogênio, entre outras numa tentativa de desenvolver variedades de arroz mais tolerantes ao déficit hídrico.

Ao longo de mais de quatro décadas de pesquisa, o Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas (LNMP) da UFRRJ vêm formando um banco de sementes com variedades de arroz locais cultivadas no estado do Maranhão em sistema de sequeiro. O'TOOLE e BLAND (1987) relatam que cultivares de arroz tradicionalmente cultivadas em sistema de sequeiro apresenta raízes mais profundas que as cultivares de várzeas. Trabalhos desenvolvidos no LNMP-UFRRJ têm mostrado que essas variedades apresentam variações na morfologia e arquitetura do sistema radicular, podendo essa ser uma característica envolvida na tolerância ao déficit hídrico (RANGEL, 2014).

Desse modo, o presente trabalho apresenta as seguintes hipóteses: (i) plantas de arroz tolerantes ao déficit hídrico apresentam características morfológicas, fisiológicas e expressão de genes diferente do observado em plantas sensíveis possibilitando a manutenção de níveis razoáveis de produção mesmo em condição de estresse hídrico. (ii) A morfologia radicular é uma característica divergente entre variedades tolerantes e sensíveis ao estresse hídrico.

A partir das hipóteses definidas, o trabalho teve como objetivos: (i) identificar variedades de arroz de sequeiro contrastantes quanto à tolerância ao estresse hídrico por meio da avaliação de características morfológicas e fisiológicas, (ii) explorar parâmetros radiculares que possam explicar a diferença entre variedades tolerantes e sensíveis ao estresse hídrico e (iii) identificar novos alvos biotecnológicos envolvidos na tolerância ao estresse hídrico por meio da análise do perfil de transcritos nas variedades de arroz contrastantes.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Importância da Cultura do Arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é considerado um dos principais cereais cultivados no mundo, produzido para a alimentação humana e capaz de fornecer cerca de 20% da energia e 15% da proteína *per capita* necessária a dieta diária (EMBRAPA, 2005). Atualmente, mais da metade da população mundial tem esse cereal como alimento básico e diário, sendo considerada a espécie com maior potencial para eliminar a fome mundial. O arroz é a terceira maior cultura cerealífera, ultrapassada apenas pelo milho e pelo trigo (FAO, 2016).

O arroz é produzido em mais de cem países com uma área total colhida de aproximadamente 158 milhões de hectares, das quais a metade é cultivada em sistema irrigado ou inundado representando 75% da produção mundial (IRRI, 2010). A outra metade é produzida em sistema de sequeiro e responde pelos 25% restantes de produção. Apesar de a produtividade ter mais que dobrado nos últimos 30 anos em sistema irrigado, apenas ganho modesto tem ocorrido em sistema de sequeiro (FISHER et al., 2003). De 1961 a 2014 a produção mundial de arroz aumentou 2,5 vezes o que excedeu a taxa de crescimento populacional e contribuiu para a redução de pessoas subnutridas (FAO, 2015). No entanto, até o ano de 2030 estima-se que essa produção terá que aumentar em, aproximadamente, 50% (AHMADI et al., 2014).

De acordo com a FAO (2016), o Brasil é o nono maior produtor mundial de arroz e destaca-se como o maior produtor fora do continente asiático. O Rio Grande do Sul se destaca como o maior produtor de arroz irrigado. Já a área plantada com arroz de sequeiro fica concentrada na região Centro-Oeste (Mato Grosso e Goiás); Nordeste (Piauí e Maranhão) e Norte (Tocantins, Pará, Rondônia) (CONAB, 2013).

Ao longo das últimas três décadas, o Brasil reduziu a área de plantio em torno de 26% e, mesmo assim, aumentou sua produção de arroz em 69%, graças a um aumento significativo na produtividade média. Essa redução de área de plantio e aumento de produtividade é consequência do maior aporte de fertilizantes NPK nas lavouras e da maior utilização de cultivares melhoradas para ambientes sem qualquer restrição nutricional e hídrica (MAPA, 2012).

A produção nacional aproxima-se do consumo doméstico. Em alguns anos, o país consegue ser superavitário, gerando excedentes exportáveis, os quais estão sendo comercializados, principalmente, com os países africanos (WANDER, 2015). O crescimento de produção permitiu ao país tornar-se autossuficiente em arroz na safra 2003/2004 e exportar, cerca de 5% de sua produção (MAPA, 2012).

O arroz pode ser cultivado em diferentes ecossistemas, são eles: a) sistema de sequeiro, tendo a sua demanda hídrica suprida apenas com água das chuvas, b) sistema irrigado, em áreas sistematizadas ou não, onde a cultura recebe água de forma controlada, via inundação ou aspersão e c) sistema de várzeas, onde os produtores aproveitam as águas de rios nas suas margens (vazantes), sem que tenham o controle da lâmina d'água na lavoura (POEHLMAN e SLEPER, 1995).

No Brasil, o arroz é cultivado predominantemente na forma de sequeiro ou inundado. O plantio do arroz de sequeiro ocorre na estação chuvosa de outubro a dezembro, no entanto sabe-se que pelo fato dessa cultura não receber irrigação artificial estará sujeita a períodos de seca que podem reduzir sua produtividade. Já o arroz inundado, exige um maior nível de tecnificação pelo produtor, porém está menos sujeito a perdas, pelo fato da planta não passar por períodos de déficit hídrico (RABELLO et al., 2008).

O arroz de sequeiro, pouco exigente em insumos e tolerante a solos ácidos, apresenta-se como uma alternativa para agricultores de baixa renda. Durante a década de 60, destacou-se como cultura pioneira na ocupação de novas áreas de cerrado. Em meados da década de 80 a área cultivada com arroz de sequeiro foi gradativamente sendo reduzida e transferida para regiões menos sujeitas a grandes variações climáticas e com a utilização de irrigação (PINHEIRO, 2003). Apesar disso, o Brasil é um dos poucos países no mundo em que o arroz de sequeiro é de fundamental importância no abastecimento interno, atuando como regulador de preços, além de constituir alternativa de renda para pequenos produtores, a exemplo do que acontece no Estado do Maranhão (CONAB, 2013; WANDER, 2015).

De acordo com o IBGE (2016), o cultivo do arroz irrigado é responsável por 81,4% da produção brasileira. É importante destacar que esse cultivo é realizado com cultivares melhoradas, em solos de alta fertilidade e menos sujeitos a intempéries, o que favorece as altas produtividade. Já o cultivo de arroz de sequeiro tem reduzido, consideravelmente, a sua participação no mercado. Esta queda de importância do arroz de sequeiro deve-se ao fato de a cultura apresentar menor produtividade, maior risco econômico e uma relação risco/retorno também desfavorável, uma vez que recebe menos insumos tecnológicos (RICARDO, 2010).

Para mudar esse quadro, investimentos têm sido feitos desde a década de 1990, com destaque para a obtenção de cultivares tolerantes a seca, adoção de técnicas de plantio, preparo do solo e manejo de fertilizantes, visando ao aprofundamento do sistema radicular e aumento da reserva útil de água no solo (PINHEIRO, 2003).

## **2.2 Desafios para a Produção Agrícola**

Assim como relatado para a rizicultura brasileira, as produtividades da maioria das grandes culturas têm aumentado significativamente nos últimos 50 anos, em grande parte devido ao aumento do uso da irrigação, insumos químicos e variedades melhoradas (LOBELL e GOURDJI, 2012). A duplicação da produção de alimentos até 1990 pode ser parcialmente, atribuída ao aumento de aplicação de 6,9 vezes de fertilizantes nitrogenados, 3,5 vezes de fósforo, 3,5 vezes no aumento da área irrigada e 1,1 vezes de terra cultivável (TILMAN et al., 2001).

Apesar desses avanços, as mudanças climáticas globais, o crescimento da população e a manutenção dos padrões de vida exigem uma abordagem de maior redução da expansão da fronteira agrícola, melhorando a produção de biomassa e produção de grãos por área, sobretudo as áreas consideradas marginais (MUELLER et al., 2012). Melhorar a eficiência de uso em detrimento do aumento do uso de recursos deve ser prioridade, principalmente, se os objetivos forem atender a duplicação da demanda por alimentos que é projetada para os próximos 50 anos (CHEN et al., 2014).

As mudanças climáticas também têm trazido muita incerteza ao agronegócio, já que variações climáticas estão frequentemente resultando em perda de produtividade das culturas. Relatórios destacando as baixas colheitas e aumentos dos preços dos alimentos sugerem que a resolução destes problemas deve ser imediata (FAO, 2012), mas atender a segurança alimentar e os desafios da sustentabilidade das próximas décadas vai exigir mudanças consideráveis na gestão de nutrientes e água (MUELLER et al., 2012).

Estima-se que até 2050 a população mundial deve chegar a 9,1 bilhões de habitantes, exigindo fortes mudanças para as próximas décadas com o intuito de acomodar as necessidades da população em expansão com o desenvolvimento de uma agricultura altamente produtiva e com responsabilidade socioambiental por meio da introdução de inovações tecnológicas (DYSON, 1999; FAO, 2009).



Diferentemente do que ocorreu durante a revolução verde e frente às mudanças climáticas globais, o novo paradigma da produção agrícola mundial é produzir mais mesmo em condições adversas (FAO, 2012). Dessa forma, o melhoramento da cultura do arroz para ambientes antes considerados impróprios para o plantio, poderá ser feito baseando-se em variedades de arroz tradicionalmente cultivadas em regiões de sequeiro pelo fato destas apresentarem mecanismos de tolerância ao déficit hídrico que poderão ser inseridos em cultivares mais produtivas. No entanto, sabe-se que o progresso no melhoramento genético de arroz para ambientes com limitações na disponibilidade de água tem sido fraco e limitado (EVENSON e GOLLIN, 2003). Dessa forma, o entendimento das bases moleculares relacionada à tolerância ao estresse hídrico irá contribuir, significativamente, no melhoramento genético visando à obtenção de cultivares elite adaptadas à ambiente de restrição hídrica (LANG et al., 2010).

### **2.3 O Estresse Hídrico**

A produtividade das culturas agrícolas é negativamente influenciada por uma grande gama de fatores ambientais. Estresses abióticos são as primeiras causas de redução de crescimento e produtividade das culturas, e entre esses, seca, salinidade, temperatura, toxidez por alumínio, alagamento, poluição e radiação estão entre os mais frequentes (LAWLOR e CORNIC, 2002). Estima-se que os estresses abióticos podem reduzir a produtividade das culturas em até 70% (BOYER, 1982) e dentro desse contexto, o estresse hídrico é considerado um dos principais fatores abióticos que limitam a produção global de alimentos (ARAUS et al., 2002), afetando aproximadamente 64% de toda a terra cultivável no mundo (CRAMER et al., 2011). Segundo MAHAJAN e TUTEJA (2006), estresses abióticos causam a perda de milhões de dólares a cada ano devido à redução da produtividade de grãos, o que ameaça a sustentabilidade da agricultura.

Em ambiente natural as plantas encontram diversas condições desfavoráveis que interrompem o seu crescimento normal e produtividade (UMEZAWA et al., 2006). Dentre essas condições desfavoráveis, o estresse hídrico é o mais importante fator limitante para produção de diversas culturas e tem se tornado um crescente e severo problema em muitas regiões do mundo (PASSIOURA, 2007). A cultura do arroz é particularmente sensível ao estresse hídrico, e estima-se que 50% da produção de arroz no mundo está relacionada a ocorrência ou não de seca (BOUMAN et al., 2005).

PASSIOURA (1997) citado por PIMENTEL (2004) define a seca como um evento no qual as plantas mostram redução do seu crescimento ou produtividade, devido a um baixo conteúdo de água no solo ou a um grande déficit de umidade do ar, mesmo com um suprimento adequado de água. Durante este evento há uma maior demanda de energia para a sobrevivência da planta do que para a sua produção, onde após um período inicial de instabilidade há eventos de sinalização que induzem processos fisiológicos de adaptação (LARCHER, 2000; MAHAJAN e TUTEJA 2006).

A resistência ao estresse hídrico pode ser dividida em quatro respostas das plantas ao estresse: (i) tolerância à seca – a habilidade das células e tecidos de resistir a um reduzido potencial de água durante um déficit hídrico; (ii) evitação à seca – a habilidade das plantas em prevenir a redução da água nos tecidos durante o déficit hídrico; (iii) escape a seca – a habilidade das plantas de completar seu ciclo de vida dentro do período de disponibilidade hídrica, desse modo não estando sujeita a um período de déficit hídrico; (iv) recuperação da seca – a habilidade das plantas de retornar o crescimento e terminar seu ciclo de vida após um período de déficit hídrico (O'TOOLE AND CHANG, 1979).

## 2.4 O Estresse Hídrico e o Metabolismo de Carbono e Nitrogênio

A absorção e a assimilação de nutrientes podem ser diretamente afetadas pelo estresse hídrico. No entanto, plantas com maior tolerância ao dessecamento apresentam uma resposta diferencial na expressão e atividade de proteínas envolvidas na absorção e assimilação, como observado para o nitrogênio (N). O N é um dos elementos mais limitantes ao crescimento das plantas, portanto tem-se buscado identificar mecanismos que beneficiem as plantas em ambientes sujeitos a estresses abióticos para que sua absorção e uso não sejam prejudicados.

Durante prolongado estresse por seca, a diminuição da disponibilidade de água na planta afeta o transporte de nutrientes via xilema, menor absorção de N e redução na disponibilidade de CO<sub>2</sub> para fotossíntese, devido ao fechamento estomático e, conseqüentemente, distúrbios no metabolismo de carbono (C) e N. Deste modo, plantas que conseguem manter este metabolismo primário sobre estresse hídrico são essenciais para o desenvolvimento de cultivares tolerante (XU e ZHOU, 2006; SINGH e GHOSH, 2013).

A alta atividade da glutamina sintetase (GS) durante a deficiência hídrica pode ser responsável pela manutenção do crescimento e produtividade das plantas mesmo em condições limitantes. As isoformas de GS são diferencialmente reguladas em resposta ao *status* de N da planta assim como sinais ambientais (OLIVEIRA e CORUZZI, 1999).

Em arroz, foram identificados três genes que codificam para a glutamina sintetase citossólica (GS1): *OsGS1.1*, *OsGS1.2* e *OsGS1.3*. A isoforma *OsGS1.1* apresentou expressão em todos os órgãos testados, já *OsGS1.2* e *OsGS1.3* foram preferencialmente expressos em raízes e espiguetas, respectivamente. Em tecidos verdes com alta taxa fotossintética, a isoforma GS2 encontra-se em maior proporção, além de ser responsável pela maior porcentagem da atividade total da GS, principalmente no limbo foliar (TABUCHI et al., 2005).

Plantas de arroz da cultivar Kinuhikari foram transformadas utilizando um promotor forte (35S) visando o aumento de expressão da proteína *OsGS2*. Em uma das linhagens transformadas (G39-2) obteve-se um aumento de 1,5 vezes mais GS2 do que em plantas controle (WT). Também foi observado aumento da capacidade fotorrespiratória nessas plantas e manutenção de aproximadamente 90% de atividade do fotossistema II após duas semanas de estresse osmótico quando comparado a WT. Esse trabalho mostrou que a maior atividade da GS2 está diretamente relacionada a uma maior tolerância da planta ao estresse salino (HOSHIDA et al., 2000).

SINGH E GHOSH (2013) relataram uma resposta diferencial na atividade e expressão das isoformas de GS na parte aérea e raízes entre plantas da cultivar Khitish (tolerante ao estresse hídrico) e IR 64 (sensível ao estresse hídrico). A manutenção de alta atividade de *OsGS2* em folhas e a superexpressão de *OsGS1.1* podem contribuir para melhoria da tolerância ao estresse hídrico em arroz, visto que essas proteínas estão envolvidas na manutenção da capacidade fotossintética, fotorrespiratória e remobilização de N para os grãos.

Em plantas sob déficit hídrico PELEG et al. (2011) e REGUERA et al. (2013) observaram redução na etapa de carboxilação da fotossíntese e menor assimilação de CO<sub>2</sub>. A menor produção de esqueletos de carbono prejudica a assimilação de N e a produção de aminoácidos, comprometendo assim o crescimento e produção das plantas nesses ambientes. Em outro trabalho, os autores mostraram que a exposição das plantas a condições limitantes de água promove a síntese de ABA e expressão de genes dependentes de ABA, desencadeando o fechamento estomático e a diminuição da perda de água. Além disso, tem-se observado que outras classes de hormônios podem apresentar efeito antagônico ao provocado pelo ABA (YAMAGUCHI-SHINOZAKI e SHINOZAKI, 2006).

Plantas de arroz transformadas expressando o gene da isopenteniltransferase (IPT), que participa de uma etapa limitante na síntese de citocininas sob controle de um promotor induzido por estresse e senescência ( $P_{SARK}$ ), mostraram melhora na produtividade e qualidade do grão sob estresse hídrico (PELEG et al., 2011). Além disso, REGUERA et al. (2013), submetem essas plantas ao estresse hídrico deixando de irrigar na pré-antese e retornando a irrigação quando as plantas mostravam sinais de enrolamento foliar. Três dias após a suspensão da irrigação foi observado maior atividade da sacarose fosfato sintase (SFS), nitrato redutase (NR) e nitrito redutase (NiR) nas plantas de arroz transformadas expressando o gene da IPT. A maior atividade dessas enzimas contribuiu para a melhor regulação do metabolismo de C e N suprindo a demanda dos órgãos drenos sob estresse.

Foi identificado um fator de transcrição nomeado HYR (HIGHER YIELD RICE) altamente associado ao metabolismo primário de C. A superexpressão desse gene aumentou a fotossíntese e determinou alterações morfo-fisiológicas que contribuíram para o aumento de produção em condição normal, seca e alta temperatura. Este fator de transcrição foi considerado um regulador mestre envolvido na ativação de genes da fotossíntese, cascata de fatores de transcrição e genes que contribuem para a estabilidade da produção como crescimento e desenvolvimento radicular que, possivelmente, aumentaram a absorção de N pela planta (AMBAVARAM et al., 2014).

## 2.5 O Estresse Hídrico e a Expressão de Aquaporinas

As aquaporinas são canais proteicos capazes de transportar água, pequenas substâncias apolares ou outras moléculas e íons através da membrana (BIENERT e CHAUMONT, 2010). Em arroz, o fluxo radial de água realizado entre as camadas de células da raiz envolve a passagem pela epiderme, exoderme, córtex e endoderme. Sabe-se que este fluxo apresenta forte resistência hidráulica devido a deposição de suberina na endoderme. Alguns trabalhos mostram que a maior atividade de aquaporinas na raiz pode beneficiar a planta em condições de estresse hídrico, uma vez que estas proteínas facilitam o fluxo de água pelas regiões mais suberizadas.

O aumento de expressão de uma aquaporina, conhecida como RWC3, em plantas de arroz da cultivar Zhonghua 11, melhorou o status hídrico das plantas sob déficit hídrico, sugerindo que esta proteína desempenhou um papel no escape da seca em arroz, principalmente, pelo fato de ser mais expressa nas raízes beneficiando o fluxo radial de água (LIAN et al., 2004). De maneira mais simplista, foi observado que o estímulo ao crescimento radicular provocado pelo fornecimento de  $NH_4^+$  as plantas, ao invés de  $NO_3^-$ , aumenta a expressão de diversos membros da família PIP de aquaporinas (proteínas integrais da plasmalema) que podem contribuir para o aumento da tolerância ao estresse hídrico (DING et al., 2015).

Trabalho realizado por NADA e ABOGADALLAH (2014), estudando quatro genótipos de arroz, sendo duas cultivares japônicas (Giza 178 e Sakha 101) e duas cultivares indicas (IR 64 e PSL2) observaram que a maior expressão das aquaporinas nas folhas e a redução da expressão de *OsPIP2.1*; *OsPIP2.2* e *OsPIP2.4* em raízes foi responsável pela baixa absorção e transporte de água para a parte aérea quando a irrigação foi interrompida por três dias. Além disso, este trabalho mostra que a remoção das pontas das raízes melhorou o status hídrico da planta, devido à remoção de barreiras para o fluxo radial de água.

Também já foi observado que o aumento de expressão da aquaporina *TaAQP7* aumentou a tolerância ao estresse hídrico em plantas de tabaco pela manutenção de um melhor status hídrico, reduzindo o acúmulo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e dano a membrana via aumento da atividade e expressão da superóxido dismutase (SOD) e catalase

(CAT), quando comparado a WT. A maior atividade dessas enzimas foi consequência do menor dano causado a membrana celular que teve a sua maquinaria protegida da desidratação (ZHOU et al., 2012). Trabalho realizado por GRONDIN et al. (2016), mostraram que a atividade de aquaporinas é fundamental para a manutenção da condutividade hidráulica das raízes e exsudação da seiva em variedades de arroz submetidas a seca.

O resultado encontrado por esses autores é de fundamental importância, pois ressalta que a expressão diferenciada de alguns grupos de aquaporinas pode influenciar no *status* hídrico da planta afetando a condutância estomática, fotossíntese, dano a membrana e atividade de enzimas antioxidantes quando submetidas ao déficit hídrico. Dessa forma, a atuação das aquaporinas na planta pode ser utilizada como um biomarcador de genótipos tolerantes ao estresse hídrico. Por outro lado, o aumento de expressão de aquaporinas em condição de estresse hídrico nem sempre é responsável por uma resposta adaptativa da planta, uma vez que muitos fatores podem influenciar na atividade dessas proteínas, como o nutriente cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ), pH (GERBEAU et al. 2002), fosforilação de sítios de ativação da proteína (JOHANSSON et al. 1998) e fitohormônios (ZHOU et al., 2012).

## 2.6 O Sistema Radicular em Ambientes Sujeitos ao Estresse Hídrico

O reconhecimento da importância das raízes e a diversidade na arquitetura radicular do arroz tem sido base sólida para a pesquisa de tolerância à seca por diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo (HENRY, 2013). O tamanho e a arquitetura do sistema radicular determinam a habilidade das plantas para adquirir água e nutrientes, fatores limitantes para o seu crescimento e rendimento em muitos ecossistemas agrícolas (PRICE et al., 1997).

Um sistema radicular profundo permite o escape das plantas em condições de estresse hídrico por meio da absorção de água das camadas mais profundas do solo (YOSHIDA e HASEGAWA, 1982). Estudo realizado por UGA et al. (2013), identificaram um loci para característica quantitativa (QTL) envolvido no ângulo de crescimento e comprimento em profundidade das raízes de arroz. A alta expressão deste gene, conhecido como Deeper Rooting (DRO1), é negativamente regulado por auxina e está envolvido no alongamento celular das pontas das raízes causando o crescimento assimétrico e dobragem para baixo das raízes em resposta à gravidade, aumentando o ângulo de crescimento e, conseqüentemente o aprofundamento do sistema radicular.

Plantas de arroz com maior expressão do DRO1 mostraram maior capacidade de escape da seca quando comparado com a IR64 (variedade sensível). Sob seca severa, danos fisiológicos como murchamento das folhas e atraso no florescimento foram mais proeminentes na IR64 do que em plantas Dro1-NIL. A seca moderada reduziu o peso de grãos por planta na IR64, enquanto plantas Dro1-NIL praticamente mantiveram o mesmo peso. Sob seca severa, a porcentagem de grãos cheios na IR64 praticamente zerou, enquanto em plantas Dro1-NIL foi observado um valor 30% maior.

WERNER et al. (2010), mostraram que a redução específica de citocinina em raízes de tabaco por meio do aumento de expressão de uma citocinina oxidase (CKX) promove incremento no alongamento de raízes primárias, número de ramificações e peso de raízes, sem alterar o crescimento normal das plantas. Estes autores verificaram também que plantas de *Arabidopsis* contendo essa construção gênica, que permite a expressão da citocinina oxidase exclusivamente na raiz, possuem maior taxa de sobrevivência do que plantas WT quando submetidas a estresse severo por seca.

Trabalho realizado no Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas da UFRRJ mostrou que o aumento de expressão do gene *OsCKX5* (Citocinina oxidase 5) em arroz resulta em sistema radicular com maior comprimento, área, volume e ápices radiculares quando

comparado à planta WT. Quando essas linhagens transformadas foram cultivadas em terra de um Planossolo háplico na casa de vegetação e posteriormente, submetidas ao estresse hídrico, foi possível observar um maior acúmulo de nutrientes nas raízes por essas linhagens (NASCIMENTO, 2014).

O crescimento de raízes em profundidade pode atuar como uma alternativa de linha de defesa contra o estresse hídrico para algumas variedades de arroz. Trabalho realizado por JI et al. (2012), mostraram que a variedade de arroz IRAT 109, tolerante ao estresse hídrico, quando submetida a condição de déficit hídrico por 20 dias apresentou maior comprimento radicular e massa seca de raízes em profundidade quando comparado a variedade Zhenshan 97B, sensível ao estresse hídrico.

Estes resultados ressaltam a importância de desenvolver plantas com raízes mais finas e em profundidade, visto que um maior sistema radicular pode aumentar a capacidade de absorção de água e reduzir as perdas de produtividade em ambientes sujeitos ao déficit hídrico. No entanto, o estudo do crescimento e desenvolvimento radicular foi ignorado durante muito tempo e só nas últimas décadas tem se dado a devida importância a esse órgão que pode influenciar diretamente na produtividade das plantas (HERDER et al., 2010).

Atualmente, diversos trabalhos têm buscado caracterizar genes envolvidos no desenvolvimento do sistema radicular, relacionados a: formação de raízes adventícias, alongamento radicular, desenvolvimento de raízes laterais e pelos radiculares (WU e CHENG, 2014; BISCARINI et al., 2016). A arquitetura do sistema radicular desempenha papel fundamental na adaptação do arroz a ambientes sujeitos ao estresse hídrico. A introdução de genes relacionados as características radiculares mencionadas tem demonstrado potencial para aumentar a produtividade do arroz em ambientes com limitada disponibilidade de água (AHMADI et al., 2014).

## **2.7 Acúmulo de Moléculas Orgânicas em Condição de Estresse Hídrico**

Algumas plantas apresentam a capacidade de acumular moléculas orgânicas e inorgânicas, tais como: prolina, glicina-betaína, trealose e sais. Estas moléculas contribuem para a redução da energia livre da água e, conseqüentemente, redução do potencial osmótico. Esse mecanismo é essencial para manter a turgescência celular em condições de estresse hídrico.

O arroz não é capaz de acumular glicina-betaína (GB), um importante composto envolvido na tolerância a estresses abióticos em espinafre, milho e cevada. No entanto, trabalho realizado por SHIRASAWA et al. (2006), mostraram que a transformação de plantas de arroz com um gene envolvido na síntese de GB de espinafre aumentou a massa seca das plantas transformadas em condição de estresse salino e por temperatura, no entanto não foi observado incremento em produtividade.

Plantas de arroz da cultivar Pathumthani (PT1), sensível ao estresse hídrico, foram cultivadas em casa de vegetação até o início da fase reprodutiva quando foram pré-tratadas com 0 e 100 mM de glicina-betaína por dois dias, via pulverização, e submetidas a diferentes regimes de déficit hídrico. Plantas pré-tratadas com GB mostraram maior altura da planta, comprimento de panícula, peso de panícula, porcentagem de fertilidade e peso de cem grãos quando comparado ao controle. A aplicação exógena de GB aumentou a concentração de prolina nas folhas, conteúdo de clorofilas totais, estabilizou carotenóides e manteve maior eficiência fotossintética das plantas quando submetida ao déficit hídrico (CHA-UM et al., 2013).

A prolina é um dos osmólitos mais comumente acumulados pelas plantas em resposta a diversos estresses, podendo desempenhar funções no ajustamento osmótico, estabilização da

estrutura celular e redução do dano ao aparato fotossintético. Plantas de arroz transformadas expressando o gene P5CS, envolvido na síntese de prolina, mostraram maior acúmulo de transcritos de mRNA de P5CS, conteúdo de prolina e maior tolerância a seca e estresse salino (SU e WU, 2004).

A trealose é um dissacarídeo não reduzido encontrado em muitos organismos e trata-se de um componente essencial nos mecanismos que coordenam o metabolismo vegetal, como o crescimento e desenvolvimento das plantas (PAUL et al., 2010). Em trabalho realizado por LI et al. (2011), foi observado que o aumento de expressão do gene que codifica para trealose-6-fosfato sintase (*OsTPSI*) em arroz, aumenta a tolerância das plantas ao estresse salino, frio, PEG e seca.

O papel e mecanismo de ação da prolina e trealose como osmoprotetores também pode ser estudado aplicando-os de forma exógena nas plantas, sem a necessidade de obtenção de plantas transformadas. Trabalho realizado por NOUNJAN et al. (2012), verificaram que plantas de arroz quando submetidas a diferentes concentrações de prolina e trealose em solução hidropônica por 6 dias apresentaram maior habilidade de se recuperar após o estresse devido ao papel osmoprotetivo exercido por essas substâncias e a sua capacidade de modular a atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX) e ascobarto peroxidase (APX).

## **2.8 A Regulação da Abertura e Fechamento Estomático na Eficiência de Uso de Água (EUA).**

A abertura dos estômatos, necessária para a entrada de CO<sub>2</sub>, é indispensável para o crescimento, desenvolvimento e produtividade das plantas, no entanto causa, simultaneamente, perda de água via transpiração. O tamanho do poro estomático, assim como a quantidade de estômatos (densidade) influenciam na transpiração, absorção de CO<sub>2</sub> e EUA, contudo sabe-se que o controle dessa característica é complexo e envolve fatores genéticos e ambientais.

Quando as plantas estão sob estresse hídrico ocorre uma redução do potencial hídrico das plantas que pode desencadear no fechamento estomático e, conseqüente, redução das trocas gasosas. A diminuição da assimilação de CO<sub>2</sub> em geral leva a uma redução de biomassa e produtividade em ambientes sujeitos a estresse hídrico. Métodos utilizados para induzir o fechamento estomático reduzem a abertura estomática aumentando a EUA, no entanto, esta redução tem resultado em perda de biomassa e ou produtividade (YOO et al., 2009).

Em *Arabidopsis* foi identificado um fator de transcrição (*GTL1*) que regula negativamente a EUA através do controle da densidade estomática. Neste trabalho, foi observado que plantas silenciando esse fator de transcrição apresentavam menor densidade de estômatos na parte abaxial da folha o que contribuiu para uma menor taxa de transpiração sem alteração de biomassa e assimilação de CO<sub>2</sub> contribuindo assim para uma maior EUA e tolerância a seca em condições de déficit hídrico (YOO et al., 2010).

Em arroz, também já foi identificado um fator de transcrição (DST) que apresenta resultados similares aos observados por YOO e colaboradores. Plantas de arroz silenciando o DST apresentaram menor abertura estomática e número de estômatos, o que permitiu menor perda de água, sem decréscimo na produção (HUANG et al., 2009). Quando as plantas foram submetidas a tratamento com PEG, NaCl e seca foi observado que as plantas mutantes apresentaram maior capacidade de recuperação quando transferida para condições normais de crescimento.

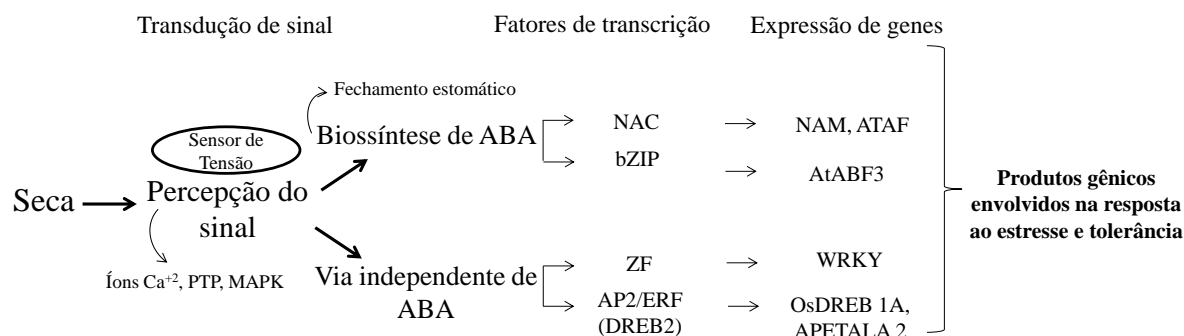
Trabalho realizado por YU et al. (2013), identificaram um fator de transcrição em *Arabidopsis*, denominado *Enhanced drought tolerance1/HOMEODOMAIN GLABROUS11* (*AtEDT1/HDG11*) que quando superexpresso em arroz, aumentou a tolerância a seca e produtividade das plantas transformadas, devido a redução na densidade estomática, maior EUA, maior taxa fotossintética, comprimento e massa de raízes quando essas plantas foram submetidas ao tratamento sem irrigação por 5 a 10 dias.

Trabalho realizado por KONDO et al. (2010), identificaram um peptídeo, denominado STOMAGEN que codifica para proteínas secretadas em *Arabidopsis* e regula positivamente a densidade de estômatos. Baseado na estrutura deste peptídeo, os pesquisadores desenvolveram uma molécula sintética que quando colocada em solução a planta reconhece e sinaliza para um aumento na densidade de estômatos, estratégia essa interessante para aumentar a captação de CO<sub>2</sub> e, conseqüentemente, a produtividade. No entanto, ainda são necessários estudos para verificar o efeito desse aumento de estômatos em condições de estresse abiótico, como a seca.

O aumento da expressão do STOMAGEN em *Arabidopsis* foi responsável pelo aumento da taxa fotossintética em aproximadamente 30% comparado a WT. No entanto essas plantas apresentavam maior taxa transpiratória, menor EUA e nenhuma alteração na biomassa produzida (TANAKA et al., 2013). Apesar de neste trabalho não ter sido mostrado um ganho de produtividade pelas plantas transformadas, abre-se uma janela de possibilidades para se trabalhar e aprimorar a densidade de estômatos ideal sem que haja perda de produtividade e decréscimo na EUA.

## 2.9 Fatores de Transcrição e Genes Envolvidos com a Tolerância ao Estresse Hídrico

A identificação dos fatores de transcrição (FTs) envolvidos com a seca permitiu a sua classificação em dois grupos: ABA dependentes e ABA independentes. Dentro da família de FTs dependentes de ABA estão incluídas duas famílias: (i) NAM, ATAF, CUC2 (ou simplesmente, NAC) e (ii) Zíper de leucina básico (bZIP). A classe bZIP de FTs possui elementos de ligação a proteína responsivos a ABA (AREB/ABF) envolvidos na sinalização do estresse hídrico. A outra família pertence aos FTs NAC que apresentam um domínio de ligação ao DNA altamente conservado. O grupo independente de ABA também possui duas famílias em seu grupo: (1) dedos de zinco (ZF) e (2) AP2/ERFs (Figura 1) (SHINOZAKI e SHINOZAKI, 2007).



**Figura 1.** Vias de regulação transcricional ABA dependente e independente e expressão gênica. Pelo menos quatro vias de transdução de sinais existem em resposta a seca em arroz (SHINOZAKI e SHINOZAKI, 2007 modificado).

Diversos trabalhos utilizando plantas modificadas geneticamente mostram fenótipos com aumento da tolerância sob condição de limitação hídrica (VINOCUR E ALTMAN, 2005; UMEZAWA et al., 2006). Grande parte desses resultados publicados baseiam-se na análise do transcriptoma da planta modelo *Arabidopsis*, e depois, estendidos para as culturas agrícolas de importância econômica, como o arroz (KARABA et al., 2007). Os FTs das famílias NAC, bZIP, ZF e AP2/ERF tem se mostrado como as principais ferramentas para aumentar a tolerância ao estresse hídrico nas culturas agrícolas (RABARA e RUSHTON, 2014).

Dentro da família NAC de FTs existem 140 membros em arroz e apenas um pequeno número destes já foram caracterizados. LIU et al. (2014), mostraram que a superexpressão do gene *SNAC1* de arroz produziu plantas de tabaco com crescimento mais vigoroso e maior tolerância ao tratamento com irrigação reduzida pela metade durante duas semanas e estresse salino (250mM de NaCl), devido a maior produção de raízes e menor taxa de transpiração nas plantas transformadas. Em outro estudo, os pesquisadores identificaram por meio da técnica de microarranjo, o fator de transcrição *OsNAC10*. Os autores observaram que a superexpressão específica deste gene em raízes de arroz aumentou a produtividade, expressão de diversos genes e o diâmetro das raízes sob condição de estresse hídrico sem afetar o desenvolvimento normal das plantas (JEONG et al., 2010).

Em arroz, há 92 membros de FTs da família bZIP divididos em 13 grupos (CORREA et al., 2008). Pouco destes membros foram caracterizados em *Arabidopsis* e arroz. Estudo realizado por LIU et al. (2014) identificaram por meio de microarranjos, que plantas da variedade Zhonghua 11 quando submetidas ao estresse hídrico apresentavam alta indução do gene *OsZIP71*. A superexpressão do *OsZIP71* aumentou a tolerância das plantas ao estresse hídrico e salino (150 mM NaCl por 8 dias), enquanto que o silenciamento deste gene tornou as plantas mais sensíveis a esses estresses. Estes resultados mostram que o *OsZIP71* apresenta um papel importante na via de sinalização mediada por ácido abscísico (ABA) promovendo uma maior tolerância ao estresse hídrico ou salino.

A família de FTs dedo de zinco (ZF) apresenta 67 genes em arroz e assim como nas outras famílias, poucos deles foram caracterizados. Plantas de arroz superexpressando o gene *OsTZF1* mostraram atraso na germinação, crescimento e senescência tardia das folhas, enquanto que plantas silenciando esse gene apresentaram rápida germinação, aumento no crescimento das plântulas e senescência prematura das folhas sob condição controle. Quando plântulas com duas semanas após a germinação foram submetidas ao tratamento de estresse hídrico ou salino (250 mM de NaCl por três dias) observou-se que a superexpressão deste gene aumentou a tolerância das plantas a esses tipos de estresses (JAN et al., 2013). Em outro trabalho, a superexpressão do *OsWRKY11* aumentou a tolerância ao estresse por seca e calor em plantas de arroz (WU et al., 2009).

Em arroz já foram identificados 139 genes da família ERF e muitos destes já se mostraram induzidos em resposta ao estresse hídrico (NAKANO et al., 2006). A superexpressão do fator de transcrição *TSRF1* em arroz aumentou a tolerância ao estresse hídrico e osmótico alterando a expressão de genes relacionados ao estresse e tornando as plantas mais sensíveis ao efeito do ABA (QUAN et al., 2010). Plantas superexpressando o *OsTSRF* mostrou maior taxa de sobrevivência, massa das plântulas e comprimento radicular quando submetidas ao estresse hídrico em relação a WT. Em *Arabidopsis* foi observado que a superexpressão do *OsDREB1A* induz a expressão de genes envolvidos com a tolerância a estresses abióticos (DUBOUZET et al., 2003).

Outras famílias de FTs como a bHLH (basic helix-loop-helix) também tem mostrado resultados interessantes para o aumento da tolerância ao estresse hídrico. LI et al. (2015) observaram que plantas com alta expressão do gene *qRT9*, membro da família bHLH, apresentavam raízes mais grossas e mais compridas que contribuíam para o mecanismo de escape da seca quando as plantas eram submetidas a condição de déficit hídrico.



Além dos FTs, diversas proteínas já foram identificadas que contribuem para o aumento da tolerância das plantas em ambientes sujeitos a estresses abióticos. *OsCOR413* (Cold regulated) é uma família gênica identificada em trigo com expressão associada ao aumento da tolerância ao frio. No entanto, já foi observado que ele também pode ser induzido por seca, salinidade e ABA (BRETON et al., 2003). Em arroz, a superexpressão do FT *OsZIP71* aumentou a expressão de uma série de genes incluindo um membro dessa família, o *OsCOR413-TM1*, que pode ter contribuído para o aumento da tolerância ao estresse hídrico por essas plantas (LIU et al., 2014).

A expressão do gene NCED (9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase) está associado a biossíntese de ABA, hormônio crítico para o desenvolvimento e controle da resposta da planta frente a estresses bióticos e abióticos (LEFEBVRE et al., 2006; TUTEJA et al., 2007). Além desse, uma ATPase transportadora de cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ -ATPase) é componente da via de sinalização induzida por  $\text{Ca}^{+2}$  envolvido na morte de células do córtex (apoptosis) e formação de aerênquimas (KNIGHT, 2000). A superexpressão dos FTs *OsNAC9* e *OsNAC10* em arroz alterou a expressão desses genes produzindo plantas com modificações na arquitetura radicular e aumento na tolerância ao estresse hídrico (JEONG et al., 2010; REDILLAS et al., 2012).

As ciclinas são uma família de proteínas que controlam o desenvolvimento da célula através do ciclo celular ao ativar ciclinas dependentes de quinase (CDKs). O estudo da regulação do ciclo celular é de fundamental importância, uma vez que está envolvido com o crescimento e desenvolvimento da planta em ambientes normais e sujeitos a estresses abióticos (DOERNER, 1994). Além disso, a divisão celular desempenha um papel primordial durante todas as fases de desenvolvimento da planta e regula a sua resposta em ambientes sujeitos a mudanças (INZÉ e VEYLLER, 2006).

CDKs são reguladores centrais do ciclo celular e sua atividade tem sido implicada em diversos processos celulares (KITSIOS E DOONAN, 2011). Estresses abióticos como aquecimento, seca e salinidade podem afetar a expressão desses genes. Em trigo, foi observado que a redução da divisão celular estava diretamente correlacionada com a inibição de uma ciclina dependente de quinase (CDKA1) (BURSSENS et al., 2000). Em Arabidopsis, o nocaute da ciclina *cyh1* regula a resposta de tolerância a seca nas plantas através da redução das taxas transpiratórias (ZHOU et al., 2013). CHEN et al. (2013), observaram que plantas mutantes para a expressão do *ORC3* (Origin recognition complex subunit 3) apresentaram a emergência das raízes laterais bloqueadas devido a perturbação da atividade de genes do ciclo celular em meristemas de raízes laterais recém-formadas no periciclo.

Diversos genes envolvidos no controle da tolerância ao estresse hídrico foram descobertos e caracterizados (UGA et al., 2013; SILVEIRA et al., 2015; SINGH et al., 2016). A procura desses genes e alelos é realizada em diversas partes do mundo utilizando-se variedades locais, selvagens e melhoradas das principais culturas agrícolas (BROZYNSKA et al., 2016). Acredita-se que variedades tradicionalmente cultivadas em ambientes sujeitos a estresses abióticos podem possuir genes e alelos “raros” que irão contribuir para a maior tolerância das plantas quando submetida a condições de estresse.

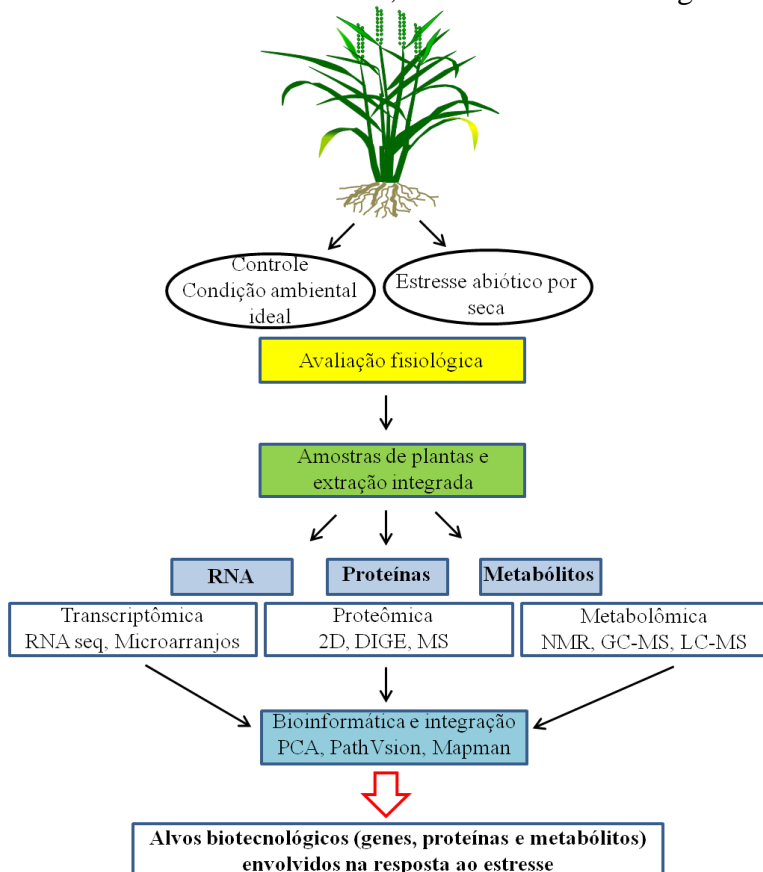
## 2.10 Estudo do Transcriptoma Vegetal Submetido ao Estresse Hídrico

O arroz, *Oryza sativa* L. ssp. *Japonica* foi a primeira espécie cultivada a ter seu genoma totalmente sequenciado e os genes anotados nos bancos de dados (IRGS, 2005). No entanto, apesar do sequenciamento ter sido finalizado há 11 anos a função e caracterização de grande parte dos genes ainda permanecem desconhecidas.

A busca por genes induzidos ou reprimidos durante o estresse e que possam contribuir para a melhoria do desempenho de plantas cultivadas, é objeto de desejo dos melhoristas atuais. No entanto, sabe-se que a tolerância a seca é uma característica quantitativa, ou seja, controlada por muitos genes com diferentes efeitos. Além disso, é provável que a seca possa causar alteração na expressão de genes não relacionados a tolerância ao déficit hídrico, tornando necessário o uso de variedades contrastantes para subtração de possíveis genes não envolvidos com a característica. A tolerância à seca também pode envolver uma interação entre os genes associados ao potencial produtivo e os genes de resistência ao estresse (PRICE et al., 2002).

Diversos estudos que visam entender a resposta das plantas ao estresse hídrico vêm sendo conduzidos (SWAMY e KUMAR, 2013; HU e XIONG, 2014). Os dados disponíveis mostram que as respostas das plantas a estresses abióticos são complexas envolvendo muitos genes que produzem respostas a nível bioquímico, fisiológico e molecular (BABU, 2010; BLUM, 2011). A identificação e caracterização dos genes associados com a resposta das plantas ao estresse hídrico são essenciais para o desenvolvimento de novas variedades com aumento de tolerância. Para tal fim, a utilização das tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) tem se tornado uma importante ferramenta, uma vez que possibilita a identificação rápida e precisa de genes-candidatos (BEGCY et al., 2012).

O advento da NGS possibilitou uma abordagem mais abrangente dos sistemas biológicos que antes eram vistos de forma mais fragmentada e independente (SWAMY e KUMAR, 2013). A análise global de transcriptômas, proteômas e metabolômas integrados a uma sólida plataforma de bioinformática tem possibilitado a melhor triagem de alvos biotecnológicos envolvido na tolerância a estresses, como mostrado na Figura 2.



**Figura 2.** Revisão esquemática de um sistema biológico para estudar a resposta ao estresse hídrico em plantas de arroz (DUQUE et al., 2013 modificado).

O DNA após ser transcrito pela RNA polimerase dá origem ao RNA, e o conjunto de RNAs expressos em determinado momento e local na planta é denominado de transcriptoma. Transcriptoma, também referido como perfil de expressão, é o conjunto de todos os transcritos de RNA, incluindo mRNA, pequenos RNAs, RNAs não codantes e RNAs antisense expressos em um tecido sob determinado contexto biológico específico (GOYA et al., 2012). A análise do transcriptoma pode ser realizada para identificar genes candidatos envolvidos na tolerância a estresses abióticos. Esta tecnologia permite incorporar alta especificidade, sensibilidade e medidas quantitativas na análise dos transcritos (MCGETTIGAN, 2013).

As principais tecnologias utilizadas para avaliar o transcriptoma diferencial são: a hibridização subtrativa supressiva, as técnicas de hibridização baseada em macro e microarranjos e métodos baseados em sequenciamento Sanger (YAMADA et al., 2003; DAVID et al., 2006; RABELLO et al., 2008). As técnicas de macro e microarranjos têm sido predominantemente usadas para análise de expressão de genes em plantas-modelo já bem estudadas e com banco de dados disponível. A grande desvantagem dessa técnica é que para a sua utilização é necessário conhecimento prévio do genoma, uma vez que as sondas dos chips de microarranjo são desenhadas baseadas em anotações nos bancos de dados, além da ocorrência de alto background em virtude da hibridização cruzada (OKONIEWSKI et al., 2006; ROYCE et al., 2007).

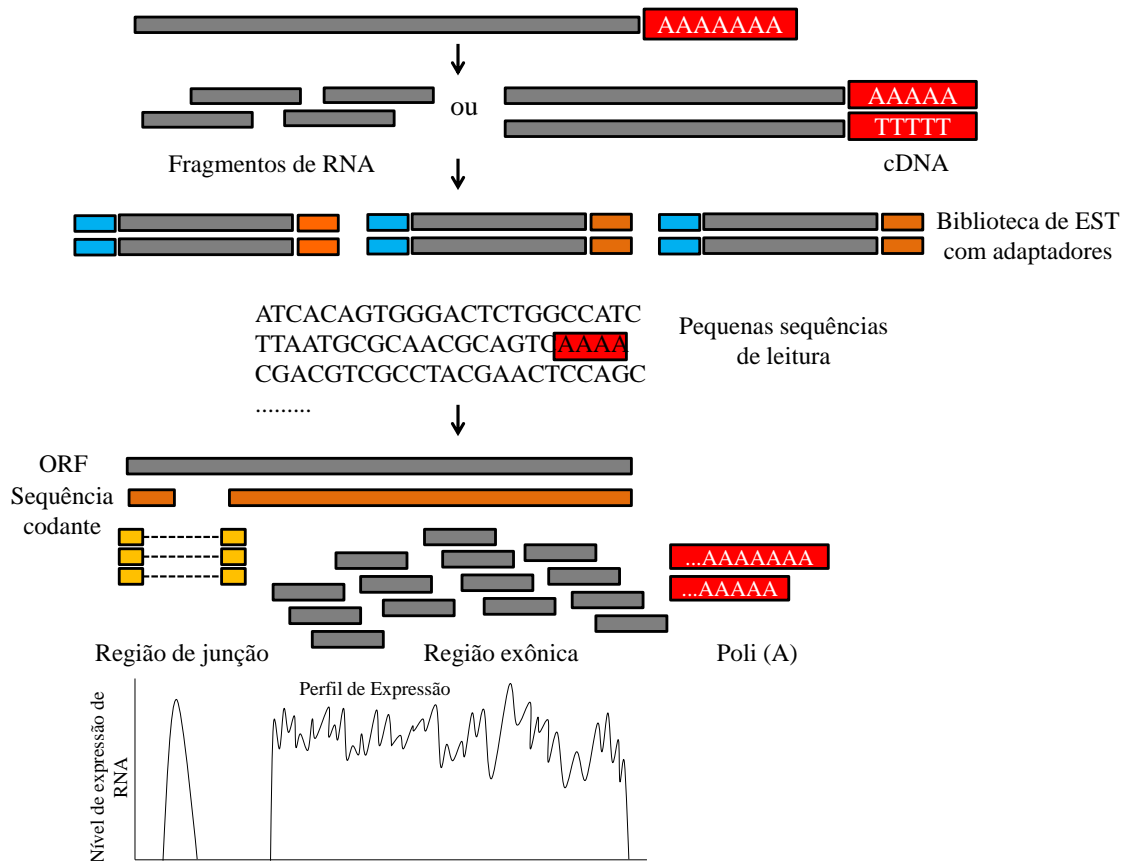
Com o advento da tecnologia de sequenciamento de nova geração presume-se que a utilização dessas metodologias irá reduzir, dado as vantagens dessa nova tecnologia (VERK et al., 2013). No entanto, os resultados obtidos até o momento mostram que a utilização da tecnologia de macro e microarranjo em arroz ainda têm possibilitado a identificação de diversos genes relacionados ao estresse hídrico.

## 2.11 O Sequenciamento do RNA

O advento dessa tecnologia está revolucionando o modo como transcriptomas complexos são analisados (MOROZOVA e MARRA, 2008). A utilização do sequenciamento de nova geração, como o sequenciamento de RNA (RNA-seq) permite a análise de transcriptomas em alta resolução com possibilidade de quantificar precisamente os níveis de transcritos, confirmar ou revisar sequências gênicas, mapear os limites entre éxon/íntron, entre outras possibilidades (NAGALAKSHMI et al., 2010).

O RNA-seq trouxe inovações pelo fato de ser facilmente passível de reprodução, fornecendo uma alta correlação sobre replicatas biológicas e técnicas e apresentar uma medida mais precisa de níveis de transcritos e suas isoformas, quando comparada a outros métodos (CLOONAN et al., 2008; VERK et al., 2013). A técnica de RNA-seq tem sido utilizada com sucesso em um grande número de organismos incluindo *Saccharomyces cerevisiae* (NAGALAKSHMI et al., 2008), *Caenorhabditis elegans* (LADEANA et al., 2009), *Homo sapiens* (MARIONI et al., 2008), *Arabidopsis thaliana* (LISTER et al., 2008) entre outros.

Para aplicação da técnica de RNA-seq, em geral tem-se uma população de RNA (RNA total ou fracionado, tais como poli A) sendo convertido a uma biblioteca de fragmentos de cDNA com adaptadores fixados em um ou ambos os lados. Cada molécula, com ou sem amplificação é então sequenciada para obter sequências curtas de uma extremidade (sequenciamento de uma extremidade) ou de ambas (sequenciamento pareado das extremidades) (Figura 3) (WANG et al., 2009).



**Figura 3.** Ensaio típico de RNA-seq, onde longos RNAs são primeiramente convertidos numa biblioteca de fragmentos de cDNA por meio da fragmentação do RNA ou cDNA. Adaptadores são adicionados a cada fragmento de cDNA e uma sequência curta é obtida de cada cDNA. Os fragmentos resultantes são alinhados com o genoma de referência ou transcriptoma, e classificados como três tipos: fragmento exônico, fragmento de junção e fragmento final incluindo a poli A. Esses três tipos são usados para gerar uma resolução de base para o perfil de expressão de cada gene, como ilustrado no final (WANG et al., 2009 modificado).

Diferentes plataformas podem ser utilizadas para aplicação da técnica de RNA-seq. De acordo com a plataforma de sequenciamento utilizada, os fragmentos sequenciados (*reads*) podem variar de tamanho, tipicamente entre 30-400pb. Entre as principais plataformas utilizadas tem-se: a Illumina (LISTER et al., 2008), a SOLiD da Applied Biosystems (CLOONAN et al., 2008) e a Roche 454 (BARBAZUK et al., 2007). Essas plataformas possuem como características comuns um poder de gerar informação muitas vezes maior que o sequenciamento de Sanger, com uma grande economia de tempo e baixo custo por base para o sequenciamento.

Cada plataforma apresenta peculiaridades quanto às etapas para obter os pequenos fragmentos. O sequenciamento Sanger é realizado por síntese usando DNA polimerase e nucleotídeos terminadores marcados com diferentes fluoróforos. A plataforma Solexa traz uma evolução que consiste na clonagem in vitro dos fragmentos em uma plataforma sólida de vidro, processo também conhecido como PCR de fase sólida (FEDURCO et al., 2006). A plataforma Illumina é baseada no sequenciamento por síntese e possui a vantagem de gerar milhões de reads com maior robustez, precisão e rapidez (MARDIS, 2008).

LU et al. (2010), realizaram a anotação funcional do transcriptoma de duas sub-espécies de arroz (japônica e indica) utilizando a tecnologia de RNA-seq. Esta técnica permitiu a identificação de 15.708 novas regiões transcricionais ativas até então desconhecidas e 48% dos genes mapeados apresentaram padrões de splicing, número este superior a estimativas antigas realizadas por outros métodos.

Há variadas aplicações da técnica de RNA-seq para estudar o transcriptoma do arroz em diferentes genótipos, condições ambientais e interações com outros organismos. OONO et al. (2013), avaliaram a diversidade do transcriptoma entre cultivares de arroz submetidas a deficiência de fósforo (P) e obtiveram, aproximadamente 5000 transcritos de cada cultivar responsivos a deficiência deste nutriente, sendo que de muitos desses ainda não se conhece a provável função.

SILVEIRA et al. (2015) analisaram o transcriptoma das folhas de duas variedades de arroz de sequeiro contrastantes quanto a tolerância ao estresse hídrico e identificaram diversos genes com potencial para serem utilizados em programas de melhoramento visando o aumento da tolerância ao estresse hídrico. SINGH et al. (2016), também estudaram o transcriptoma de duas variedades de arroz com arquitetura do sistema radicular contrastantes e através dessa técnica puderam identificar diversos genes relacionados ao desenvolvimento do sistema radicular e resposta a estresses abióticos que estão envolvidos com a maior tolerância a estresses por uma das variedades.

O perfil do transcriptoma de embriões em desenvolvimento de arroz foi analisado utilizando a plataforma Illumina. Os autores analisaram o desenvolvimento dos embriões em diferentes estádios de desenvolvimento (3, 5, 7 e 14 dias após a polinização) e observaram diferente padrão de expressão de genes para cada fase analisada. Além disso, muitas famílias de fatores de transcrição foram relacionadas a mais de um processo metabólico (XU e WANG, 2012). Estes resultados poderão prover bases para estudos futuros em desenvolvimento embrionário em arroz e outras culturas agrícolas de interesse econômico.

A tecnologia de RNA-seq trouxe inúmeras vantagens para a identificação e caracterização do transcriptoma em diferentes espécies de plantas em relação aos demais métodos até então utilizados. No entanto, essa tecnologia é recente e muitos laboratórios ainda não possuem a infraestrutura necessária para analisar os dados obtidos. Além disso, foi possível observar que há poucos estudos relacionando a técnica de RNA-seq a experimentos em arroz submetido ao estresse hídrico, assunto este que será abordado nesta tese.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Avaliação de Características Morfológicas, Componentes de Produtividade e Características Fisiológicas em Variedades de Arroz sob Controle e Estresse Hídrico

A terra (TFSA, terra fina seca ao ar) foi obtida dos primeiros 20 cm de um Planossolo Háplico localizado no setor de Horticultura da UFRRJ. A terra foi destorroada, peneirada em malha de 4,0 mm, secada ao ar em casa de vegetação e homogeneizada. Uma amostra foi retirada e encaminhada ao Laboratório de Análise Química e Fertilidade do Solo da UFRRJ. De acordo com o Manual de Adubação para o Estado do Rio de Janeiro e os resultados obtidos para análise química do solo (Tabela 1) não houve necessidade de calagem e adubação para suprir fósforo.

A adubação nitrogenada e a potássica foram parceladas em três aplicações: sendo 1/3 aplicado cinco dias após o transplântio, 1/3 aos 30 dias após o transplântio (máximo perfilhamento) e 1/3 no início do período reprodutivo (emissão da folha bandeira) conforme o tempo de sua ocorrência para cada variedade. As aplicações totalizaram a recomendação de 40 kg ha<sup>-1</sup> de N na forma de uréia e 60 kg ha<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>O como K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

**Tabela 1.** Análise química de terra do Planossolo Háplico utilizado para condução do experimento.

Areia	Silte	Argila	Na	Ca	Mg	K	H <sup>+</sup> Al	Al	V	pH	Corg	P	K
---- g.kg <sup>-1</sup> ----			----- cmol <sub>c</sub> .dm <sub>3</sub> <sup>-1</sup> -----						%	1:2,5	%	mg.L <sup>-1</sup>	
890	60	50	0,057	1,2	0,6	0,09	2,8	0,0	41	5,4	0,94	62	37

As variedades de arroz Prata Ligeiro, Quebra Cacho e Catetão foram fornecidas pela Embrapa Arroz e Feijão. Estas variedades têm sido reconhecidas como tolerantes ao déficit hídrico (RABELLO et al., 2008; TERRA, 2008; TERRA et al., 2010). As variedades Três meses, Manteiga, Palha Murcha, Piauí, Sempre Verde, Bico Ganga e Mira foram obtidas do banco de sementes do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas da UFRRJ e selecionadas baseado nos níveis de produtividade em sistema de sequeiro de acordo com o trabalho realizado por ARAÚJO (2013). Foram selecionadas as variedades mais produtivas, uma vez que é desejável que variedades tolerantes ao déficit hídrico apresentem níveis de produção elevados. A Tabela 2 apresenta as principais características das variedades com base nos descritores morfoagronômicos e fenológicos desenvolvidos para o arroz cultivado em sistema de sequeiro (FONSECA et al., 2004).

Sementes de arroz das variedades Prata Ligeiro, Três meses, Catetão, Manteiga, Palha Murcha, Quebra Cacho, Piauí, Sempre Verde, Bico Ganga e Mira foram inicialmente desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 2% durante 10 minutos e depois lavadas repetidas vezes em água destilada. Essas sementes foram acondicionadas sobre gaze em potes de 1,7 L e colocadas para germinar em água destilada em Câmara de Crescimento (500 μmol ftons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>; fotoperíodo 12h e 70% de umidade relativa). Aos 10 dias após a germinação (DAG) as plântulas foram transferidas para a casa de vegetação do Departamento de Solos e acondicionadas em tubos de PVC (20 cm de diâmetro x 1,0 m de altura) contendo terra oriunda dos vinte primeiros centímetros de um Planossolo Háplico.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 10 x 2 (variedades x tratamentos) com quatro repetições. A separação dos tratamentos

foi realizada no estágio reprodutivo quando mais da metade das plantas de cada variedade atingiram a antese. Os regimes hídricos utilizados foram: *controle*, onde o teor de umidade foi mantido próximo a capacidade de campo (20 kPa ou 0,02 MPa) e *estresse hídrico moderado*, que consistiu na manutenção do potencial matricial entre 50-60 kPa (0,05 – 0,06 MPa), de acordo com a literatura (LAFFITE et al., 2004; KUMAR et al., 2014A). O controle da tensão da água no solo foi realizado por tensiômetros instalados nas colunas a profundidade de 30 cm. A irrigação foi realizada diariamente aplicando-se uma baixa dose de água que permitisse a manutenção da tensão na faixa desejada no tratamento de estresse hídrico, enquanto que no tratamento controle o solo foi mantido saturado.

Durante a aplicação do estresse hídrico foi realizado o monitoramento do índice SPAD e antes da colheita foram coletadas folhas maduras (folha +2) para avaliação do teor relativo de água, extravasamento de eletrólitos, peroxidação de lipídeos e prolina. As plantas permaneceram no tratamento sob estresse hídrico por cerca de 30 dias e ao final do experimento foi realizada a coleta para avaliação das seguintes variáveis: tamanho da planta, massa fresca da parte aérea e raízes, comprimento radicular, número de perfilhos por planta, número de panículas por planta, peso de cem grãos, número de grãos cheios e chochos, peso seco da planta e produtividade.

**Tabela 2.** Características morfológicas das variedades de arroz de sequeiro utilizadas para condução dos experimentos.

<b>Variedades</b>	<b>Características</b>
Bico Ganga	Variedade local de arroz coletada no Estado do Maranhão; banco de germoplasma do LNMP - UFRRJ; subespécie japônica tropical; produtividade alta; peso de grãos intermediário; plantas altas; grão longo; ciclo precoce.
Catetão	Variedade local de arroz; orinda do banco de germoplasma da Embrapa arroz e feijão; subespécie japônica tropical; tolerante a seca; produtividade alta; peso de grãos muito alto; plantas médias; grão tipo longo; ciclo precoce.
Manteiga	Variedade local de arroz coletada no Estado do Maranhão; banco de germoplasma do LNMP - UFRRJ; subespécie japônica tropical; produtividade média; peso de grãos baixo; plantas médias; grão curto; ciclo precoce.
Mira	Variedade local de arroz coletada no Estado do Maranhão; banco de germoplasma do LNMP - UFRRJ; subespécie índica; produtividade média; peso de grãos intermediário; plantas altas; grão longo fino; ciclo médio.
Palha Murcha	Variedade local de arroz coletada no Estado do Maranhão; banco de germoplasma do LNMP - UFRRJ; subespécie japônica tropical; produtividade alta; peso de grãos alto; plantas médias; grão longo; ciclo médio.
Piauí	Variedade local de arroz coletada no Estado do Maranhão; banco de germoplasma do LNMP - UFRRJ; subespécie japônica tropical; forte desenvolvimento radicular; alta EUN; produtividade alta; peso de grãos muito alto; plantas altas; grão médio; ciclo precoce.
Prata Ligeiro	Variedade local de arroz; orinda do banco de germoplasma da Embrapa arroz e feijão; subespécie japônica tropical; tolerante a seca; elevada produtividade; plantas altas; grão tipo longo; produtividade alta; peso de

	grãos intermediário; plantas baixas; grão curto; ciclo precoce.
Quebra Cacho	Variedade local de arroz; orinda do banco de germoplasma da Embrapa arroz e feijão; subespécie japônica tropical; tolerante a seca; elevada produtividade; plantas altas; grão tipo longo; produtividade alta; peso de grãos alto; plantas médias; grão longo fino; ciclo médio.
Sempre Verde	Variedade local de arroz coletada no Estado do Maranhão; banco de germoplasma do LNMP - UFRRJ; subespécie índica; produtividade média; peso de grãos alto; plantas médias; grão longo fino; ciclo médio.
Três Meses	Variedade local de arroz coletada no Estado do Maranhão; banco de germoplasma do LNMP - UFRRJ; subespécie japônica tropical; produtividade média; peso de grãos intermediário; plantas baixas; grão médio; ciclo precoce.

### 3.1.1 Avaliação de características morfológicas, índice de colheita e determinação do índice de suscetibilidade ao estresse hídrico

O tamanho das plantas foi obtido com o auxílio de uma fita métrica e representou a média dos maiores perfilhos selecionados de cada planta. A medição tomada considerou a base do perfilho rente ao solo até o primeiro nó da panícula. Subsequentemente, as plantas foram cortadas e separadas em folha, panícula, caule e raízes. As raízes foram retiradas, cuidadosamente, da coluna de PVC e lavadas em água corrente até a retirada quase que completa da terra, sendo logo após ser obtido o comprimento total. As partes vegetais foram levadas para o laboratório onde foi obtida a massa fresca.

O material fresco foi acondicionado em sacos de papel e mantido em estufa com circulação forçada de ar a 60°C por três dias para a obtenção da massa seca. As panículas foram separadas em três partes (grãos cheios, grãos chochos e ráquis). Posteriormente, foram contados o número de grãos cheios (NGCHE), grãos chochos (NGCHO) e número de panículas por planta. O índice de colheita de grãos (IC) foi realizado a partir da razão entre a massa de grãos cheios pela massa seca da planta. A tolerância ao déficit hídrico foi estimada baseada no cálculo de nove diferentes índices de tolerância ao estresse hídrico (Tabela anexo 3). Para o cálculo de fertilidade das espiguetas foi utilizada a escala desenvolvida pelo IRRI de acordo com a Tabela 3.

**Tabela 3 .** Escala de fertilidade das espiguetas de arroz após estresse hídrico.

<b>Escala Fertilidade das espiguetas</b>	
1	Mais do que 80%
3	61-80%
5	41-60%
7	11-40%
9	Menor que 11%

(IRRI, 2002)

### 3.1.2 Determinação do teor de N-total no grão e proteína

Amostras de grãos provenientes de cada variedade foram descascados manualmente, pesados e submetidos à digestão sulfúrica para determinação do teor de N-total. O percentual de proteína bruta dos grãos foi obtido multiplicando-se o N-total (N-Kjeldahl) por 5,95 que constitui um fator de conversão baseado no percentual de N da glutelina, principal proteína de reserva do grão de arroz (JULIANO e BECHTEL, 1985).



### 3.1.3 Teor relativo de água

O teor relativo de água (TRA, %), um estimador da turgescência relativa (BARRS, 1968), foi determinado de acordo com a fórmula proposta por WEATHERLEY (1950). Para isso, folhas +2 foram coletadas de cada vaso e o peso fresco foi imediatamente obtido. Fragmentos dessas folhas foram imersos em água destilada e mantidas a 4°C no escuro por 24h sendo em seguida obtido o peso túrgido. O peso seco foi obtido após secagem a 60°C em estufa de circulação forçada de ar por três dias.

### 3.1.4 Estabilidade das membranas

A estabilidade das membranas foi testada pela técnica do extravasamento de eletrólitos, conforme a metodologia descrita por BAJJI et al. (2002). Discos foliares de folhas +2 (D = 10 mm) foram inicialmente lavados e imersos em 5,0 mL de água destilada em tubos falcon de 50 mL, sendo posteriormente transferidos para agitador a 100 rpm durante 30 minutos para obtenção da condutividade inicial. Em seguida, os tubos foram transferidos para água fervente por 30 minutos e após o resfriamento a condutividade final foi obtida. A medida de condutividade foi realizada utilizando um condutivímetro modelo DDS-IIA (Shanghai Leici Instrument Inc., Shanghai, China). O extravasamento de eletrólitos relativo foi obtido pela divisão entre a condutividade inicial e final multiplicado por 100.

### 3.1.5 Peroxidação de lipídeos

O método de determinação da peroxidação de lipídeos baseou-se no proposto por HEATH e PACKER (1968). Aproximadamente 0,2 g de folhas +2 foram macerados em almofariz com nitrogênio líquido, adicionado 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5% e o homogenato macerado por mais 2 min. O extrato foi centrifugado a 13.000 g durante 15 min a 4 °C e, posteriormente, 500 µL do sobrenadante foram adicionados a 2,0 mL da solução de TCA 20% e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) e aquecidos em banho-maria a 100 °C em tubos hermeticamente fechados, durante 1 h. A reação foi interrompida em banho de gelo e as leituras realizadas a 532 e 660 nm. O conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi estimado pelo uso do coeficiente de extinção molar de 155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, após a subtração da absorbância obtida a 660 nm daquela a 532 nm. Os dados de TBARS foram expressos em nmol TBA-MDA g<sup>-1</sup> MF.

### 3.1.6 Prolina livre

A determinação de prolina foi realizada pelo método clássico de BATES et al. (1973), baseada na maceração de 0,5 g de folhas +2 na presença de 10 ml de ácido sulfo-salicílico a 3 %. O homogenato foi centrifugado a 7.500 rpm por 10 min e posteriormente 2,0 mL foram coletados e adicionados a 2,0 mL de solução ácida de ninidrina (1,25g de ninidrina, 30 mL de ácido acético e 20 mL de ácido fosfórico 6,0 M) e 2,0 mL de ácido acético glacial em tubos falcon de 15 mL. As amostras foram incubadas a 100 °C por 1h e em seguida colocadas em gelo para paralisar a reação. À solução foram adicionados 4,0 mL de tolueno, seguido de agitação por 20 seg para a completa extração de prolina. O sobrenadante foi utilizado para leitura em espectrofotômetro a 520 nm e as absorvâncias comparadas a curva-padrão de prolina (0 a 100 µg mL<sup>-1</sup>). Os teores de prolina livre foram calculados com base na massa fresca, segundo a fórmula:  $[(\mu\text{g prolina/mL} \times \text{mL tolueno})/115,5 \mu\text{g}/\mu\text{mol}] / [(\text{g. amostra})/5] = \mu\text{mol de prolina/g massa fresca de raízes}$ .

### 3.1.7 Índice SPAD

O índice SPAD (Soil Plant Analysis Development) visou determinar a intensidade do processo de senescência nas variedades estudadas quando submetidas ao estresse hídrico. Desse modo, o perfilho mais desenvolvido de cada planta foi marcado e o terço médio da folha bandeira foi utilizado como padrão para as medições. Foram registradas 6 medições por folha bandeira nos intervalos de 1, 5, 10, 20 e 30 dias após a aplicação do estresse hídrico e controle. A média das medições foi constituída de 12 medições por pote.

### 3.1.8 Determinação de clorofila a, b e carotenóides

A análise de pigmentos foi realizada em, aproximadamente, 0,1 g de discos foliares (D = 10 mm) retirados da folha bandeira das plantas submetidas ao tratamento controle e estresse hídrico. Carotenóides totais e clorofilas foram determinados de acordo com ARNON (1949) em 10 mL de acetona 80%. As leituras foram realizadas em espectrofômetro nos comprimentos de onda de 663, 645 e 470 nm e as respectivas equações foram utilizadas para calcular a concentração de clorofila e carotenóides por grama de tecido foliar.

- $\text{Chl a (mg g}^{-1}\text{)} = [(12.7 \times A663) - (2.6 \times A645)] \times \text{ml acetona} / \text{mg tecido foliar}$
- $\text{Chl b (mg g}^{-1}\text{)} = [(22.9 \times A645) - (4.68 \times A663)] \times \text{ml acetona} / \text{mg tecido foliar}$
- $\text{C x+c} = 1000 A470 - 1.90\text{Chla} - 63.14 \text{Chlb}/214$ , (x = xantofilas e carotenóides)

### 3.2 Avaliação do Ângulo Radicular e Taxa de Raízes Profundas pelo Método das Peneiras em Quatro Variedades de Arroz Contrastantes Quanto a Tolerância ao Estresse Hídrico

As sementes de arroz das variedades Catetão, Piauí, Quebra Cacho e Mira foram desinfestadas como descrito anteriormente. Aos 10 DAG, as plantas foram transferidas para casa de vegetação do Departamento de Solos. Foram utilizados vasos de 12L contendo uma peneira preenchida de terra de um planossolo háplico. As peneiras foram previamente marcadas em relação aos ângulos de 0-30°; 30-60° e 60-90° (UGA, 2012). Cinco dias após o transplântio foi realizada uma adubação nitrogenada e potássica totalizando 20 kg ha<sup>-1</sup> de N na forma de uréia e 20 kg ha<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>O como K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 2 (variedades x tratamentos) com quatro repetições. Aos 30 dias após a germinação as plantas foram separadas em dois grupos: controle, onde o teor de umidade foi mantido próximo a capacidade de campo (20 kPa ou 0,02 MPa) e estresse hídrico, que consistiu na manutenção do potencial matricial em 50-60 kPa (0,05 – 0,06 MPa). O controle da tensão da água no solo foi realizado por tensiômetros instalados nos vasos a profundidade de aproximadamente 30 cm.

As plantas foram mantidas nesse tratamento por 14 dias e coletadas para determinação do número total de raízes nodais que atravessaram os ângulos na faixa de 0-30°; 30-60° e 60-90°. A taxa de raízes profundas (TRP) foi obtida pela razão do número total de raízes que cruzaram os ângulos na faixa de 60 - 90° pelo total de raízes que cruzaram todos os ângulos. Ao fim da coleta, as folhas, colmo e raízes foram separadas e secas em estufa com circulação forçada de ar a 60°C por três dias para a determinação da massa seca.

### 3.3 Avaliação de Parâmetros Radiculares em Quatro Variedades de Arroz Contrastantes Quanto a Tolerância ao Estresse Hídrico

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento no Departamento de Solos da UFRRJ. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições. As

plantas foram submetidas a um fotoperíodo de 12h/12h (luz/escuro) com aproximadamente  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de fótons fotossinteticamente ativo, umidade relativa do ar de 70% e temperatura de 28°C/26°C (dia/noite).

As sementes de arroz das variedades Catetão, Piauí, Quebra Cacho e Mira foram inicialmente desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (2%) durante 10 minutos e depois lavadas repetidas vezes em água destilada. Essas sementes foram acondicionadas sobre gaze em potes de 1,7 L e colocadas para germinar em água destilada na câmara de crescimento. Cinco dias após a germinação (DAG) as plantas foram transferidas para potes de 700 mL e conduzidas em sistema hidropônico com solução de HOAGLAND e ARNON (1950) modificada a ½ FI com 2,0 mM de N (1,5 mM  $\text{NO}_3^-$  e 0,5 mM  $\text{NH}_4^+$ ). Trocas de solução nutritiva foram realizadas a cada três dias e o pH foi mantido a 5,7. Aos 10 DAG as plantas foram separadas em dois grupos: controle e estresse hídrico, promovido pela adição de 20% de polietilenoglicol 6000 (PEG 6000), aproximadamente - 0,82 MPa de pressão osmótica (LI et al., 2011). As plantas foram mantidas nessa condição por 14 dias. Aos 24 DAG as plantas foram coletadas, separadas em raiz e parte aérea e armazenadas em etanol 50% para posterior análise dos parâmetros radiculares.

### **3.3.1 Parâmetros radiculares utilizando o programa Rootgraph**

As raízes foram espalhadas em cuba contendo água destilada e escaneadas utilizando o scanner Epson modelo Expression 11000XL (Long beach, CA) a 600 dpi. As imagens obtidas foram utilizadas para determinação das características morfológicas (volume, área superficial, comprimento, espessura e número de pontas de raízes nodais e laterais) por meio do programa Rootgraph (CAI et al., 2015). Após, o material foi seco em estufa com circulação forçada de ar a 60°C por três dias e a massa seca da parte aérea e raiz foram obtidas.

### **3.4 Avaliação de Parâmetros Radiculares e Anatômicos em Duas Variedades de Arroz Contrastantes quanto a Tolerância ao Estresse Hídrico**

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento do Departamento de Sistemas biológicos de Plantas (PSB – VIB). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dezoito repetições. As plantas foram submetidas a um fotoperíodo de 12h/12h (luz/escuro) com aproximadamente  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de fótons fotossinteticamente ativo, umidade relativa do ar de 70% e temperatura de 28°C/26°C (dia/noite). Foram utilizadas duas variedades previamente selecionadas dos experimentos anteriores como as mais contrastantes ao estresse hídrico, Catetão e Mira. As sementes foram desinfestadas e colocadas para germinar como descrito no experimento II.

Cinco dias após a germinação (DAG) as plântulas foram transferidas para uma caixa adaptada para cultivo hidropônico com capacidade de 72 plantas e 9 L de solução de Hoagland (HOAGLAND e ARNON, 1950) modificada a ¼ FI com 2,0 mM de N (1,5 mM  $\text{NO}_3^-$  e 0,5 mM  $\text{NH}_4^+$ ). Aos 10 DAG as plantas receberam solução nutritiva de HOAGLAND e ARNON (1950) modificada a ½ FI com 2,0 mM de N (1,5 mM  $\text{NO}_3^-$  e 0,5 mM  $\text{NH}_4^+$ ) acrescida de 20% de PEG-6000 ou controle (sem adição de PEG). Trocas de solução foram realizadas a cada três dias. As plantas foram mantidas nessa condição por 7 dias. Aos 14 DAG, as plantas foram separadas em raiz e parte aérea. As raízes foram armazenadas em etanol 50% para posterior análise de parâmetros morfológicos e anatômicos, enquanto a parte aérea foi armazenada em sacos de papel e secas em estufa com circulação forçada de ar a 60°C por três dias.

### **3.4.1 Parâmetros radiculares e anatômicos utilizando os programas Rootgraph e PHIV root cell**

As raízes foram escaneadas como descrito anteriormente. As imagens obtidas foram utilizadas para determinação das características morfológicas (Volume, área superficial, comprimento, espessura e número de pontas) por meio do programa RootGraph (CAI et al., 2015). Para a determinação de parâmetros anatômicos foram utilizadas três raízes nodais com laterais de cada planta e 4 repetições, totalizando 12 repetições de cortes anatômicos por tratamento. Fragmentos de raízes retirados de 5,0 mm a partir das pontas das raízes e do terço médio foram inseridos em agarose 6% e cortes transversais foram realizados em vibratome Leica - VT 1200S (Leica, Germany) utilizando velocidade entre 30–50 e frequência de 70. Para acessar as seções transversais usando a autofluorescência das paredes celulares, os cortes obtidos foram visualizados no microscópio Axiovert 135M (Zeiss, Germany) equipado com filtro de cubo (faixa de excitação: UV; filtro de excitação: BP 340–380). As imagens obtidas foram capturadas utilizando câmera modelo AxioCam (Zeiss, Germany) na lente de aumento de 20x.

Posteriormente, as imagens foram submetidas a análise no programa PHIV Root cell (LARTAUD et al., 2014) e Image J (SCHNEIDER et al., 2012) obtendo-se os parâmetros anatômicos de área radicular, área do córtex, área do estelo, número de camadas do córtex, número de células da endoderme, número de células do córtex na primeira camada, número de células da exoderme e número de células da epiderme. Após as determinações, as raízes foram secas, como descrito anteriormente, e a massa seca da parte aérea e raiz foram obtidas.

### **3.5 Expressão de Genes em Duas Variedades de Arroz Contrastantes Quanto a Tolerância ao Estresse Hídrico**

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento do Departamento de Sistemas biológicos de Plantas (PSB – VIB) no mesmo modelo do experimento IV. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 6 repetições utilizando as variedades Catetão e Mira. Aos 10 DAG as plantas receberam solução nutritiva de HOAGLAND e ARNON (1950) modificada a ½ FI com 2,0 mM de N (1,5 mM  $\text{NO}_3^-$  e 0,5 mM  $\text{NH}_4^+$ ) acrescida de 20% de PEG-6000 ou controle (sem adição de PEG). Foram realizadas coletas às 0, 2, 6, 12, 24 e 48h após a imposição do estresse hídrico por PEG a fim de avaliar a regulação de genes relacionados a tolerância ao estresse hídrico nas duas variedades ao longo do tempo. As raízes foram coletadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer - 80°C para posterior extração de RNA.

#### **3.5.1 Extração de RNA total**

Amostras de raízes foram inseridas em tubos eppendorff de 2,0 mL e em cada tubo foram adicionadas duas esferas metálicas de 3 mm de diâmetro. As amostras foram trituradas utilizando um agitador modelo Retsch MM300 (Alemanha) por 1 min. a frequência de 20 Hz. A operação foi repetida a fim de permitir uma melhor trituração das amostras. O RNA total foi extraído adicionando-se 1,0 mL de Trizol as amostras trituradas. As amostras foram incubadas durante 5 min a temperatura ambiente e 200 µL de clorofórmio foram adicionados. A mistura foi homogeneizada em vórtex, incubada a temperatura ambiente por mais 3 min e centrifugadas a 12.000 x g por 15 min a 4°C. Após a centrifugação, foram adicionados 5 µL de glicogênio em tubos eppendorff novos de 1,5 mL e a fase aquosa, obtida após a centrifugação, foi transferida para esses novos tubos. O RNA foi precipitado adicionando-se 500 µL de isopropanol, os tubos foram agitados por inversão e incubados a temperatura ambiente por 10 min. Logo após, os tubos foram centrifugados a 12.000 x g por 10 min a 4°C,

o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 1,0 mL de etanol 75%. Esta operação foi realizada duas vezes a fim de permitir uma melhor retirada dos sais remanescentes. As amostras foram novamente centrifugadas a 7.500 x g por 5 min a 4°C, o etanol descartado e o pellet seco durante 25 min a temperatura ambiente. O pellet foi ressuspensão em 40 µL de água DEPC e mantido a 4°C. O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop 2000c e após a quantificação foram corridas amostras de cada extração em gel de agarose (1%) com Gel Red, para verificar a integridade do RNA.

### 3.5.2 Tratamento com DNase, limpeza do RNA e síntese do cDNA

As amostras de RNA foram tratadas com DNase utilizando-se o kit Roche DNase kit seguindo as instruções do fabricante. Aos 40 µL de RNA suspensos foram adicionados 5 µL de tampão da enzima, 1 µL de DNase e 4 µL água. As amostras foram agitadas e incubadas por 15-20 min a 37°C. Logo após, foi realizada a inativação da DNase a 75°C por 10 min. Para a limpeza das amostras foi utilizado o kit RNeasy Plant Mini Kit (QUIAGEN) conforme recomendações do fabricante. Para isso, o volume final das amostras foi ajustado para 100 µL com água DEPC e logo após adicionados 350 µL de tampão RLT e 250 µL de etanol 100%. A mistura foi agitada por pipetagem e os 700 µL de solução transferidos para a coluna. Os tubos foram centrifugados a 8.000 x g por 15 seg e a solução descartada do tubo coletor. A coluna foi adicionada 500 µL de tampão RPE e novamente centrifugado a 8.000 x g por 15 seg. A solução foi descartada e novamente foram adicionados 500 µL de tampão RPE e centrifugados a 8.000 x g por 2 min. As colunas foram transferidas para novos tubos eppendorff de 1,5 mL e o RNA foi diluído em 40 µL de água DEPC.

A reação de síntese do cDNA foi realizada utilizando o kit iScript cDNA synthesis (*Life Technologies*) seguindo as instruções do fabricante. Para isso, foi utilizado 1 µg de RNA em 15 µL de água DEPC. Foram adicionados nas amostras 5 µL da mistura contendo 4 µL de tampão 5 x da enzima e 1 µL da enzima iScript perfazendo um total de 20 µL. As amostras foram submetidas ao seguinte programa: 5 min a 25°C, 30 min a 42°C e 5 min a 85°C. Após, as amostras foram diluídas 8 vezes e estocadas em freezer - 80°C para posterior análise.

### 3.5.3 PCR em tempo real

As reações foram realizadas no aparelho Light Cycler 480 (*Roche*) utilizando o “*kit Power SYBR® Green PCR Master Mix*” (*Roche*) seguindo as recomendações do fabricante. Todas as reações foram feitas em triplicata. A reação foi montada em placas de PCR de 384 poços utilizando o robô Janus (PerkinElmer) da seguinte maneira: 2,5 µL do tampão “*Power SYBR Green PCR Master Mix*” (2X), 2 µL de uma solução de “*primers*” (0,5 µM) cada e 0,5 µL do cDNA diluído, com volume final de 5 µL. A placa foi selada com filme óptico apropriado e centrifugada por 2 min a 3.000 x g a 25°C. Cada reação foi realizada da seguinte maneira: dez minutos a 95°C, quarenta e cinco ciclos de amplificação com 95°C por 10 seg., 60°C por 15 seg. e 72°C por 15 seg. Uma curva de dissociação (“*melting*”) foi adicionada à programação para identificar possíveis amplificações inespecíficas. Os cálculos de expressão foram feitos de acordo com LIVAK e SCHMITTGEN (2001) usando o tratamento sem adição de PEG 6000 como controle, a partir dos valores de CT (Cycle Threshold, ciclo limite) obtidos na reação.

### 3.5.4 Seleção de genes de referência

Os genes de referência utilizados no experimento V foram selecionados a partir de trabalhos publicados por JAIN et al. (2006) e BEVITORI et al. (2014). Amostras coletadas para as variedades Catetão e Mira nos tempos de 0, 2, 6, 12, 24 e 48h após a aplicação do

estresse hídrico foram analisadas utilizando os genes de referência *18SRNA*, *OsActin*, *OsGAPDH*, *OsUBC*, *OsUBQ10* e *OsUBQ5* (Tabela 4).

**Tabela 4.** Sequência de primers utilizados para seleção de controles endógenos estáveis nos experimentos com estresse hídrico.

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
<i>18SRNA</i>	5'-CTACGTCCCTGCCCTTTGTACA-3'	5'-ACACTTCACCGGACCATTCAA-3'
<i>OsActin</i>	5'-GTCAGAATGGGATGATATGG-3'	5'-TCTCCTTGCTCATCCTGTCAG-3'
<i>eEF1-α</i>	5'-TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT-3'	5'-GACTTCCTTCACGATTTTCATCGTAA-3'
<i>OsGAPDH</i>	5'-GGGCTGCTAGCTTCAACATC-3'	5'-TTGATGTCAGCCTTGATCTG-3'
<i>OsUBC</i>	5'-CCGTTTGTAGAGCCATAATTGCA-3'	5'-AGGTTGCCTGAGTCACAGTTAAGTG-3'
<i>OsUBQ10</i>	5'-TGGTCAGTAATCAGCCAGTTTGG-3'	5'-GCACCACAAATACTTGACGAACAG-3'
<i>OsUBQ5</i>	5'-ACCACTTCGACCGCCACTACT-3'	5'-ACGCCTAAGCCTGCTGGTT

### 3.5.5 Iniciadores para os estudos de expressão gênica

Foram utilizados iniciadores desenhados para os genes das famílias de fatores de transcrição NAC, bZIP, ZF, AP2/ERF e MYB (*OsNAC10*, *OsZIP71*, *OsWRKY11*, *OsDREB1A*, *OsMYB4* e *OsqRT9*); Genes relacionados a tolerância ao estresse hídrico (*OsCOR413*; *OsDRO1*; *NCED* e *Ca<sup>+2</sup>-ATPase*) e genes relacionados ao ciclo celular (*OsCyCB1.1*, *OsCyCD4.1*, *OsCDKB1* e *OsORC3*) (Tabela 5).

A especificidade dos “primers” foi analisada por alinhamento das sequências nos bancos de dados (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e experimentalmente ao fim da reação de PCR durante a “*curva de melting*”. Todos os “primers” apresentaram especificidade para cada gene analisado.

**Tabela 5.** Sequências dos “primers” para os fatores de transcrição, genes relacionados a tolerância ao estresse hídrico e ciclo celular utilizados nas reações de PCR em tempo real.

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
<i>OsNAC10</i>	5'-CCCAGCCCCCTAATATACACAA-3'	5'-GATCTAGGCGTGACTCGAAGG-3'
<i>OsWRKY11</i>	5'-CTCCAAGAAACCGAACAAGC-3'	5'-GGCTGTTCTTGACTGCCTTC-3'
<i>OsMYB4</i>	5'-CTGATCAACGACGAGCAGTTAG-3'	5'-GATTCCATGACGCTCCTCATGAC-3'
<i>OsDREB1A</i>	5'-CGTCCCCTCTGGAGCTACT-3'	5'-GCATCGGAAGCCAGAAAAGAG-3'
<i>OsZIP71</i>	5'-TGTGTGCCCTAACTGACATCCTGA-3'	5'-AAGTCTATGGGTGGCTGGTTCCAT-3'
<i>COR413-TM1</i>	5'-AACCTTGCCATCATCTGCATCAC-3'	5'-CTCCTGCAATGCCACAATGAACA-3'
<i>Ca<sup>+2</sup> ATPase</i>	5'-GAGGAGGAGGAGGAGAAGAT-3'	5'-AAGAATGGCCTAAGCTACCG-3'
<i>NCED</i>	5'-GAGGTACGACTTCCATGGGC-3'	5'-TTGAGGTACGGCTTGGACAC-3'
<i>OsqRT9</i>	5'-TCCACTAAGCTCCGTGTGTC-3'	5'-AAGCATCGTGCCTCATCAGGT-3'
<i>OsDRO1</i>	5'-AGTCGCTTCGTTGCTCAAGT-3'	5'-AGCGTGAAGAATTTTGGCG-3'
<i>OsCyCB1.1</i>	5'-CTACTGCCCTGAGAGCAAG-3'	5'-GAATGTCAGACTCGCCTTCC-3'
<i>OsCyCD4.1</i>	5'-TGTGCTTTAGCGTTAGTTGC-3'	5'-ATCTGGAGTGTGCTAGTGCCTA-3'
<i>OsCDKB1</i>	5'-GCTAGGTAGGGCTTCACTG-3'	5'-CCAAAGAGTCACAATCTGCAA-3'
<i>OsORC3</i>	5'-CAGTGTGAGGATCACAAAGGATAAG-3'	5'-GAAAAGGTAAACTCAACAGAGACC-3'

### **3.6 Análise do Transcriptoma em Duas Variedades de Arroz Contrastantes Quanto a Tolerância ao Estresse Hídrico**

As etapas iniciais de desinfestação das sementes e condução do experimento foram realizadas como descrito anteriormente (experimento IV). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 6 repetições de plantas. Aos 10 DAG as plantas receberam solução nutritiva de HOAGLAND e ARNON (1950) modificada a ½ FI com 2,0 mM de N (1,5 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e 0,5 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) acrescida de 20% de PEG-6000 ou controle (sem adição de PEG). Trocas de solução foram realizadas a cada três dias. Coletas foram realizadas às 2h e 8h após a aplicação dos tratamentos. As raízes foram coletadas e armazenadas em freezer - 80°C para posterior análise.

#### **3.6.1 Extração de RNA e preparo das amostras para sequenciamento utilizando a plataforma Illumina NextSeq 500**

A extração de RNA das raízes de arroz foi realizada conforme descrito no tópico 3.5.1. A concentração do RNA e pureza foram determinados espectrofotometricamente utilizando o Nanodrop ND – 1000 (Nanodrop Technologies) e a integridade do RNA foi avaliada utilizando o Bioanalyser 2100 (Agilent). Para cada amostra foram utilizados 1 µg de RNA total para sequenciamento. Primeiramente, o mRNA foi enriquecido com oligo poli-A utilizando o kit Illumina TruSeq® e purificado do RNA total utilizando oligo poli-T aderido a esferas magnéticas. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando iniciadores aleatórios e a enzima SuperScript II, enquanto a segunda fita foi sintetizada utilizando a DNA polimerase I e RNase H. Os fragmentos de cDNA foram estendidos e adicionado um nucleotídeo de adenina (A) nas pontas 3'OH. Após, os fragmentos de cDNA foram ligados a diferentes “barcodes” para cada amostra. Finalmente a PCR foi realizada para enriquecer esses fragmentos que possuíam moléculas adaptadas em ambas as pontas (“paired end”) e amplificado a quantidade de cDNA necessário para a montagem da biblioteca. Para cada corrida, as bibliotecas foram agrupadas de forma equimolar e sequenciadas em duas corridas utilizando o kit NextSeq v2 75 ciclos no instrumento Illumina NextSeq 500.

#### **3.6.2 Montagem, anotação gênica e quantificação do nível de expressão**

O mapeamento das “reads” foi realizado utilizando o programa Galaxy (AFGAN et al., 2016). Os arquivos oriundos do sequenciamento de cada amostra foram carregados no programa e confirmados quanto a qualidade por meio da ferramenta FastQC (ANDREWS, 2010) e “trimados” utilizando a ferramenta Trimmomatic (BOLGER et al., 2014). Um segundo controle de qualidade foi realizado após a “trimagem” e as “reads” foram alinhadas com os genomas de referência de arroz, subespécie japônica e indica, utilizando a ferramenta GSNAP (WU e NACU, 2010) para a obtenção da anotação gênica. As “reads” mapeadas no genoma modelo foram contadas utilizando o programa HTSeq (ANDERS et al., 2014). O modelo intersection-strict de sobreposição das reads para contagem foi utilizado por apresentar maior precisão.

A análise de quantificação do nível de expressão foi realizada utilizando o pacote edgeR (ROBINSON et al, 2010) no programa R (R CORE TEAM, 2014). Apenas genes com valor de expressão maior que 0,2 cpm (correspondente a contagem de cinco reads) em pelo menos três amostras foram mantidos para análise. A normalização TMM (média de valores trimados) foi aplicada usando a função calcNormFactors (ROBINSON e OSHLACK, 2010). A variabilidade no conjunto de dados foi acessada com uma escala multidimensional (MD scaling). Parâmetros tendenciosos de dispersão binomial negativos foram estimados baseados

em uma anova tripla com todas as possíveis interações utilizando a função de estimativa da dispersão (`estimateDisp`) com retirada de genes dispersos.

Um modelo de regressão de verossimilhança negativa foi então utilizado para modelar as contagens dispersas para cada gene separadamente como implementado na função `glmQLFit` (LUND et al. 2012). A questão científica foi encontrar genes que possuem resposta diferencial entre as variedades sob estresse hídrico. Desse modo, contrastes foram estimados utilizando testes F de verossimilhança de Bayes para comparar o estresse hídrico versus o controle em ambas as variedades às 2 e 12h. Além disso, as diferenças entre tratamentos nas variedades foram comparadas às 2 e 12h. Valores de probabilidade foram corrigidos usando o método de taxa de falsa descoberta (FDR) descrito por BENJAMINI e HOCHBERG (1995). Todas as funções `EdgeR` foram aplicadas com valores padrão. Um gene foi considerado diferencialmente expresso quando o valor de FDR foi menor que 0,05.

### 3.7 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos a tratamento estatístico utilizando-se o programa SISVAR (FERREIRA, 2000). Foram realizados os testes de normalidade (Teste de Lilliefors) e de homogeneidade das variâncias (COCHRAN e BARTLETT) e, posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância e o nível de significância analisado através do teste F ( $p < 0,05$ ). Quando as variáveis foram significativas pelo teste F, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-knott e Tukey ( $p < 0,05$ ) (PIMENTEL-GOMES, 2000).

A análise estatística multivariada adotada foi de agrupamento e de ordenação. Para o método de agrupamento, dentre os vários métodos, foi utilizado à medida de dissimilaridade de mahalanobis ( $D^2$ ) obtidas a partir de variáveis quantitativas com repetição. Foi realizada inicialmente uma Análise de Variância Multivariada (MANOVA). Após esta análise que permite obter as estimativas das covariâncias residuais, gerou-se a matriz de dispersão para o cálculo da estimativa das distâncias generalizadas de Mahalanobis (CRUZ e CARNEIRO, 2003).

Após a verificação do grau de diferença entre genótipos, com intuito de reconhecer os grupos homogêneos, foi utilizado o método de agrupamento hierárquico, em que cada coordenada foi obtida a partir da medida de dissimilaridade. Dentre os métodos hierárquicos foram testados o método do vizinho mais próximo, do vizinho mais distante, UPGMA (Unweighted pair-group method using an arithmetic average) e método de Ward. Em seguida, foi realizado o teste de consistência do padrão de agrupamento por meio do coeficiente de correlação cofenético (CCC) (SOKAL e ROHLF, 1962), utilizou-se ainda o Teste de Mantel ( $r_M$ ) com 999 permutações. O ponto de corte no dendrograma foi estimado conforme KELLEY et al. (1996), dada a partir da matriz cofenética.

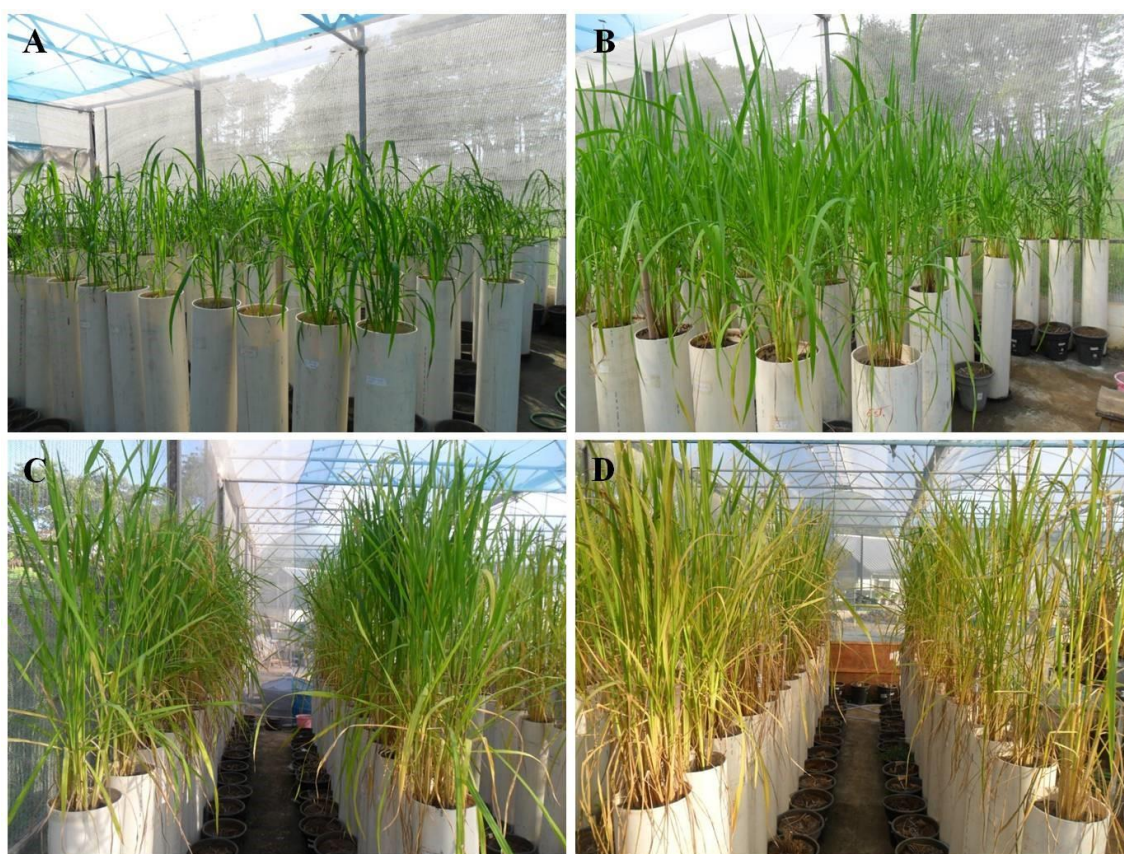
Os mesmos dados foram submetidos à análise de ordenação por meio de componentes principais. A consistência da plotagem dos tratamentos em um gráfico foi conforme a estimativa da variância acumulada nos primeiros componentes principais. Além das análises de agrupamento e dispersão também foram estimados coeficientes de correlação de Pearson entre todas as variáveis. Todas as análises estatísticas foram realizadas no Programa R, versão 2.14.1 (R CORE TEAM, 2014).



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Determinação das Características Morfológicas, Fisiológicas e Componentes de Produtividade em Variedades de Arroz de Sequeiro Submetidas ao Estresse Hídrico

O primeiro experimento teve como objetivo avaliar características morfológicas, fisiológicas e componentes de produtividade em dez variedades de arroz locais cultivadas em sistema de sequeiro sob dois regimes hídricos durante o período reprodutivo, o controle - plantas submetidas a uma umidade próxima a capacidade de campo (20 KPa) e, estresse - plantas submetidas a uma tensão de água no solo entre 50-60 KPa (Figura 4).



**Figura 4.** Variedades de arroz de sequeiro selecionadas para a avaliação das características morfológicas, componentes de produtividade e características fisiológicas sob estresse hídrico. Plantas de arroz aos 50 dias após a semeadura (A). Início da aplicação do estresse hídrico na antese (B). Variedades de arroz após 20 dias de estresse hídrico, controle (C) e estresse (D).

A princípio, foram analisadas características fenotípicas que são importantes meios de seleção de variedades superiores para ambientes sujeitos a estresses (RAMAN et al., 2012; USMAN et al., 2013). Os resultados mostram que sob estresse hídrico as variedades apresentaram marcante redução da massa de parte aérea e raízes (Tabela 6; Tabela anexo 1), no entanto é possível observar que entre as variedades estudadas existem variações nas taxas de redução, indicando que algumas dessas variedades apresentam mecanismos que as

permitem suportar o período de estresse com menor queda de biomassa e produção (grãos cheios).

**Tabela 6.** Massa seca (g vaso<sup>-1</sup>) de folha, colmo e raiz das variedades de arroz de sequeiro cultivadas em casa de vegetação sob condição controle e estresse hídrico.

Variedades	Folha		Colmo		Raiz		Raiz/PA	
	-----g vaso <sup>-1</sup> -----							
	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.
Bico Ganga	19,3aB	16,5bA	35,8aB	27,8bA	31,0bD	35,4aB	0,57bD	0,80aC
Catetão	15,2aC	12,6bB	32,1aC	21,2bB	45,6aB	41,6aA	0,94bB	1,23aA
Manteiga	14,9aC	12,7bB	33,7aB	21,2bB	50,9aB	32,5bB	1,06aB	0,87bC
Mira	21,7aA	17,3bA	47,5aA	27,6bA	55,7aB	44,7bA	0,80bC	1,00aB
Palha Murcha	20,9aA	16,3bA	36,6aB	18,6bB	69,7aA	26,3bC	1,21aA	0,77bC
Piauí	20,2aA	14,6bB	45,7aA	29,7bA	38,3aC	44,0aA	0,57bD	0,99aB
Prata Ligeiro	10,4aD	7,9bD	28,5aC	16,8bB	30,2aD	31,0aB	0,78bC	1,24aA
Quebra Cacho	18,1aB	15,5bA	33,9aB	31,4aA	52,6aB	34,7bB	1,01aB	0,74bC
Sempre Verde	16,3aC	14,2aB	43,4aA	28,7bA	31,0aD	33,4aB	0,52bD	0,78aC
Três Meses	9,5aD	8,2aC	31,3aC	19,8bB	22,8aE	22,9aC	0,51bD	0,81aC
C.V%	9,73		8,60		12,52		14,20	

<sup>a</sup> Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey entre linhas e Scott-Knott entre colunas a  $p \leq 0,05$  de significância. Cont. = Controle e Est. = Estresse.

A massa seca de folhas foi reduzida na maior parte das variedades quando submetidas ao estresse hídrico, apenas as variedades Sempre Verde e Três Meses mantiveram suas massas constantes em ambos os tratamentos. Em relação a massa de colmo, apenas a variedade Quebra Cacho não se alterou sob tratamento de estresse hídrico. As variedades Palha Murcha, Mira e Prata Ligeiro mostraram a maior redução de massa de colmo sob estresse (Tabela 6). Decréscimo na massa seca de parte aérea sob condição de baixa umidade do solo é consequência da redução da área foliar e taxa fotossintética (SINAKI et al., 2007; ZUBAER et al., 2007).

A massa de raízes se manteve estável nas variedades Catetão, Piauí, Prata Ligeiro, Sempre Verde e Três Meses. Além disso, foi possível observar um incremento significativo na variedade Bico Ganga no tratamento de estresse. A razão raiz/parte aérea indica que houve um incremento no crescimento do sistema radicular nas variedades Bico Ganga, Catetão, Mira, Piauí, Prata Ligeiro, Sempre Verde e Três Mêsas. A massa seca de raízes pode variar, consideravelmente, em resposta ao estresse, sendo que variedades tolerantes tendem não apresentar forte queda dessa variável. Por este motivo, a massa seca de raízes e o comprimento radicular têm sido usados como bons preditores da produtividade de arroz sob estresse hídrico (FAGERIA e MOREIRA, 2011; FENG et al., 2012).

A fim de verificar a distribuição do sistema radicular em profundidade, foram realizados o seccionamento e a determinação da massa nas profundidades de 0-30 cm e 30-130 cm (Tabela 7; Tabela anexo 2). A taxa de mudança foi obtida ao considerar o tratamento controle igual a 100% dentro de cada variedade (Tabela 7). As variedades Catetão, Manteiga, Mira, Palha Murcha e Quebra Cacho apresentaram marcante redução de massa de raízes no segmento de 0-30 cm quando submetidas ao tratamento de estresse hídrico, enquanto as variedades Bico Ganga, Piauí, Prata Ligeiro, Sempre Verde e Três meses não mostraram redução de massa significativa neste segmento.

Uma das estratégias desenvolvidas pelas plantas para evitar o estresse hídrico é aumentar a área de captação de nutrientes e água em profundidade quando submetidas a situações de déficit hídrico prolongado (HENRY, 2013). Esta estratégia foi observada pelas variedades Bico Ganga, Catetão, Piauí, Prata Ligeiro, Sempre Verde e Três meses. A variedade Piauí foi a que mostrou a maior taxa de mudança no segmento de 30-130 cm, aproximadamente 57% de incremento, seguido das variedades Prata Ligeiro (48%), Três Meses (48%), Bico Ganga (43%), Sempre Verde (35%) e Catetão (34%). De acordo com O'TOOLE; BLAND (1987), a maior emissão de raízes em profundidade é uma característica interessante em variedades que apresentam maior tolerância ao déficit hídrico. As variedades Palha murcha e Quebra Cacho foram as únicas que apresentaram taxa de mudança negativa para a massa de raízes nos dois segmentos analisados, o que indica uma maior sensibilidade ao estresse hídrico por essas variedades no que concerne ao crescimento do sistema radicular.

**Tabela 7.** Massa seca ( $\text{g vaso}^{-1}$ ) de raiz em duas profundidades (0 – 30 cm) e (30 – 130 cm) nas variedades de arroz de sequeiro cultivadas em casa de vegetação sob condição controle e estresse hídrico.

Variedades	Raiz (0 – 30)		Raiz (30 – 130)		T.M (0 - 30)	T.M (30 - 130)
	g vaso <sup>-1</sup>				%	
	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont./Est.	Cont./Est.
Bico Ganga	19,5aD	18,9aA	11,5bB	16,5aB	0	+ 43
Catetão	28,4aD	18,5bB	17,2bC	23,1aC	- 35	+ 34
Manteiga	36,8aB	19,7bA	14,1aB	12,8bC	- 46	0
Mira	33,5aB	21,8bA	22,2aA	22,8aA	- 35	0
Palha Murcha	47,4aA	13,9bB	22,4aA	12,4bC	- 71	- 44
Piauí	25,6aC	24,0aA	12,7bB	20,0aA	0	+ 57
Prata Ligeiro	23,6aC	21,2aB	6,6bC	9,8aC	0	+ 48
Quebra Cacho	32,6aB	18,6bA	20,1aA	16,1bB	- 43	- 19
Sempre Verde	19,5aD	17,9aA	11,5bB	15,5aB	0	+ 35
Três Meses	17,6aD	15,2aB	5,2bD	7,7aC	0	+ 48
C.V%	14,85		15,02			

<sup>a</sup> Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey entre linhas e Scott-Knott entre colunas a  $p \leq 0,05$  de significância. Cont. = Controle e Est. = Estresse, T.M = Taxa de Mudança.

O tamanho das plantas foi significativamente reduzido em parte das variedades, no entanto a Catetão, Manteiga, Piauí, Prata Ligeiro, Sempre Verde e Três Meses mantiveram estável essa variável. O número de perfilhos também foi estável para as variedades Bico Ganga, Palha Murcha, Piauí, Sempre Verde e Três Meses. O número de panículas permaceu estável apenas para a variedade Três Meses. A máxima profundidade radicular sofreu pouca alteração entre as variedades. Apenas as variedades Prata Ligeiro e Sempre Verde aumentaram a profundidade radicular quando submetidas ao estresse (Tabela 8), o que pode ter contribuído para o aumento de massa de raízes, principalmente no segmento de 30-130 cm (Tabela 7). O comprimento radicular, principalmente, em profundidade tem sido fortemente correlacionado com a extração de água como mostrado por KAMOSHITA et al. (2004).

A avaliação desta variável se tornou complexa pelo fato da maior parte das variedades desenvolveram um sistema radicular maior do que 100 cm o que dificultou a lavagem. Além disso, os últimos centímetros de raízes ficaram, parcialmente, enrolados no fundo do tubo de

PVC, principalmente no tratamento de estresse hídrico, o que dificultou a correta aferição do comprimento total neste tratamento.

**Tabela 8.** Tamanho, número de perfilhos, panículas e profundidade radicular das variedades de arroz de sequeiro cultivadas em casa de vegetação sob condição controle e estresse hídrico.

Variedades	Tamanho		Perfilho		Panícula		Comp. Radicular	
	cm		número		número		cm	
	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.
Bico Ganga	127,0aA	114,0bB	12,0aB	9,3aB	12,0aC	9,0aB	100,7bB	114,0aA
Catetão	106,7aC	100,7aC	14,7aB	10,7bB	13,7aC	9,3bB	106,0aB	113,3aA
Manteiga	106,3aC	103,3aC	14,3aB	10,3bB	11,0aC	8,7bB	109,3bA	119,3aA
Mira	123,0aA	98,0bC	14,7aB	10,7bB	12,3aC	9,3bB	105,0aB	100,7aB
Palha Murcha	117,3aB	93,0bD	13,3aB	10,7aB	12,3aC	10,7bB	121,3aA	109,3bB
Piauí	130,0aA	123,0aA	13,0aB	11,0aB	11,3aC	9,0bB	118,3aA	119,3aA
Prata Ligeiro	93,7aD	94,7aD	21,0aA	13,0bB	15,3aB	9,3bB	90,0bC	117,3aA
Quebra Cacho	117,7aB	99,7bC	22,3aA	15,7bA	18,7aA	13,0bA	118,0aA	116,0aA
Sempre Verde	102,3aC	106,3aC	15,3aB	15,3aA	11,0aC	9,7bB	100,0bB	110,0aB
Três Meses	87,7aD	89,7aD	15,0aB	16,7aA	11,7aC	10,3aB	113,0aA	117,7aA
C.V%	4,40		15,51		11,92		4,89	

<sup>a</sup> Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey entre linhas e Scott-Knott entre colunas a  $p \leq 0,05$  de significância. Cont = Controle e Est. = Estresse.

A produção foi reduzida em todas as variedades submetidas ao estresse hídrico (Tabela 9). A produção de grãos tem sido usada como a principal componente visando à seleção de plantas tolerantes ao estresse hídrico (JNANDABHIRAM et al., 2012). Variedades com maior tolerância mostraram menor redução do que outras que foram mais sensíveis. As variedades Catetão e Piauí apresentaram redução de apenas 26,4% e 27,9%, respectivamente, enquanto que as variedades Mira e Quebra Cacho apresentaram, respectivamente, redução de 62,9% e 63,2% quando submetidas ao estresse hídrico (Tabela 9).

A redução da produtividade é consequência da senescência precoce das folhas, perfilhos e menor taxa de crescimento sob condições de déficit hídrico. Variedades que apresentam maior estabilidade destas variáveis têm sido consideradas tolerantes ao estresse hídrico, como relatado nos trabalhos de JNANDABHIRAM et al. (2012); RAMAN et al. (2012) e TERRA et al. (2013). Em arroz, o estresse hídrico moderado tem sido amplamente caracterizado por uma redução de 31 a 64% na produção de grãos quando comparado a condição irrigada (KUMAR et al., 2008). Este resultado ressalta a estabilidade das variedades Catetão e Piauí que apresentaram redução abaixo desta faixa para um estresse hídrico moderado. Já as variedades Mira e Quebra Cacho tiveram uma redução compatível ao limite superior para estresse moderado, próximo a faixa de redução de produção de grãos para um estresse severo que varia entre 65 a 85%.

Ao analisar a massa de 100 grãos, apenas as variedades Bico Ganga e Mira se mantiveram estáveis, as demais reduziram a massa dos grãos quando submetidas ao tratamento de estresse hídrico. As variedades Quebra Cacho e Sempre Verde foram as que apresentaram redução mais marcante. Resultados similares têm sido relatados em variedades de arroz conduzidas sob estresse hídrico (CASTILLO et al., 2006; VENUPRASAD et al., 2007; MOSTAJERAN e RAHIMI-EICHI, 2009). O estresse hídrico decresce a translocação de assimilados para o grão o que reduz a produção, a massa e, conseqüentemente, aumenta a porcentagem de grãos vazios.

A esterilidade da espiguetas representa a quantidade de grãos chochos pela quantidade total de grãos produzidos. As variedades Bico Ganga, Catetão, Manteiga, Piauí, Prata Ligeiro e Sempre Verde mantiveram estáveis a quantidade de grãos estéreis quando submetidas ao tratamento de estresse. É importante destacar que a porcentagem de esterilidade foi significativamente baixa nas variedades Catetão e Piauí em ambos os tratamentos (Tabela 9). Para as demais variedades houve considerável aumento desta variável. A intensidade da ocorrência de esterilidade dos grãos pode variar de acordo com a capacidade da planta de tolerar o estresse conforme observado por SINGH e SINGH, (2013) e RAMAN et al. (2012). Variedades tolerantes tendem a apresentar um melhor status hídrico que influencia diretamente no enchimento, esterilidade dos grãos e produtividade (LIU et al., 2008). De fato, as variedades Catetão e Piauí apresentaram baixa redução do TRA sob estresse hídrico (Figura 7).

O índice de fertilidade das espiguetas foi determinado de acordo com a Tabela 3 fornecida pelo IRRI. A partir deste índice, pode-se observar que as variedades Catetão, Palha Murcha e Quebra Cacho foram as mais férteis no tratamento controle. No entanto, apenas a variedade Catetão manteve altos índices de fertilidade no tratamento de estresse. O índice de colheita (IC) mostrou-se estável nas variedades Bico Ganga, Catetão, Manteiga, Palha Murcha, Piauí, Sempre Verde e Três Meses. Com destaque para a Catetão e Palha Murcha que mantiveram altos valores de IC em ambos os tratamentos. O IC tem sido usado como principal recurso para o melhoramento da produtividade sob condição controle e estresse hídrico (DONALD e HAMBLIN, 1976). A manutenção de um alto IC sob condição estresse é uma componente chave para a seleção de genótipos superiores. No entanto, uma variedade tolerante deve combinar além de alto IC, alta produção de biomassa, crescimento radicular em profundidade e maturidade adequada dos grãos (WALLACE et al., 1993; HENRY, 2013).

**Tabela 9.** Produção, massa de 100 grãos, esterilidade da espiguetas, índice de fertilidade das espiguetas e índice de colheita das variedades de arroz de sequeiro cultivadas em casa de vegetação sob condição controle e estresse hídrico.

Variedades	Produção		Massa 100 g.		Est. da Espig.		Fertilidade		IC	
	g vaso <sup>-1</sup>		g vaso <sup>-1</sup>		%					
	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.
Bico Ganga	23,2aD	16,8bB	2,8aC	2,6aC	31,7aA	34,8aB	7	7	0,42aC	0,33aC
Catetão	29,5aC	21,7bA	3,5aA	3,2bA	9,8aB	9,5aF	9	9	0,63aB	0,64aA
Manteiga	17,6aE	11,4bC	2,0aD	1,8bE	30,3aA	30,6aC	7	7	0,36aC	0,34aC
Mira	27,5aC	10,2bC	2,8aC	2,7aC	25,2bA	50,3aA	7	5	0,40aC	0,23bC
Palha Murcha	34,6aB	16,6bB	3,2aB	2,9bB	10,2bB	18,5aE	9	7	0,60aB	0,50aB
Piauí	24,7aD	17,8bB	3,4aA	3,1bA	11,2aB	16,7aE	7	7	0,38aC	0,40aC
Prata Ligeiro	27,8aC	13,6bC	2,7aC	2,4bD	24,5aA	29,5aC	7	7	0,72aA	0,60bA
Quebra Cacho	39,7aA	14,6bC	3,1aB	2,5bD	5,2bB	33,3aC	9	7	0,76aA	0,31bC
Sempre Verde	19,6aE	13,6bC	3,0aB	2,5bD	29,2aA	24,4aD	7	7	0,33aC	0,32aC
Três Meses	23,9aD	14,9bC	2,6aC	2,4bD	26,8bA	38,7aB	7	7	0,59aB	0,53aB
C.V%	13,78		4,95		17,11				16,89	

<sup>a</sup> Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey entre linhas e Scott-Knott entre colunas a  $p \leq 0,05$  de significância. IC = índice de colheita; Cont = Controle e Est. = Estresse.

Outra maneira de representar os dados de produção é por meio da avaliação da produtividade (t/ha) e produtividade relativa (Tabela 10). A produtividade apresentou o

mesmo padrão do IC destacando-se as variedades Palha Murcha e Quebra Cacho como as mais produtivas. Por outro lado, quando submetidas ao tratamento de estresse hídrico essas variedades mostraram considerável redução de produtividade em aproximadamente 44 e 61%, respectivamente. A variedade mais estável e com níveis de produtividades acima da média geral obtida para o tratamento controle (4,32) e estresse hídrico (2,48) foi a Catetão. A produtividade relativa demonstra de maneira clara quais são as variedades mais produtivas em relação as demais avaliadas na mesma condição. Este dado corrobora o resultado de IC e produtividade mostrando que a variedade Quebra Cacho foi a mais produtiva no tratamento controle, enquanto que a Catetão foi a mais produtiva quando submetida ao estresse hídrico.

**Tabela 10.** Produtividade e produção relativa das variedades de arroz de sequeiro cultivadas em casa de vegetação sob condição controle e estresse hídrico.

Variedades	Produtividade (t/ha)		Produtividade Relativa	
	Controle	Estresse	P.Rc	P.Re
Bico Ganga	4,05aC	2,46bC	0,62	0,70
Catetão	4,53aC	3,53bA	0,70	1,00
Manteiga	2,74aC	2,06bC	0,42	0,58
Mira	4,13aD	1,41bD	0,63	0,40
Palha Murcha	5,29aB	2,98bB	0,81	0,84
Piauí	4,25aC	2,94bB	0,65	0,83
Prata Ligeiro	4,41aC	2,25bC	0,68	0,64
Quebra cacho	6,51aA	2,55bC	1,00	0,72
Sempre Verde	3,19aD	2,13bC	0,49	0,60
Três Meses	4,16aC	2,47bC	0,64	0,70
Média	4,32	2,48		
C.V%		9,1		

<sup>a</sup> Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey entre linhas e Scott-Knott entre colunas a  $p \leq 0,05$  de significância. IC = índice de colheita; Cont = Controle e Est. = Estresse; P.Rc = Produtividade relativa controle e P.Re = Produtividade relativa estresse.

Índices baseados na produtividade são amplamente utilizados como indicadores capazes de identificar variedades tolerantes ao estresse hídrico em diversas culturas agrícolas, como: arroz (KUMAR et al., 2014B), feijão (RAMIREZ-VALLEJO e KELLY, 1998), cevada (ZARE, 2012) e trigo (GUENDOZ et al., 2012). De acordo com a literatura, o cálculo deste índice pode ser realizado por diferentes equações, sendo que o índice ideal não deve priorizar a produção apenas em um tratamento (DARVISHZADEH et al., 2010). Pelo fato de existirem diversas equações para classificar genótipos em relação a tolerância ao estresse hídrico, foram utilizadas em nosso trabalho nove equações a fim de se comparar se os resultados obtidos seriam convergentes entre si (Tabela 11; Tabela anexo 3).

**Tabela 11.** Principais índices de tolerância ao estresse nas variedades de arroz de sequeiro cultivadas em casa de vegetação sob condição controle e estresse hídrico.

Variedades	SSI	TOL	GMP	STI	SSSI	MRP	REI	DYI	DTE
Bico Ganga	0,92C	0,99C	1,96B	0,53B	-0,03C	1,93C	0,93B	0,95B	60,76C
Catetão	0,50E	0,62D	2,48A	0,86A	-0,21D	2,47A	1,49A	0,73C	78,67A
Manteiga	0,59E	0,42D	1,47C	0,30C	-0,18D	1,47D	0,53C	0,77C	74,89A
Mira	1,54A	1,68B	1,50C	0,31C	0,23A	1,53D	0,55C	1,68A	34,20E
Palha Murcha	1,02C	1,43B	2,46A	0,84A	0,01C	2,42A	1,47A	1,03B	56,47C
Piauí	0,73D	0,81C	2,19A	0,68A	-0,12D	2,17B	1,18A	0,84C	68,79B
Prata Ligeiro	1,15B	1,34B	1,95B	0,53B	0,06B	1,93C	0,92B	1,13B	51,05D
Quebra cacho	1,43A	2,46A	2,52A	0,89A	0,18A	2,53A	1,55A	1,49A	38,98E
Sempre Verde	0,78D	0,66D	1,61C	0,36C	-0,10C	1,60D	0,63C	0,86C	66,83B
Três Meses	0,95C	1,04C	1,99B	0,55B	-0,02C	1,96C	0,96B	0,96B	59,59C
C.V%	13,8	16,2	8,8	18,8	3,0	8,5	18,9	10,6	9,6

<sup>a</sup> Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a  $p \leq 0,05$  de significância. SSI = Índice de Suscetibilidade ao Estresse; TOL = Índice de Tolerância ao Estresse; GMP = Média Geométrica de Produtividade; STI = Índice de Tolerância ao Estresse; SSSI = Índice de Tolerância ao Estresse modificado; MRP = Média de Desempenho Relativo; REI = Índice de Produtividade Relativa; DYI = Índice de Produtividade no Estresse; DTE = Eficiência a Tolerância a Seca.

A avaliação individual das médias obtidas para cada variedade utilizando as diferentes equações mostra que as alterações são pequenas em relação aos índices SSI, TOL, SSSI, DYI e DTE. Este resultado é confirmado na análise de correlação estatística entre os diferentes índices adotados (Tabela 12). Os valores observados mostram que existe correlação positiva entre o índice SSI em relação aos índices TOL, SSSI e DYI. Os índices DYI, TOL e SSI favorecem genótipos com boa produtividade em condição de estresse, portanto são mais úteis para identificar genótipos que possuem bom desempenho em ambientes sujeitos a estresses (RAMAN et al., 2012). Estes índices avaliam as plantas baseados no mesmo critério em que valores baixos indicam as variedades mais tolerantes ao estresse hídrico. Correlação negativa significativa foi observada para o índice DTE que seleciona as plantas com critério oposto ao preconizado pelo SSI.

**Tabela 12.** Correlação entre os diferentes índices de tolerância ao estresse hídrico.

Variáveis	SSI	TOL	GMP	STI	SSSI	MRP	REI	DYI	DTE
SSI	<b>1</b>								
TOL	<b>0,897</b>	<b>1</b>							
GMP	-0,064	0,326	<b>1</b>						
STI	-0,057	0,333	<b>0,995</b>	<b>1</b>					
SSSI	<b>1,000</b>	<b>0,805</b>	0,004	0,003	<b>1</b>				
MRP	-0,042	0,351	<b>0,999</b>	<b>0,995</b>	0,002	<b>1</b>			
REI	-0,057	0,333	<b>0,995</b>	<b>1,000</b>	0,003	<b>0,995</b>	<b>1</b>		
DYI	<b>0,961</b>	<b>0,864</b>	-0,108	-0,092	<b>0,923</b>	-0,073	-0,092	<b>1</b>	
DTE	<b>-1,000</b>	<b>-0,897</b>	0,064	0,057	<b>1,000</b>	0,042	0,057	<b>-0,961</b>	<b>1</b>

Os valores em negrito são significantes a  $\alpha = 0,01$ .

A partir destes índices foi possível selecionar as variedades Catetão e Piauí como as mais tolerantes e Quebra Cacho e Mira como as mais sensíveis. O resultado encontrado está em desacordo com TERRA et al. (2010) que identificou a variedade Quebra Cacho como a mais tolerante ao estresse hídrico. A diferente metodologia de estresse adotada e o conjunto



de genótipos utilizados para o cálculo do SSI podem ter sido responsáveis pelo resultado obtido. Por outro lado, os índices GMP, STI, MRP e REI não se correlacionaram com os demais índices, correlacionando-se positivamente apenas entre si (Tabela 12). Variedades com altos valores desses índices apresentam maior tolerância ao estresse hídrico. As variedades contrastantes selecionadas pelo uso deste índice apresentam distorções em relação ao grupo anteriormente mencionado. Por este grupo de índices, as variedades mais tolerantes ao estresse hídrico seriam a Quebra Cacho, Catetão e Palha Murcha. Em contrapartida, as mais sensíveis seriam Manteiga e Mira.

Foi possível observar que as equações utilizadas para o cálculo dos índices GMP, STI, MRP e REI superestimam o valor final quando a produtividade de determinada variedade é alta em condição controle ou estresse. Dessa forma, variedades como a Quebra Cacho e Palha Murcha que mostraram altos valores de produtividade em condição de controle obtiveram altos valores de índice e, conseqüentemente, foram consideradas tolerantes. A variedade Manteiga possui baixa produção em ambos os tratamentos apresentando baixo valor de índice e, conseqüentemente, alta suscetibilidade ao estresse hídrico. Apesar das distorções existentes entre as diferentes equações adotadas, é possível observar que as variedades Catetão e Mira se mostram como tolerante e suscetível, respectivamente, em todas as equações aplicadas (Tabela 11).

Os índices GMP e STI são úteis para identificar genótipos que produzem bem em ambiente controle e razoavelmente bem em ambiente sob estresse (KRISTIN et al., 1997; FERNANDEZ, 1992). Esses índices não se adequaram ao presente trabalho, pelo fato de priorizarem variedades altamente produtivas, principalmente, na condição controle. Outros trabalhos também já haviam observado divergência na escolha das variedades tolerantes ao utilizar esses índices (PRAKASH, 2007; RAMAN et al., 2012; KUMAR et al., 2014B). Com relação ao índice MRP e REI, por se tratarem de uma soma ou produto de duas taxas, os valores dos índices podem ser superestimados quando a produção em ambiente controle ou estresse for alta (RAMAN et al., 2012). Se a produção no tratamento controle de determinada variedade é alta, ela será considerada tolerante, mesmo que a sua produção no estresse seja baixa. Resultado este observado para as variedades Quebra Cacho e Palha Murcha.

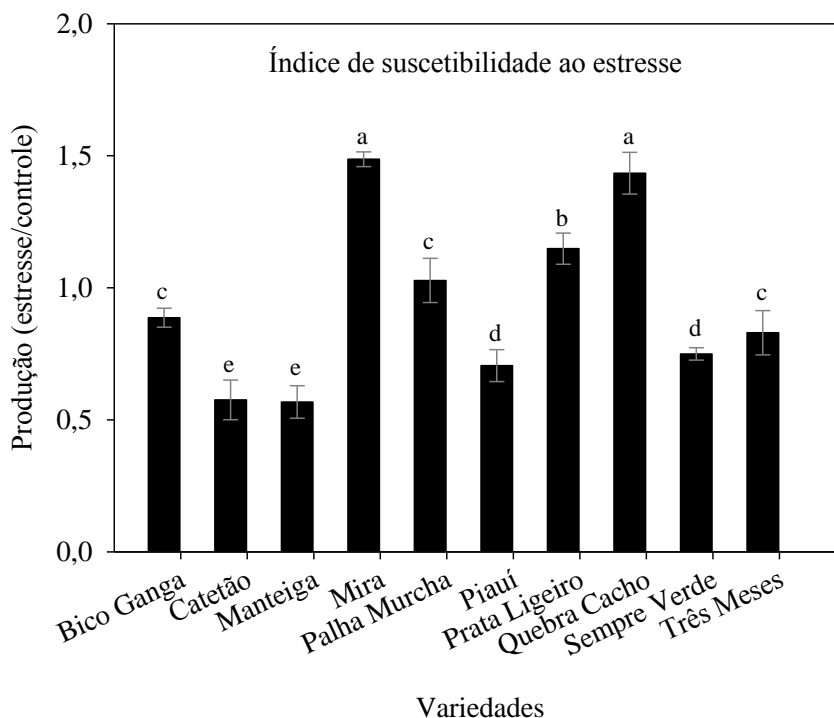
A partir dos resultados expostos, foi selecionado o Índice de Suscetibilidade ao Estresse (SSI) proposto por FISHER e MAURER, (1978) para representação na Figura 5, uma vez que resume os resultados obtidos por cinco diferentes índices (SSI, SSSI, TOL, DYI e DTE), não apresenta distorções em relação a produtividade no controle e pelo fato de ser amplamente utilizado em outros trabalhos (GUENDOUZ et al., 2012; RAMAN et al., 2012; NAGHAVI et al., 2013; KUMAR et al., 2014B).

O índice SSI resume os resultados de produtividade obtidos para as variedades estudadas e elenca quais variedades seriam mais tolerantes (menor valor de índice) ou mais sensíveis (maior valor de índice) em relação a condição de estresse hídrico. As variedades Catetão, Manteiga, Piauí e Sempre Verde mostraram os menores valores de SSI (0,50; 0,59; 0,73 e 0,78), indicando que estas variedades desenvolveram mecanismos para tolerar o estresse hídrico e assegurar a produção de grãos mesmo nesta condição limitante (Figura 5). Valores de SSI menores que 1,0 indicam variedades com alta tolerância ao estresse, como mostrado por CHOUKAN et al. (2006). TERRA et al. (2010), também observaram que plantas com menor valor de SSI apresentam características morfológicas e fisiológicas que contribuem para a maior tolerância ao estresse hídrico e, desta forma, são interessantes para serem utilizadas em programas de melhoramento genético.

As variedades Bico Ganga, Prata Ligeiro, Três meses e Palha Murcha apresentaram valores intermediários de SSI (0,92; 1,15; 0,95 e 1,02), enquanto que as variedades Mira e Quebra Cacho apresentaram os maiores valores (1,54 e 1,43). KUMAR et al. (2014B), ranquearam os resultados obtidos com o índice SSI em quatro categorias: altamente tolerante



a seca ( $SSI < 0,50$ ), tolerante a seca ( $SSI: 0,51 - 0,75$ ), moderadamente tolerante a seca ( $SSI: 0,76 - 1,00$ ) e sensível a seca ( $SSI > 1,0$ ). Os genótipos mais tolerantes apresentaram valor de SSI de 0,33 e 0,52, enquanto o mais sensível apresentou valor de SSI de 1,34. Os resultados observados em nosso trabalho estão de acordo com o observado por KUMAR et al. (2014B).



**Figura 5.** Índice de suscetibilidade ao estresse (SSI) das variedades de arroz de sequeiro cultivadas em casa de vegetação sob condição controle e estresse hídrico.

O índice SPAD foi obtido para determinar se o grau do estresse ao qual as plantas estavam submetidas poderia reduzir os níveis de clorofila ao longo do tempo e, conseqüentemente, aumentar o amarelecimento precoce das folhas. A retenção da cor verde das folhas em plantas submetidas a déficit hídrico tem sido usada como um critério de seleção de resistência a seca (DE DATTA et al., 1988). Além disso, plantas que retêm a cor verde por período mais longo mantém suas atividades metabólicas e pode ativar mecanismos de tolerância, como o ajustamento osmótico (FUKAI e COOPER, 1995).

No primeiro dia de avaliação após a aplicação do estresse hídrico não foi observada diferença significativa entre o tratamento controle e estresse para todas as variedades (Tabela 13). No quinto dia de avaliação, já foi observada maior redução nos níveis de clorofila para as variedades Bico Ganga, Catetão, Manteiga, Palha Murcha e Piauí no tratamento sob estresse hídrico. Nos dias subsequentes de análise houve redução no teor de clorofila nas variedades Bico Ganga, Catetão, Manteiga, Mira, Palha Murcha, Piauí e Quebra Cacho quando comparada ao controle. Apenas as variedades Prata Ligeiro, Sempre Verde e Três meses mantiveram os níveis de clorofila mesmo após 30 dias de estresse hídrico (Tabela 13). A manutenção do nível de clorofila é um indicativo de que essas variedades conseguem manter o metabolismo primário de carbono e nitrogênio, característica essencial em cultivares tolerantes ao estresse hídrico (SINGH e GHOSH, 2013). Trabalho realizado por MOSTAJERAN e RAHIMI-EICHI (2009), mostrou que a variedade de arroz tolerante ao estresse hídrico é capaz de reter as cores verdes por mais tempo do que as variedades sensíveis sob déficit hídrico.

**Tabela 13.** Índice SPAD ao longo do tempo em variedades de arroz de sequeiro cultivadas em casa de vegetação sob condição controle e estresse hídrico.

Variedades	1° dia		5° dia		10° dia		20° dia		30° dia	
	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.
Bico Ganga	50,7aB	48,0aB	42,7aB	31,9bC	40,1aA	28,6bC	29,8aB	23,2bC	21,7aC	15,2bC
Catetão	52,0aA	50,3aB	40,7aB	35,3bB	39,6aA	31,9bC	32,5aB	28,8aB	29,0aB	22,6bB
Manteiga	53,2aA	50,2aB	43,2aB	35,2bB	38,5aA	25,2bD	34,9aA	21,5bC	26,0aB	16,7bC
Mira	55,8aA	55,9aA	41,8aB	41,7aA	40,6aA	35,1bB	39,1aA	28,0bB	35,2aA	22,5bB
Palha Murcha	47,5aB	47,9aB	42,5aB	36,4bB	39,7aA	29,3bC	34,0aA	25,9bC	28,1aB	24,9bB
Piauí	49,0aB	47,7aB	37,7aC	32,7bC	34,4aB	31,1aC	34,0aA	24,9bC	26,8aB	20,8bB
Prata Ligeiro	48,5aB	47,1aB	45,5aA	44,8aA	39,6aA	40,8aA	35,3aA	32,5aA	32,2aA	30,2aA
Quebra Cacho	47,5aB	46,1aB	34,5aC	31,1aC	31,3aB	25,2bD	30,3aB	24,3bC	26,6aB	20,9bB
Sempre Verde	55,5aA	52,8aA	40,5aB	37,8aB	36,8aB	36,0aB	34,8aA	33,3aA	32,5aA	30,4aA
Três Meses	48,8aB	47,1aB	46,6aA	45,7aA	43,6aA	42,1aA	36,3aA	33,0aA	31,2aA	31,2aA
C.V%	5,32		7,07		9,11		11,11		12,17	

<sup>a</sup> Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey entre linhas e Scott-Knott entre colunas a  $p \leq 0,05$  de significância. Cont = Controle e Est. = Estresse.

Ao final do experimento foram coletados discos foliares a fim de determinar possíveis alterações nas concentrações de clorofilas e carotenóides nas plantas submetidas ao estresse hídrico em relação ao controle (Figura 6). De acordo com DALAL e TRIPATHY, (2012) o estresse hídrico pode afetar negativamente os teores de clorofila, devido a redução de sua biossíntese ou pelo aumento da sua degradação. Os teores de clorofila nas variedades Manteiga, Mira e Três meses reduziram no tratamento de estresse hídrico.

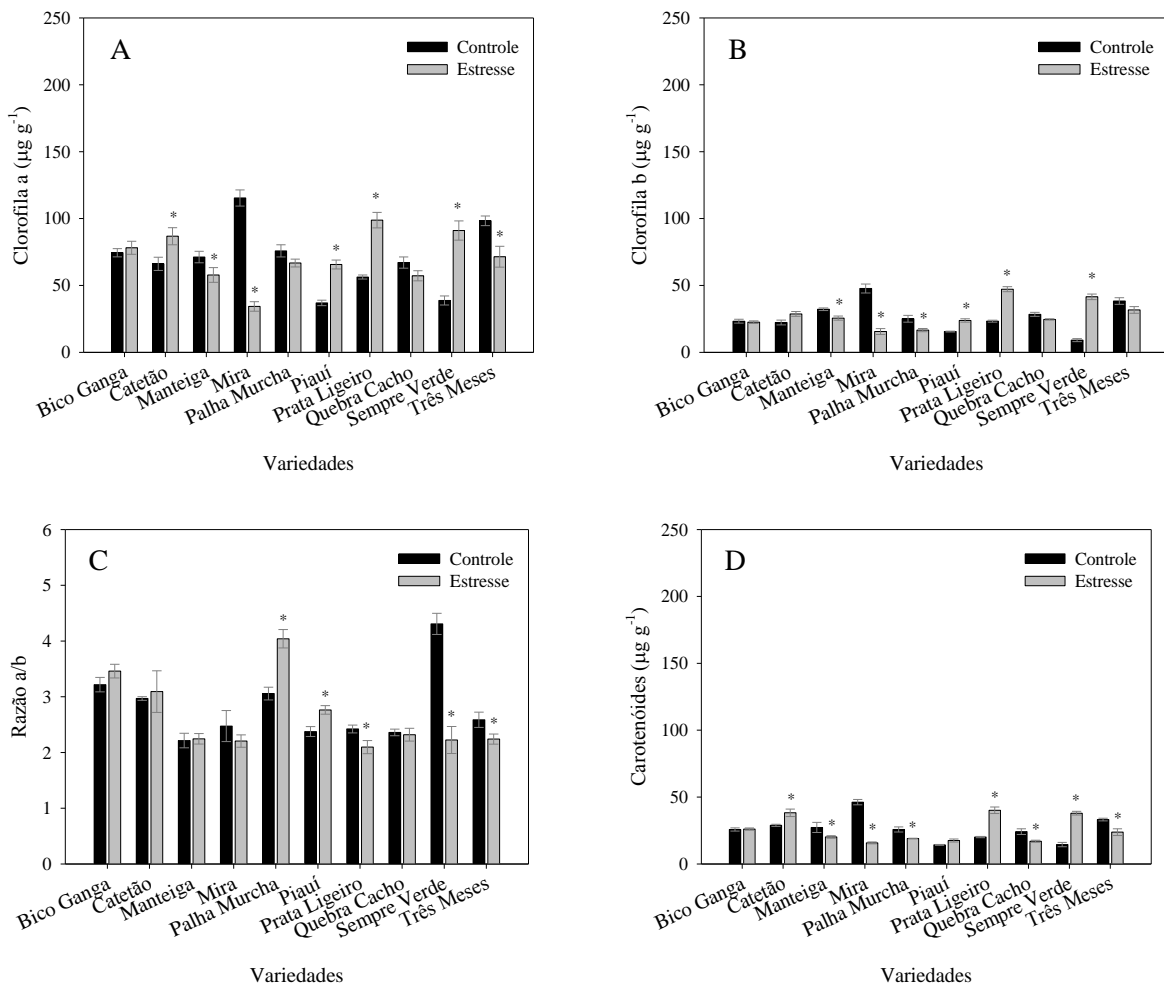
As variedades Bico Ganga, Palha murcha e Quebra Cacho mantiveram constante os níveis de clorofila entre o tratamento controle e estresse. Além disso, o estresse hídrico estimulou a biossíntese de clorofila nas variedades Catetão, Piauí, Prata Ligeiro e Sempre Verde. Comportamento similar foi observado para as concentrações de clorofila b. MOHAN et al. (2000), relataram que plantas tolerantes não mostram alterações significativas no conteúdo de clorofila quando submetidas ao estresse. É possível que essas variedades conseguiram desenvolver mecanismos para tolerar o estresse sem provocar danos ao aparato fotossintético e metabolismo primário de C e N como observado por REGUERA et al. (2013), sendo assim possível manter e/ou estimular a biossíntese de clorofilas. Em outro estudo, plantas de arroz mutante para o gene *ewst1* (enhanced water stress tolerant 1) apresentaram alto teor relativo de água, estabilidade da membrana e concentração de clorofilas sob estresse hídrico (LIMA et al., 2015).

A razão a/b representa a proporção de clorofila a e b existente em cada planta. Foi observado que a proporção de clorofila a é maior do que a de b em ambos os tratamentos, resultado este comum em folhas expostas a luz solar direta (NEVES et al., 2005). Em geral, as variedades apresentaram poucas alterações na razão a/b em relação ao tratamento aplicado. Apenas a variedade Palha Murcha apresentou maior proporção de clorofilas no tratamento estresse, devido as diferenças observadas na concentração de clorofila b. Já para a variedade Sempre Verde essa proporção foi maior, devido a redução de clorofila b no tratamento controle.

As variedades Catetão, Prata Ligeiro e Sempre Verde apresentaram maiores concentrações de carotenóides quando submetidas ao tratamento de estresse hídrico. Assim como as clorofilas, os carotenóides são requeridos para correta modelagem, montagem e

inserção de proteínas fotossintéticas nas membranas dos tilacóides (HORN e PAULSEN, 2002). Essas variedades apresentaram também maiores concentrações de clorofila a e b o que sugere a sua maior tolerância ao estresse hídrico. Já as variedades Manteiga, Palha murcha e Quebra Cacho mostraram redução no tratamento de estresse e as variedades Bico Ganga e Piauí não sofreram alterações nas suas concentrações em ambas as condições.

JUNIOR et al. (2012) relatam a existência de correlação positiva ( $r = 0,72$ ) entre o índice do ClorofiLOG e os teores de clorofila em capim tifton adubado com três doses de N. Como o estresse hídrico pode afetar diretamente os teores de clorofila (USMAN et al., 2013) foi feita a correlação entre o índice SPAD e o teor de clorofilas nas variedades estudadas (Tabela anexo 8). No entanto, não foi observada correlação significativa entre esses dados ( $r = 0,22$ ). O fato de a análise de clorofilas e carotenóides ter sido realizada apenas ao final do ciclo, por se tratar de uma análise destrutiva, e a determinação do índice SPAD realizada ao longo do tratamento de estresse pode ter sido responsável por essa baixa correlação observada. Além disso, como a análise de clorofilas foi realizada com discos foliares ( $D=10$  mm), uma pequena diferença entre a área de medição do índice SPAD e a área de retirada dos discos foliares também podem ter causado a divergência nos resultados encontrados.



**Figura 6.** Clorofila a (A), clorofila b (B), razão a/b (C) e carotenóides (D) de folhas bandeira das variedades de arroz de sequeiro cultivadas em casa de vegetação sob condição controle e estresse hídrico.

O teor relativo de água (TRA - %) foi avaliado ao final do ciclo de acordo com a data definida para cada variedade. A determinação do TRA é um importante indicador para diferenciar genótipos que conseguem melhor se adaptar a seca por determinar, com confiabilidade, o status hídrico da planta (CHA-UM et al., 2010). A variedade Bico Ganga foi a única que não apresentou alterações no TRA quando submetida ao estresse (Figura 7A).

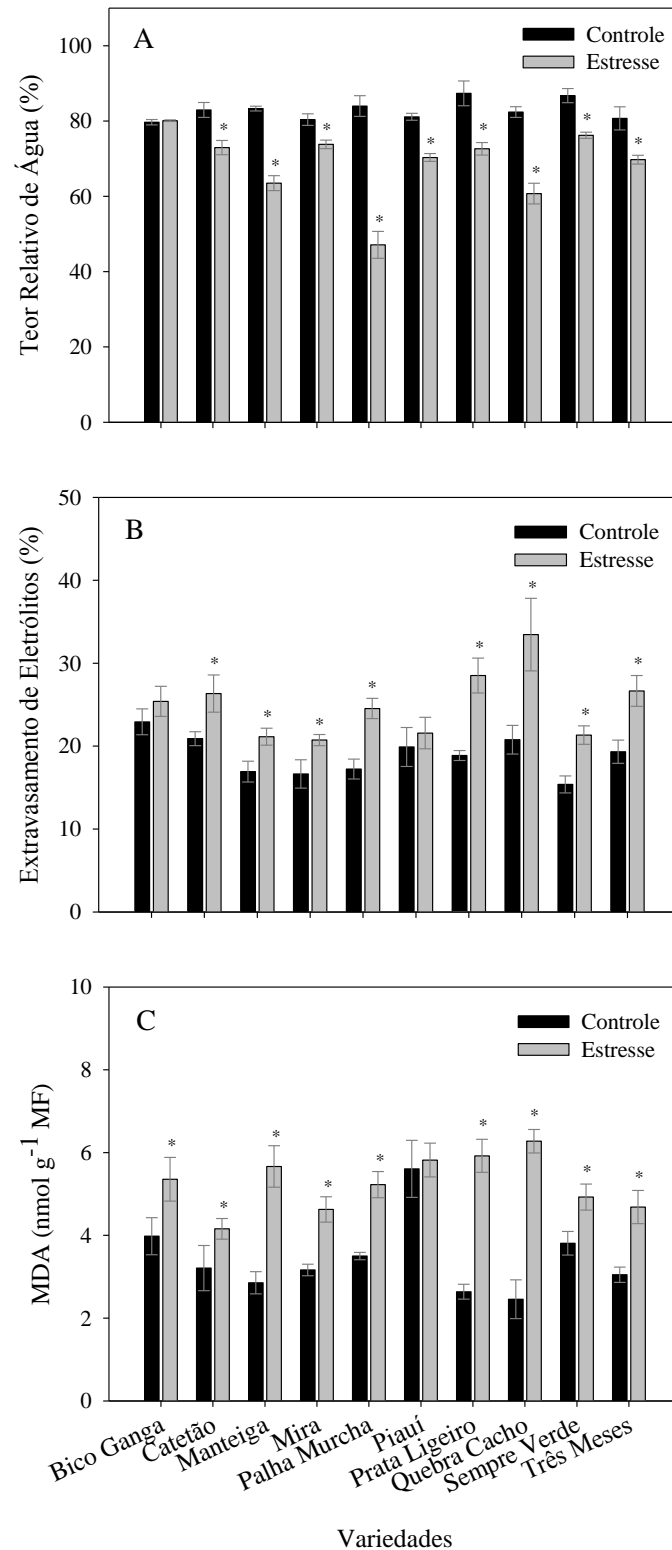
A redução no TRA é comum em plantas sujeitas a tratamentos com déficit hídrico como observado em SIDDIQUE et al. (2000) e XIONG et al. (2012). As variedades Catetão, Piauí e Sempre Verde mostraram a menor redução do TRA, sugerindo que o melhor status hídrico nessas variedades pode ter contribuído para a maior tolerância ao estresse. Enquanto que as variedades Quebra Cacho e Palha Murcha apresentaram forte redução do TRA sob estresse hídrico de, aproximadamente 25 e 45%, respectivamente.

Como esperado, o extravasamento de eletrólitos (EE - %) foi maior nas plantas submetidas ao estresse hídrico, sugerindo a ocorrência de danos às membranas celulares (Figura 7B). As variedades Bico Ganga e Piauí se mantiveram estáveis em ambos os tratamentos analisados. Os maiores níveis de extravasamento foram observados para as variedades Prata Ligeiro e Quebra Cacho. Valores altos de EE indicam ruptura da integridade de membrana, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e peroxidação de lipídios que afetam praticamente todos os componentes fotossintéticos (TORRES NETO, 2005).

A peroxidação lipídica foi representada pela produção de malondialdeído (MDA - nmol g MF<sup>-1</sup>) (Figura 7C). A peroxidação das membranas por radicais livres é um reflexo do dano induzido pelo estresse a nível celular (JAIN et al., 2001). Portanto, os níveis de MDA, produzidos durante a peroxidação lipídica das membranas é utilizado como indicador de dano oxidativo.

As variedades Bico Ganga, Piauí e Catetão mostraram pequena alteração nos níveis de produção de MDA quando submetidas ao tratamento de estresse hídrico, corroborando os dados encontrados para EE e indicando um menor dano as membranas dessas plantas. Por outro lado, as variedades Prata Ligeiro, Manteiga e Quebra Cacho mostraram altos níveis de produção de MDA, sugerindo a maior sensibilidade ao estresse por essas plantas.

As demais variedades Mira, Sempre Verde, Três Meses e Palha Murcha apresentaram níveis intermediários de aumento na produção de MDA. Foi observada correlação positiva entre os valores de extravasamento de eletrólitos e peroxidação lipídica. Essas variáveis se correlacionaram negativamente com o TRA, como mostrado na Tabela anexo 8. Este resultado está de acordo com o encontrado na literatura para diferentes espécies vegetais em que plantas com melhor status hídrico apresentam menor taxa de danos as membranas e peroxidação lipídica (BASU et al., 2010; MIRZAEI et al., 2013). É interessante destacar que as variedades Palha Murcha e Quebra Cacho apresentaram baixo valor de TRA, aumento no extravasamento de eletrólitos e peroxidação lipídica (Figura 7). Além de significativa redução da produção quando submetida ao estresse hídrico (Tabela 8).



**Figura 7.** Teor Relativo de Água (TRA, %) (A), extravasamento de eletrólitos (EE, %) (B) e peroxidação de lipídeos em folhas +2 (MDA, g-1 MF) (C) das variedades de arroz de sequeiro cultivadas em casa de vegetação sob condição controle e estresse hídrico. Barra vertical indica o erro padrão da média de quatro repetições por tratamento.

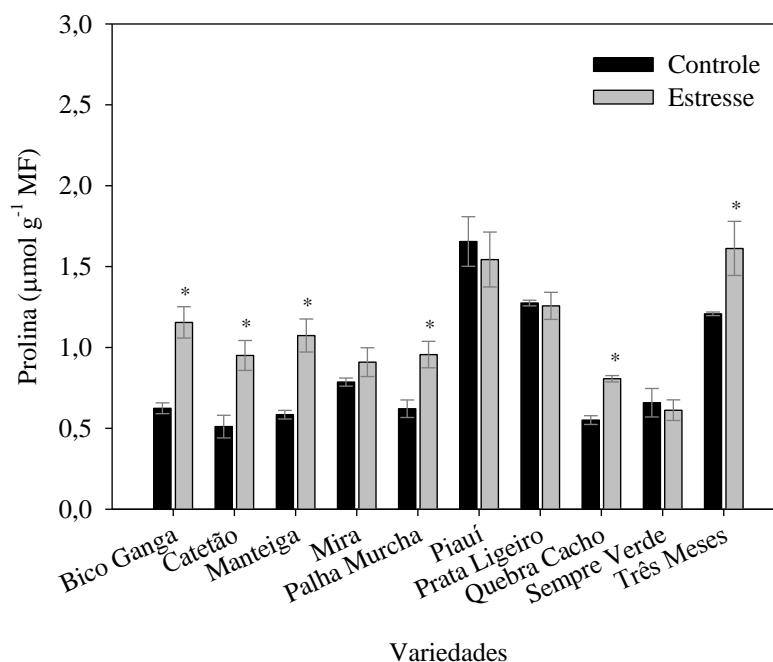
A prolina é reconhecida como um composto osmoprotetor por atuar na estabilização de proteínas, inibição da peroxidação lipídica e no seqüestro de espécies reativas de oxigênio (TROVATO et al., 2008).

A prolina pode atuar como soluto compatível que aumenta quando se torna necessário a manutenção de um potencial osmótico entre a célula e seus arredores. Além disso, a prolina acumulada provê energia para a sobrevivência e crescimento da planta em condições de estresse (KUMAR et al., 2011). Na Figura 8 são apresentados os dados relativos aos teores de prolina nas variedades estudadas submetidas a condição controle e estresse hídrico. As variedades Bico Ganga, Catetão, Manteiga, Palha Murcha, Quebra Cacho e Três Meses aumentaram, significativamente, a produção de prolina quando submetidas ao estresse hídrico (Figura 8). No entanto, Mira, Piauí, Prata Ligeiro e Sempre Verde não apresentaram alteração deste parâmetro. O acúmulo de prolina tem se mostrado como um mecanismo de relevante importância para a manutenção do status hídrico e atividades metabólicas em plantas submetidas ao estresse hídrico e salino (LAROSA et al., 2001; MOSTAJERAN e RAHIMI-EICHI, 2009).

DEMIRAL e TURKAN (2005) compararam a peroxidação lipídica e o conteúdo de prolina em duas cultivares de arroz contrastante quanto a tolerância ao estresse salino. Os autores observaram que a planta sensível apresentou aumento da peroxidação lipídica e conteúdo de prolina, enquanto a cultivar tolerante não apresentou alteração dessas variáveis.

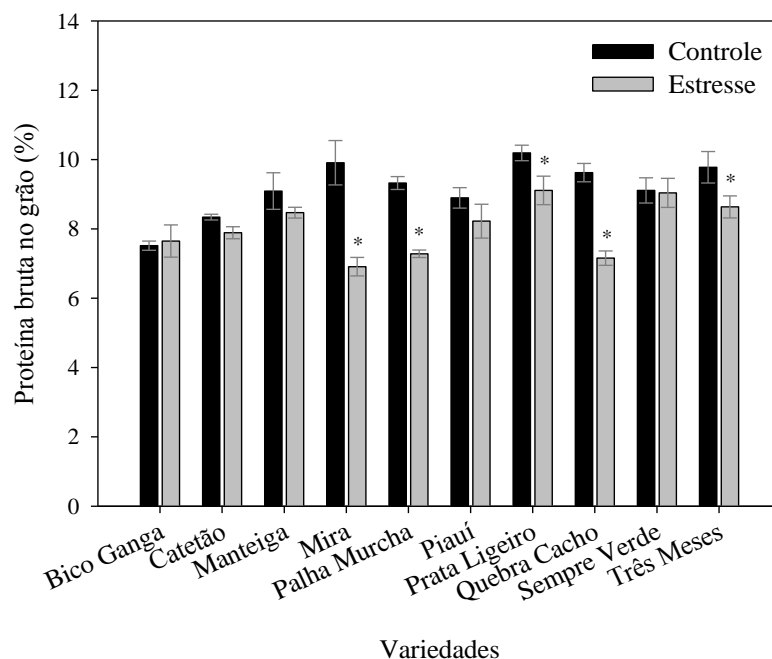
Trabalho realizado por XIONG et al. (2012), mostraram que plantas de arroz submetidas a estresse hídrico por 15 dias apresentaram redução do TRA em mais de 50%, aumento do extravasamento de eletrólitos e na produção de prolina. LUM et al. (2014), também observaram correlação positiva entre o acúmulo de prolina e o aumento da tolerância ao estresse em uma variedade de arroz de sequeiro.

Em outro trabalho estudou-se o efeito do estresse hídrico nos componentes de produtividade, acúmulo de prolina e açúcares solúveis em três variedades de arroz. Foi possível observar correlação entre o acúmulo de solutos compatíveis e a tolerância ao estresse por uma das variedades (MOSTAJERAN e RAHIMI-EICHI, 2009).



**Figura 8.** Teores de Prolina em folhas maduras ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  MF) das variedades de arroz de sequeiro cultivadas em casa de vegetação sob condição controle e estresse hídrico. Barra vertical indica o erro padrão da média de quatro repetições por tratamento.

O acúmulo de proteína bruta nos grãos de arroz é uma característica controlada geneticamente por cada variedade, no entanto pode ser influenciada pelas condições de cultivo. As variedades Bico Ganga, Catetão, Manteiga, Piauí e Sempre Verde não apresentaram alterações na porcentagem de proteína bruta no grão quando submetidas ao tratamento de estresse hídrico (Figura 9). No entanto, as variedades Mira, Palha Murcha, Prata Ligeiro, Quebra Cacho e Três meses apresentaram redução quando submetidas ao tratamento de estresse, com destaque para as variedades Mira, Palha Murcha e Quebra Cacho que apresentaram uma redução de 30,2; 21,8 e 25,6%, respectivamente. Trabalho realizado por FOFANA et al. (2010) e BLEOUSSI et al., (2016) observaram aumento no conteúdo de N no grão quando as plantas foram submetidas a condição de estresse hídrico. Acredita-se que essas plantas apresentam a capacidade de aumentar a translocação de fotoassimilados, acúmulo de N e ganho de biomassa no grão após a imposição de um estresse. Em nosso trabalho, não foi observado aumento do conteúdo de proteína no grão o que pode ter sido consequência das características genéticas de cada variedade, tempo e/ou intensidade do estresse imposto.



**Figura 9.** Proteína bruta no grão (%) das variedades de arroz de sequeiro cultivadas em casa de vegetação sob condição controle e estresse hídrico. Barra vertical indica o erro padrão da média de quatro repetições por tratamento.

A análise de um grande número de características morfológicas e fisiológicas para as dez variedades estudadas tornou as interpretações difíceis, uma vez que alguns resultados se inter-relacionam e a discussão de cada um individualmente se torna repetitiva. Além disso, a análise de um dado isolado pode induzir ao erro, visto que algumas variáveis podem indicar uma maior tolerância ao estresse por determinada variedade, enquanto outras podem indicar sua maior sensibilidade. Diante disso, foi aplicado um método de análise multivariada considerando todas as características analisadas no tratamento controle e estresse hídrico, o que permitiu agrupar as variedades para facilitar suas comparações. Esse tipo de análise vem sendo rotineiramente aplicada para discriminar genótipos tolerantes e sensíveis ao estresse hídrico em outros trabalhos de pesquisa (DARVISHZADEH et al., 2010; ABDI et al., 2013).

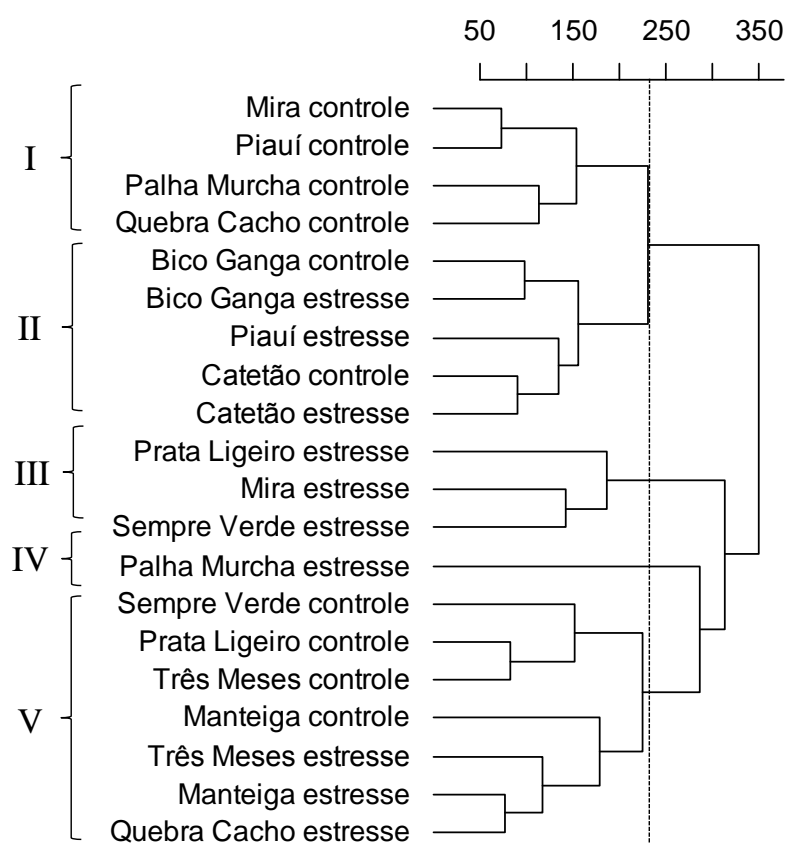
A análise de agrupamento pelo método UPGMA, baseada na distância de Mahalanobis, foi o que apresentou o maior coeficiente de correlação cofenético e consistência via Mantel (0,57) (Tabela anexo 4). Dessa forma, este método de agrupamento foi selecionado para representar a distribuição das variedades de acordo com as variáveis analisadas. As variedades se agruparam em cinco grandes grupos segundo o pacote MapTree (WHITE e GRAMACY, 2012) (Figura 10; Figura anexo 1). Variedades que permaneceram próximas em ambos os tratamentos não sofreram grandes alterações nas variáveis analisadas, enquanto que variedades que alteraram significativamente suas variáveis apresentaram a tendência de se afastar nos agrupamentos. De maneira geral, foi possível observar que as variedades tenderam a se afastar quando submetidas ao estresse hídrico, como as variedades Mira, Piauí, Palha Murcha, Quebra Cacho, Prata Ligeiro e Sempre Verde. Já as variedades Bico Ganga e Catetão, Manteiga e Três Meses permaneceram nos mesmos grupos II e V em ambos os tratamentos.

A partir da separação nestes grandes grupos, utilizou-se o valor de SSI, que resume os dados obtidos nas componentes de produtividade, para determinar o grupo das variedades



tolerantes e o grupo das variedades sensíveis. As variedades mais sensíveis ao estresse hídrico foram Mira e Quebra Cacho, pelo fato de mostrarem altos valores de SSI (1,54 e 1,43) e se distanciarem nos agrupamentos formados. Mira e Quebra Cacho controle permaneceram juntas no grupo I, enquanto que seu tratamento estresse migrou para o grupo III e V, respectivamente. As variedades mais tolerantes ao estresse hídrico foram a Manteiga, Catetão e Piauí. A variedade Manteiga apresentou valor de SSI de 0,59 e ambos os tratamentos permaneceram juntos no grupo V. As variedades Catetão e Piauí, com valores de SSI de 0,50 e 0,73, respectivamente, permaneceram no grupo II para ambos os tratamentos (Figura 10).

As variedades Sempre Verde, Bico Ganga, Prata Ligeiro, Três Meses e Palha Murcha apresentaram valores de SSI intermediários. A associação entre as demais características morfológicas e fisiológicas foi o que permitiu o agrupamento destas variedades em grupos próximos ou distantes. No entanto, estas variedades foram consideradas com níveis intermediários de tolerância ao estresse.



**Figura 10.** Dendrograma de dissimilaridades genéticas pela distância de Mahalanobis e método de agrupamento “UPGMA”, com base nas características morfológicas e fisiológicas analisadas nas variedades de arroz de sequeiro cultivadas em casa de vegetação sob condição controle e estresse hídrico.

A análise de componentes principais foi realizada baseada nas características morfológicas (Figura 11A) e fisiológicas (Figura 11B) das variedades submetidas a condição controle e estresse hídrico. A princípio, a análise foi baseada em todas as variáveis estudadas tornando possível observar a influência de cada componente nos diferentes agrupamentos formados (Figura anexo 2). No entanto, foi possível observar que a profundidade do sistema radicular e o teor de proteína nos grãos não apresentavam forte influência no agrupamento das

variedades, devido ao tamanho reduzido das setas. Dessa forma, foi realizada uma segunda análise dos dados excluindo-se estas duas variáveis.

Nesta segunda análise, para as características morfológicas e componentes de produtividade, observou-se que a componente principal 1 (CP1) foi responsável por 45% da variância total, enquanto a componente principal 2 (CP2) foi responsável por 25%. Juntas as componentes CP1 e CP2 foram responsáveis por 70% de toda variância total (Tabela anexo 5 e Figura 11A). Já para as características fisiológicas, observou-se que a CP1 foi responsável por 46% da variância total, enquanto a CP2 foi responsável por 34%. Juntas as componentes CP1 e CP2 foram responsáveis por 80% de toda variância total (Tabela anexo 6). A partir deste resultado, pode-se discutir a respeito da variabilidade ocorrida, principalmente na CP1 e na CP2, já que estas correspondem a maior parte da variabilidade total, tanto nas características morfológicas como nas características fisiológicas.

A análise das características morfológicas (Figura 11A) possibilitou observar que as variedades se agruparam, quase que exclusivamente, em tratamento controle (componente II e III) e estresse hídrico (I e IV). Apenas as variedades Catetão e Piauí, mesmo sob tratamento de estresse hídrico, agruparam-se com o tratamento controle. Este resultado ressalta a estabilidade dessas variedades e a maior influência dos componentes de produtividade no agrupamento dessas variedades com o tratamento controle. Por outro lado, as variedades Manteiga e Três Meses controle se agruparam com o tratamento de estresse hídrico das demais variedades. Estas variedades apresentaram um menor desenvolvimento e produção em ambos os tratamentos (Tabela 6; Tabela 7). Por esta razão, o seu grupo controle se aproximou mais das variedades conduzidas sob estresse hídrico.

É interessante também observar como algumas variedades permaneceram próximas, enquanto outras se distanciaram quando submetidas ao tratamento de estresse. As variedades Piauí (11, 12) e Catetão (3, 4) controle e estresse permaneceram, respectivamente, nos quadrantes II e III, em contrapartida, as variedades Mira e Quebra Cacho controle (7, 15) presentes, respectivamente, nos quadrantes II e III se distanciaram do seu tratamento estresse (8, 16) para o quadrante I. A variável que mais influenciou no distanciamento entre as variedades nesta componente principal foi a porcentagem de esterelidade da espiguetta, pelo fato de algumas variedades submetidas ao estresse hídrico apresentarem essa variável, consideravelmente, aumentada.

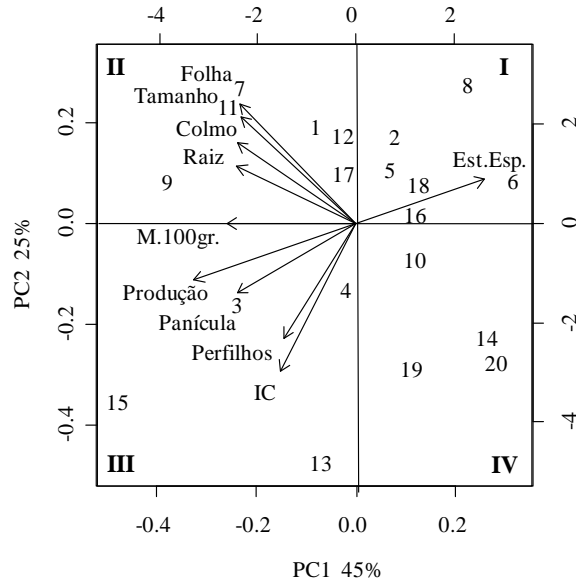
A segunda componente de características fisiológicas (Figura 11B) possibilitou observar, de maneira similar, a separação entre variedades que se agruparam, quase que exclusivamente, em tratamento controle (componente II e III) e estresse hídrico (I e IV). Com exceção para as variedades Prata Ligeiro e Sempre Verde controle que se agruparam com o grupo estresse devido a maior contribuição da clorofila a, b e carotenóides. As variedades no tratamento estresse se agruparam em função das variáveis MDA e EE, enquanto que as variedades no grupo controle se agruparam em função do TRA, SPAD, carotenóides, clorofila a e b.

Além dos componentes principais, foi realizada a análise de correlação de Pearson com as características morfológicas (Tabela anexo 7) e fisiológicas (Tabela anexo 8). O tamanho das plantas, a massa de folhas, colmo e raiz se correlacionaram positivamente entre si. Assim como, a massa de cem grãos, produção, número de panículas, perfilhos e índice de colheita (IC) também se correlacionaram positivamente entre si. MURTHY et al. (2011) e KUMAR et al. (2014B) também já haviam observado correlação positiva entre essas variáveis. A esterelidade da espiguetta se correlacionou negativamente com a produção, massa de cem grãos e IC, como representado na Figura 11A. Com relação as características fisiológicas, o TRA se correlacionou negativamente com o extravasamento de eletrólitos e peroxidação lipídica. As clorofilas a, b e carotenóides mostraram altos valores de correlação

positiva e não se correlacionaram com o índice SPAD. A porcentagem de proteína no grão não se correlacionou com as demais variáveis analisadas.

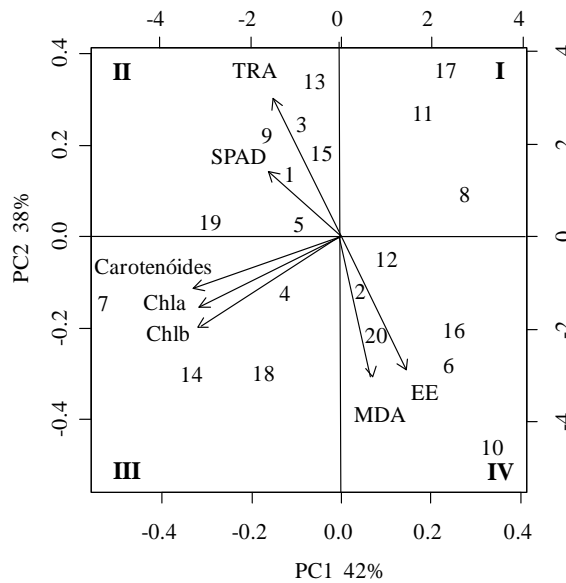
A

### Características morfológicas e componentes de produtividade



B

### Características fisiológicas



**Figura 11.** Análise de componentes principais baseado nas características morfológicas e componentes de produtividade (A) e características fisiológicas (B) em 10 variedades de arroz de sequeiro cultivadas em casa de vegetação e submetidas ao tratamento controle e estresse hídrico durante o período reprodutivo. 1, 2 - Bico Ganga Controle/Estresse.; 3, 4 - Catetão Controle/Estresse; 5, 6 - Manteiga Controle/Estresse; 7, 8 - Mira Controle/Estresse; 9, 10 - Palha Murcha Controle/Estresse; 11, 12 - Piauí Controle/Estresse; 13, 14 - Prata Ligeiro Controle/Estresse; 15, 16 - Quebra Cacho Controle/Estresse; 17, 18 - Sempre Verde Controle/Estresse e 19, 20 - Três Meses Controle/Estresse.

A partir dos resultados obtidos neste primeiro experimento foi possível selecionar as variedades Catetão e Piauí, como tolerantes, e as variedades Quebra Cacho e Mira, como sensíveis. Para identificar a possível relação da tolerância ao estresse hídrico com o desenvolvimento e morfologia do sistema radicular foram realizados mais dois experimentos. Estes experimentos tiveram a finalidade de selecionar apenas duas variedades contrastantes para prosseguimento da caracterização dos genótipos.

No experimento II, foi avaliado a massa seca de folha, colmo e raízes, o número de raízes nodais que atravessaram a peneira nas faixas de ângulos de 0-30°, 30-60°, 60-90° e a taxa de raízes profundas (TRP) nas variedades selecionadas em condição controle e estresse hídrico. A massa de folhas teve menor redução nas variedades Piauí (35%), seguido das variedades Mira (36%), Catetão (38%) e Quebra Cacho (52%) (Tabela 14). A massa de colmo também foi reduzida no tratamento sob estresse, no entanto a Mira apresentou a menor redução dessa variável (19%). A massa de raízes, principal objeto de estudo, foi menos afetada nas variedades Catetão (32%) e Piauí (38%) em relação as demais que reduziram em aproximadamente 60%. A razão raiz/PA aumentou apenas na variedade Catetão, o que representa um maior incremento em sistema radicular por essa variedade quando submetida ao estresse hídrico.

**Tabela 14.** Massa seca (g vaso<sup>-1</sup>) de folha, colmo e raiz e razão raiz parte aérea das variedades Catetão, Mira, Piauí e Quebra Cacho submetido a tratamento controle e estresse hídrico durante 14 dias.

Variedades	Folha		Colmo		Raízes		Raiz/PA	
	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.
Catetão	7,57aB	4,63bA	8,52aAB	4,55bA	14,62aBC	9,87bB	0,90bB	1,07aB
Mira	5,59aC	3,57bA	5,01aC	4,01aA	10,98aC	4,27bC	1,05aB	0,55bD
Piauí	7,03aB	4,54bA	7,30aB	4,49bA	26,68aA	16,34bA	1,86aA	1,82aA
Quebra Cacho	9,17aA	4,38bA	9,36aA	4,66bA	18,40aB	7,54bBC	0,98aB	0,83bC
C.V%	8,19		11,70		17,04		12,45	

<sup>a</sup> Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey  $p \leq 0,05$  de significância. Cont. = Controle; Est. = Estresse e P.A. = Parte aérea.

Na Figura 12, pode ser observada a biomassa de raízes produzidas pelas plantas no tratamento controle e estresse hídrico, além do volume de raízes nodais que atravessaram as peneiras nos intervalos de 0-30°; 30-60° e 60-90°. Todas as variedades apresentaram redução no volume de raízes quando submetidas ao tratamento de estresse hídrico durante 14 dias, no entanto essa redução foi menor nas variedades Catetão e Piauí. A variedade Mira além de produzir pouca biomassa no tratamento controle, quando transferida para o estresse apresentou poucas raízes capazes de ultrapassar a peneira. A Quebra Cacho apresentou um grande volume de raízes no tratamento controle, no entanto apresenta uma drástica redução quando transferida para o tratamento de estresse. Para quantificar esse resultado as raízes nodais que atravessaram cada faixa de ângulo foram contadas e a taxa de raízes profundas determinada.



**Figura 12.** Raízes das variedades de arroz Catetão, Mira, Piauí e Quebra Cacho que atravessaram as peneiras nos ângulos de 0-30°; 30-60° e 60-90° quando submetidas ao tratamento controle e estresse hídrico durante 14 dias.

No ângulo de 0-30°, no tratamento controle, as variedades Catetão, Mira e Piauí não diferiram entre si no número de raízes nodais (Tabela 15). Apenas a variedade Quebra Cacho apresentou reduzido número de raízes nesta condição. Quando as plantas foram transferidas para o tratamento de estresse observa-se que as variedades Catetão e Piauí apresentam pequena redução de raízes nesta classe de diâmetro, em torno de 38% e 27%, respectivamente, enquanto, Mira e Quebra Cacho mostraram uma redução de 74% e 45% respectivamente.

No ângulo de 30-60°, no tratamento controle, as variedades Piauí e Quebra Cacho mostraram maior quantidade de raízes, contudo em plantas submetidas ao estresse, resultado similar ao ângulo de 0-30° foi observado. As variedades Catetão e Piauí apresentaram maior número de raízes neste tratamento e, conseqüentemente, a redução do número de raízes em relação ao controle foi de apenas 32% e 40%, respectivamente, enquanto as variedades Mira e Quebra Cacho reduziram 63% e 66%, respectivamente. No ângulo de 60-90°, no tratamento controle, as variedades Catetão, Piauí e Quebra Cacho mostraram maior número de raízes

(Tabela 15), já no tratamento de estresse, a variedade Catetão se destacou por apresentar o maior número de raízes. A Piauí se manteve estável, enquanto que as variedades Mira e Quebra Cacho reduziram o número de raízes nesta faixa de ângulo sob estresse.

As variedades submetidas ao tratamento de estresse hídrico reduziram o número de raízes em quase todas as faixas de ângulos analisadas. Apenas a variedade Catetão apresentou aumento no número de raízes na faixa de 60-90° quando conduzida sob estresse. Além disso, a redução nas variedades Catetão e Piauí foi, significativamente, menor nas faixas de ângulo de 0-30° e 30-60°, em relação a Mira e Quebra Cacho. A partir deste resultado foi calculado a TRP que corresponde a razão entre o número de raízes na faixa de 60-90° pelo total de raízes em todas as faixas (UGA, 2012).

A TRP das variedades Catetão, Piauí e Quebra Cacho foi maior no tratamento controle. Para o tratamento estresse, as variedades Catetão e Piauí se destacaram com os maiores valores de TRP (Tabela 15). Ao analisar a taxa de mudança do tratamento controle em relação ao estresse observa-se que as variedades Catetão e Piauí aumentaram a TRP em 53% e 31%, respectivamente, enquanto as variedades Mira e Quebra Cacho reduziram em 11% e 24%, respectivamente. Este resultado é um indicativo de que as variedades Catetão e Piauí apresentam a característica de aprofundar o sistema radicular, enquanto Mira e Quebra Cacho reduzem o mesmo, mantendo-o mais superficial em condições de estresse hídrico.

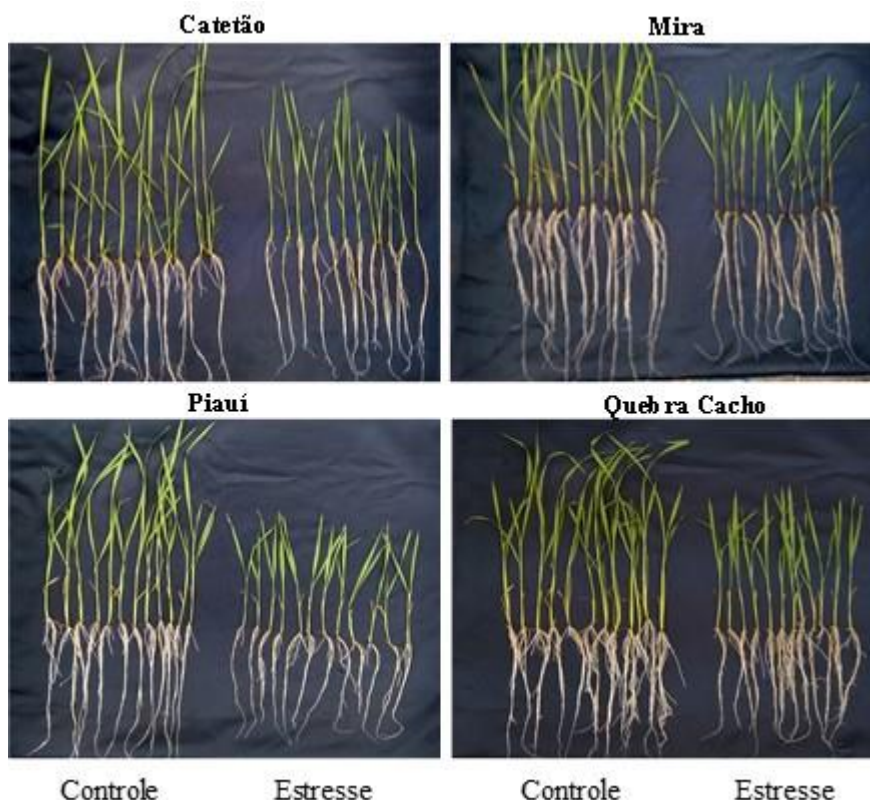
Um sistema radicular profundo tem sido considerado até agora como um dos mais promissores mecanismos de tolerância ao estresse, como observado para o genótipo de trigo SeriM82 que apresentou um sistema radicular mais compacto, no entanto com maior comprimento radicular em profundidade sob estresse (MANSCHADI et al., 2006). A avaliação do ângulo radicular como avaliado por KATO et al., 2006 e UGA et al., 2015 também tem se tornado uma importante característica capaz de identificar genótipos tolerantes ao estresse hídrico. Genótipos de arroz e milho que apresentaram raízes com menor ângulo em relação ao eixo principal mostraram maior produtividade sob condições de estresse hídrico no campo (UGA et al., 2011; ALI et al., 2015). Trabalho de KADAM et al. (2015), demonstraram como algumas variedades de arroz apresentam características morfológicas e fisiológicas interessantes que podem aumentar a tolerância, no entanto não apresentam plasticidade frente a um estresse hídrico. Em nosso trabalho, foi possível observar que o ângulo radicular possui uma resposta plástica em resposta a seca, similar ao observado para outras características morfológicas, como o aprofundamento do sistema radicular (RICH e WATT, 2013).

**Tabela 15.** Número de raízes que atravessaram a peneira nos ângulos de 0-30°; 30-60°, 60-90° e Taxa de Raízes Profundas (TRP) das variedades Catetão, Mira, Piauí e Quebra Cacho submetidas a tratamento controle e estresse hídrico durante 14 dias.

Variedades	0-30°		30-60°		60-90°		TRP %	
	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.
Catetão	27,0aA	16,7bAB	37,3aBC	25,3bA	26,0bAB	33,3aA	28,8bA	44,2aA
Mira	27,7aA	7,0bC	32,0aC	11,7bB	16,0aB	4,3bC	21,1aB	18,8aD
Piauí	31,3aA	22,7bA	49,0aAB	29,0bA	30,3aA	29,0aA	27,4bA	35,9aB
Quebra Cacho	17,7aB	9,7bBC	50,7aA	17,0bAB	29,7aA	8,0bB	30,3aA	23,1bC
C.V%	16,33		17,14		18,41		4,10	

<sup>a</sup> Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey  $p \leq 0,05$  de significância. Cont. = Controle e Est. = Estresse.

No terceiro experimento, realizado em câmara de crescimento, assim como no segundo experimento, as variedades mostraram redução de massa de parte aérea e raízes quando submetidas ao tratamento de estresse, como pode ser observado na Figura 13.



**Figura 13.** Parte aérea e raízes das variedades Catetão, Mira, Piauí e Quebra Cacho cultivadas em câmara de crescimento e submetidas a tratamento controle e estresse hídrico durante 14 dias.

Essa redução foi menor na parte aérea da variedade Catetão (51%), seguido das variedades Quebra Cacho (60%), Piauí (64%) e Mira (63%) (Tabela 16; Tabela anexo 9). Em relação a massa de raízes, a variedade Catetão apresentou redução de apenas 18%, enquanto as demais variedades reduziram em aproximadamente 50%. Apesar da massa de parte aérea e raiz serem marcadamente reduzidas no tratamento de estresse hídrico, foi observado um maior incremento da razão Raiz/PA nas variedades Catetão, Mira e Piauí. A maior razão Raiz/PA associada a raízes profundas, grossas, com habilidade de se ramificar e penetrar no perfil do solo são características interessantes envolvidas com o escape a seca (GOWDA et al., 2011).

**Tabela 16.** Massa seca ( $\text{g vaso}^{-1}$ ) de parte aérea, raízes e razão raiz parte aérea das variedades Catetão, Mira, Piauí e Quebra Cacho submetidas a tratamento controle e estresse hídrico (PEG 20%) durante 14 dias.

Variedades	Parte Aérea		Raízes		Raiz/PA	
	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.
Catetão	0,54aB	0,26bA	0,23aC	0,15bA	0,43bA	0,58aA
Mira	0,53aB	0,19bA	0,22aB	0,10bA	0,41bA	0,55aA
Piauí	0,66aA	0,24bA	0,22aAB	0,10bA	0,33bA	0,43aB
Quebra Cacho	0,70aA	0,28bA	0,27aA	0,13bA	0,39aA	0,46aB
C.V%	13,16		14,07		12,39	

<sup>a</sup> Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey  $p \leq 0,05$  de significância. Cont. = Controle; Est. = Estresse e PA = Parte aérea.

O sistema radicular das variedades foi armazenado e posteriormente analisado para determinação dos parâmetros radiculares utilizando-se o programa RootGraph (CAI et al., 2015). Este programa permite separar os parâmetros radiculares de volume, área superficial, comprimento e espessura nas raízes primárias e raízes laterais. Dessa forma, reduz-se a possibilidade de erros com uma caracterização mais detalhada e precisa.

Foram determinados os parâmetros de volume, área superficial, comprimento e espessura para as raízes primárias e laterais, além do número de pontas presentes nas raízes laterais. A determinação destes parâmetros tem sido de fundamental importância para quantificar o tamanho do sistema radicular e assim avaliar a capacidade de absorção de água e nutrientes pelas plantas (KANO et al., 2011).

Em relação as raízes primárias, foi observada acentuada redução dos parâmetros radiculares quando as variedades foram submetidas ao estresse hídrico, exceto para o comprimento em que as variedades Catetão e Piauí mantiveram constante o seu comprimento (Tabela 17). Para as raízes laterais, também foi observado acentuada redução do volume, área superficial e comprimento nas variedades Mira e Quebra Cacho, enquanto que para as variedades Catetão e Piauí essa redução foi proporcionalmente menor. Com relação ao número de pontas, foi observado um incremento na variedade Catetão no tratamento de estresse hídrico, a variedade Piauí não sofreu alterações, enquanto as demais apresentaram redução deste parâmetro.

A biomassa radicular tem sido relacionada como um parâmetro de importância em plantas com maior tolerância ao estresse hídrico (COMAS et al., 2013). No entanto, nem sempre o aumento ou manutenção da biomassa radicular está diretamente correlacionado com a tolerância ao déficit hídrico, devido ao seu alto custo energético. Um sistema radicular mais compacto, porém, com raízes mais finas, e em profundidade, pode contribuir de forma mais eficiente para o mecanismo de escape a seca do que a manutenção de uma grande biomassa radicular em camadas mais superficiais do solo (MANSCHADI et al., 2006).

Trabalhos prévios sugerem que o aumento da emissão de raízes laterais e pelos radiculares podem ser considerados como características importantes para a tolerância a seca (GOWDA et al., 2011; COMAS et al., 2014). Trabalhos utilizando plantas transformadas também têm demonstrado como esses atributos radiculares são fundamentais para o aumento da tolerância ao estresse hídrico em arroz (WERNER et al., 2010; REDILLAS et al., 2012).

Com relação à espessura do sistema radicular, as raízes mais grossas (1 a 2 mm) podem contribuir com a maior absorção de água por apresentar vasos do xilema de maior diâmetro e menor resistência axial, contribuindo assim para a absorção de água, especialmente de camadas profundas do solo em que a água esteja amplamente disponível



(PASSIOURA, 1982; YAMBAO et al., 1992). No entanto, vasos do xilema de menor diâmetro em raízes seminais são de fundamental importância para explorar regiões com baixa disponibilidade de água para uso durante a maturação da cultura (PANDEY et al., 2015).

**Tabela 17.** Parâmetros radiculares das variedades Catetão, Mira, Piauí e Quebra Cacho submetidas a tratamento controle e estresse hídrico (PEG 20%) durante 14 dias.

Raízes nodais										
Variedades	Volume (cm <sup>3</sup> )		Área S. (cm <sup>2</sup> )		Comprimento (cm)		Espessura (cm)			
	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.		
Catetão	1,40aB	0,76bA	64,20aB	47,59bAB	312,16aB	313,94aA	0,06aB	0,05bA		
Mira	1,02aC	0,53bB	66,94aB	42,14bB	373,57aA	257,07bB	0,06aB	0,05bA		
Piauí	1,36aB	0,68bA	61,95aB	51,70bA	307,52aB	295,68aA	0,05aC	0,05aA		
Quebra Cacho	1,58aA	0,69bA	85,49aA	48,39bAB	400,40aA	295,85bA	0,07aA	0,05bA		
C.V%	5,61		6,44		5,72		6,94			
Raízes laterais										
Variedade	Volume (cm <sup>3</sup> )		Área S. (cm <sup>2</sup> )		Comprimento (cm)		Pontas		Espessura (cm)	
	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.
Catetão	0,16aB	0,11bB	34,75aB	32,48aA	653,62aB	547,53bB	1722,33bB	1903,00aA	0,04aB	0,02bA
Mira	0,11aC	0,07bC	31,16aB	23,72bB	580,35aC	340,75bC	1417,33aC	1284,33bC	0,03aC	0,02bA
Piauí	0,15aB	0,13bAB	31,02aB	29,55aA	579,00aC	504,46bB	1757,67aB	1628,33aB	0,04aB	0,02bA
Quebra Cacho	0,20aA	0,14bA	43,30aA	32,33bA	856,14aA	646,63bA	2148,67aA	1362,67bC	0,05aA	0,02bA
C.V%	9,67		9,20		9,76		6,67		11,40	

<sup>a</sup> Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey  $p \leq 0,05$  de significância. Cont. Controle; Est. Estresse; Área. S. = Área Superficial. N. repetições = 4.

Os resultados obtidos nesses dois últimos experimentos foram fundamentais para estabelecer uma correlação entre a tolerância ao estresse hídrico e o desenvolvimento do sistema radicular, visto que a tolerância pode estar ligada a diversos fatores, como mencionado na revisão bibliográfica, e neste trabalho deseja-se focar na identificação de genes envolvidos com a tolerância ao estresse hídrico no sistema radicular. Dessa forma, as variedades que se mostraram com resultados mais promissores, tanto no tratamento com estresse induzido por PEG, quanto no tratamento induzido por déficit de irrigação em solo foram Catetão, variedade tolerante, e Mira, variedade sensível.

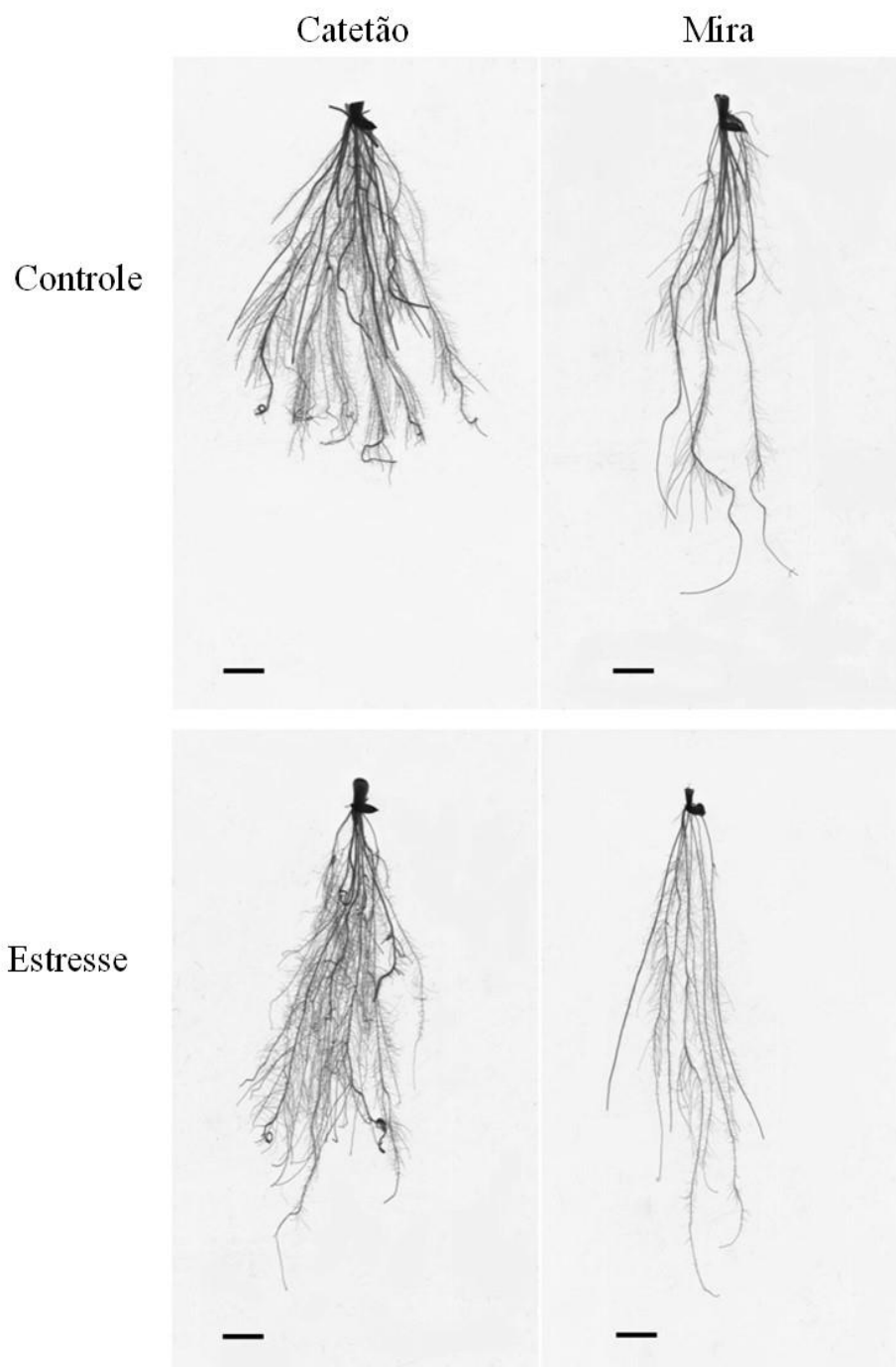
#### 4.2 Avaliação da Morfologia Radicular e Expressão de Genes Relacionados a Tolerância ao Estresse Hídrico

Esta segunda etapa do trabalho foi desenvolvida no *Root Development Laboratory – VIB (Ghent University)* sob a supervisão do professor Tom Beeckman. Como o objetivo final do trabalho era a análise de RNaseq entre duas variedades de arroz contrastantes quanto a tolerância ao estresse hídrico, surgiu a necessidade de se realizar mais três experimentos. Os experimentos tiveram como objetivos avaliar os parâmetros radiculares e anatômicos nas duas variedades de arroz selecionadas, avaliar a expressão de genes relacionados a tolerância ao longo do tempo de exposição ao estresse e a análise do transcriptoma por meio da técnica de RNaseq.

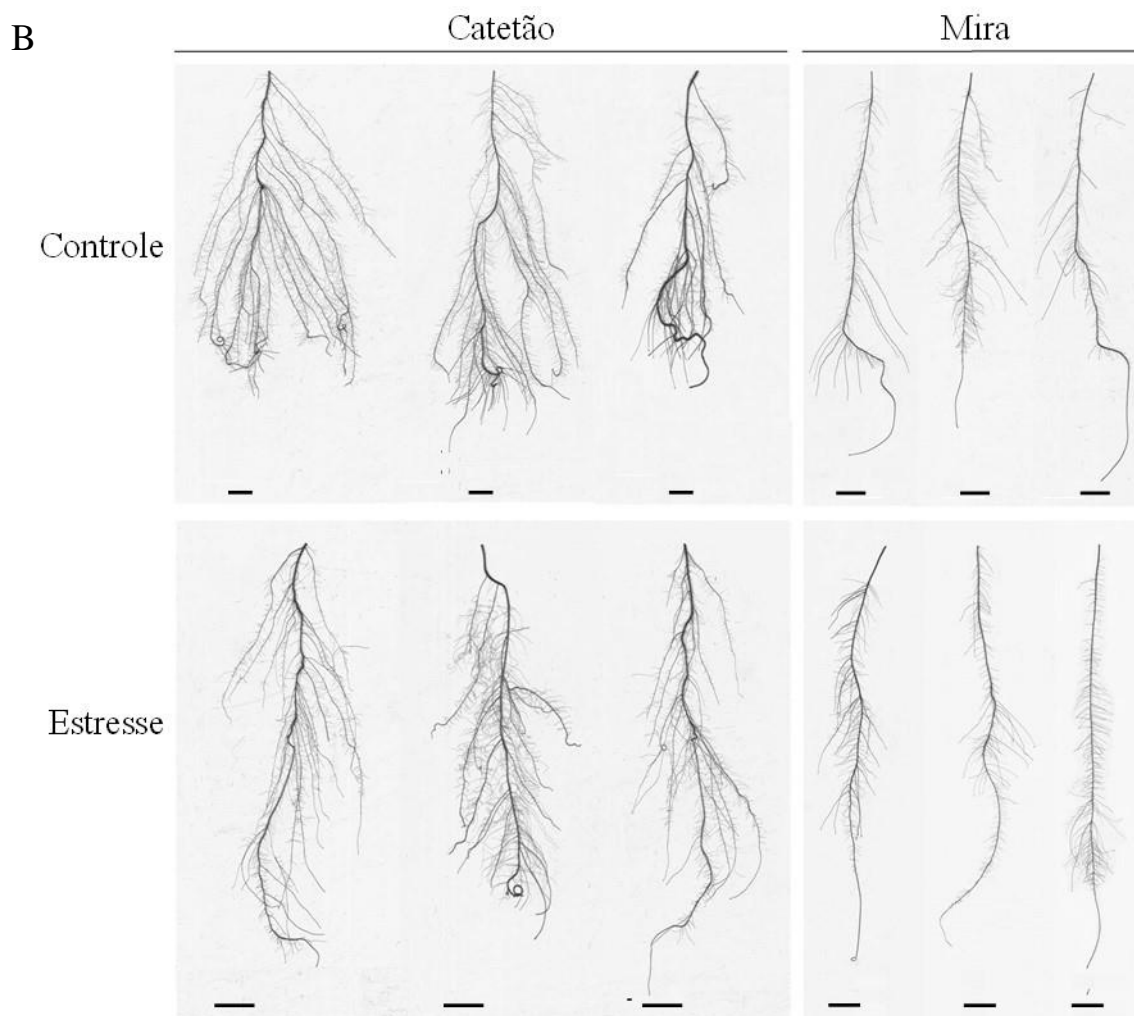
Na Figura 14, é possível observar as diferenças na morfologia do sistema radicular das variedades Catetão e Mira após 7 dias de tratamento no controle ou estresse hídrico. Apesar

da redução de biomassa observada em ambas as variedades, a Catetão se mostra mais estável e com pequena redução no número de ramificações quando submetida ao estresse, enquanto a Mira reduz, consideravelmente, este parâmetro.

A



(Continua)



**Figura 14. Continuação.** Raízes íntegras (A) e raízes nodais com laterais (B), evidenciando as diferenças morfológicas das variedades Catetão e Mira após submissão a tratamento controle e estresse hídrico durante 7 dias utilizando 20% de PEG. Barras representam 1 cm. Raízes nodais de três repetições de plantas.

Os parâmetros radiculares de volume, área superficial, comprimento, espessura e número de pontas foram novamente determinados nas raízes nodais e laterais das variedades Catetão e Mira submetidas a tratamento controle e estresse hídrico durante 7 dias (Tabela 18). O tratamento de estresse reduziu o crescimento do sistema radicular e, conseqüentemente, houve uma redução de quase todos os parâmetros avaliados em ambas as variedades.

Apesar da redução de crescimento, é possível observar que em relação às raízes nodais, a variedade Catetão mostrou maior volume, área superficial e comprimento quando comparada a Mira no tratamento de estresse hídrico (Tabela 18). Além disso, observa-se que o percentual de redução desses parâmetros é menor na Catetão o que indica a sua maior estabilidade em condição de estresse. O volume de raízes nodais na Catetão é superior ao dobro do volume de raízes na variedade Mira em condição de estresse (Tabela 18).

Para as raízes laterais também foi observado que a variedade Catetão é mais estável quando submetida ao tratamento de estresse hídrico apresentando pequena redução dos parâmetros avaliados. Além disso, foi possível observar diferença de comportamento na variedade Catetão e Mira em relação ao número de pontas que representa as ramificações totais das raízes. A Catetão aumentou o número de pontas, enquanto a Mira reduziu em

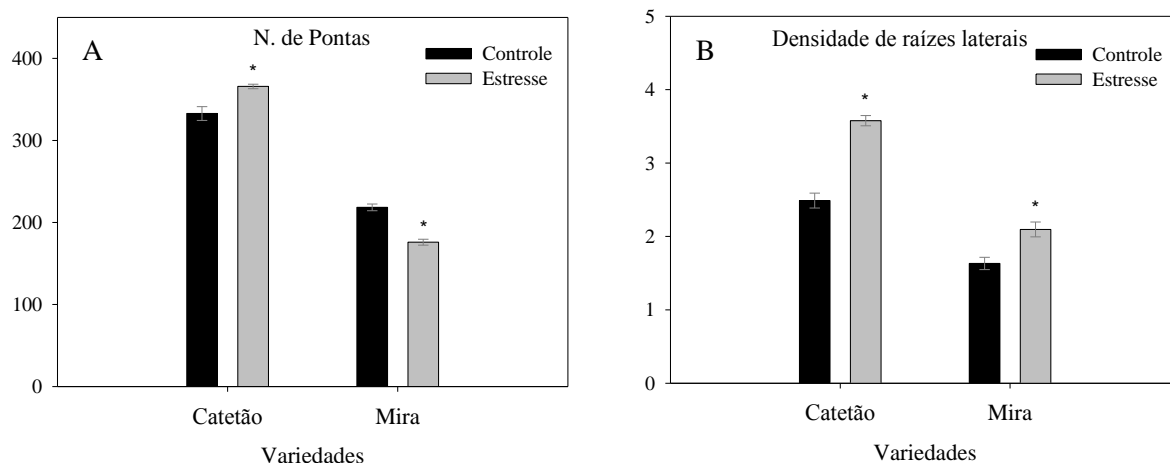
resposta ao estresse hídrico. Este resultado corrobora o encontrado no experimento anterior de aumento do número de pontas em resposta ao estresse hídrico na variedade tolerante. Este comportamento indica uma capacidade adaptativa da Catetão em resposta ao déficit hídrico que pode resultar em maior volume de solo explorado e, conseqüentemente, maior capacidade de absorção de água e nutrientes.

**Tabela 18.** Parâmetros radiculares das raízes primárias e raízes laterais das variedades Catetão e Mira submetidas a tratamento controle e estresse hídrico durante 7 dias utilizando 20% de PEG.

Raízes nodais										
Variedades	Volume (cm <sup>3</sup> )		Área S. (cm <sup>2</sup> )		Comprimento (cm)		Espessura (cm)			
	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.		
Catetão	0,53aA	0,30bA	28,00aA	17,21bA	136,32aA	102,78bA	0,13aA	0,05bA		
Mira	0,37aB	0,14bB	24,08aB	12,07bB	138,98aA	86,39bB	0,11aB	0,05bA		
C.V%	23,12		18,11		16,98		16,69			
Raízes laterais										
Variedade	Volume (cm <sup>3</sup> )		Área S. (cm <sup>2</sup> )		Comprimento (cm)		Pontas		Espessura (cm)	
	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.
Catetão	0,13aA	0,09bA	22,99aA	17,13bA	393,43aA	310,65bA	332,78bA	365,83aA	0,04aA	0,02bA
Mira	0,05aB	0,03bB	9,85aB	6,52bB	183,27aB	120,12bB	218,39aB	175,94bB	0,04aA	0,02bA
C.V%	16,59		14,42		18,00		8,11		15,73	

<sup>a</sup> Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey  $p \leq 0,05$  de significância. Cont. = Controle e Est. = Estresse. N. repetições = 18

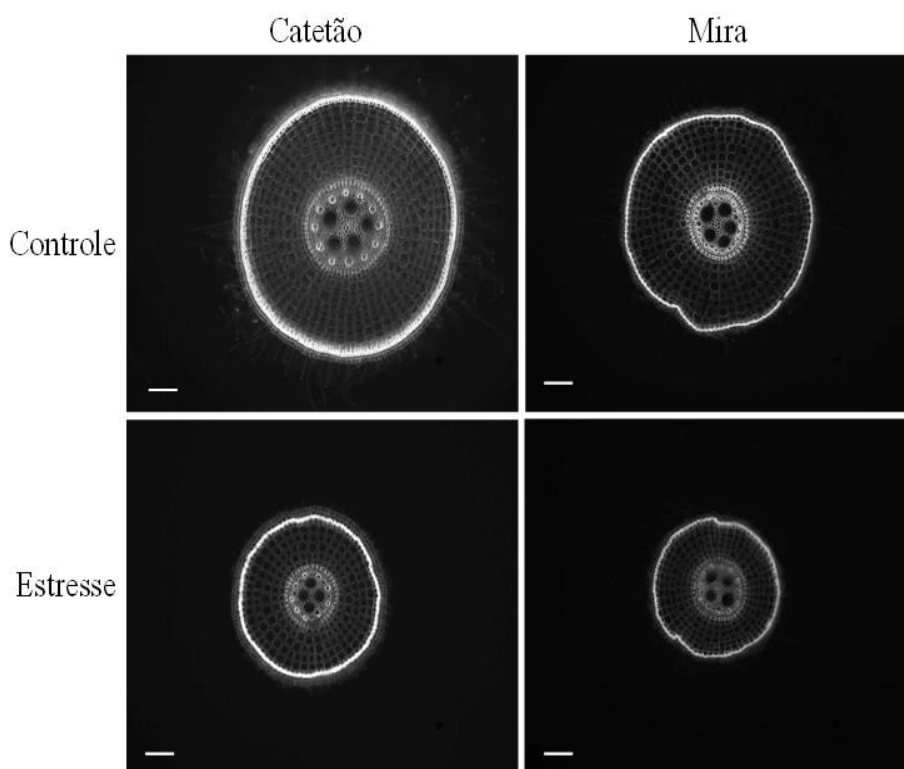
A Figura 15 enfatiza a diferença observada para número de pontas na variedade Catetão e Mira submetidas ao tratamento controle e estresse hídrico. A variedade Catetão por si apresenta maior número de ramificações no tratamento controle e aumenta o número de pontas quando submetidas ao estresse, enquanto Mira demonstra comportamento contrário. A densidade de raízes laterais, representada pela razão entre o número de pontas pelo comprimento total das raízes, aumentou em ambas as variedades. No entanto, este aumento é, consideravelmente, maior na Catetão.



**Figura 15.** Número total de pontas (A) e densidade de raízes laterais (B) representado pela razão entre pontas/comprimento das variedades Catetão e Mira submetidas a tratamento controle e estresse hídrico durante 7 dias utilizando 20% de PEG.

O aumento do conhecimento sobre os atributos radiculares que podem afetar a absorção de água sob estresse pode ajudar os melhoristas a elucidar as interações genótipo versus meio ambiente e apontar para importantes características relacionadas a resistência a seca (SERRAJ et al., 2011). Dentre os atributos radiculares, a anatomia poderia explicar, em partes, diferenças na absorção de água por variedades tolerantes submetidas ao estresse hídrico (HENRY et al, 2012).

Para a determinação dos parâmetros anatômicos foram retirados fragmentos próximos das pontas e do terço médio de três raízes primárias. As imagens obtidas dos cortes transversais das pontas das raízes revelam como o estresse hídrico afeta o desenvolvimento normal das diferentes camadas de células, causando redução da área radicular, tamanho das células e número de metaxilemas em ambas as variedades (Figura 16). No entanto, é possível observar que a variedade Catetão apresenta área radicular ligeiramente maior que a Mira quando submetida ao estresse. Para quantificar estes parâmetros foi utilizado o programa PHIV-RootCell (LARTAUD et al., 2014).



**Figura 16.** Corte transversal retirado a 5,0 mm acima da ponta de uma raiz primária evidenciando as diferenças anatômicas das variedades de arroz Catetão e Mira após 7 dias de estresse hídrico utilizando 20% de PEG ou controle. Barras representam 100  $\mu$ m. Imagens foram obtidas utilizando o microscópio Axiovert 200 M.

Foi possível observar uma marcante redução dos parâmetros analisados em ambas as variedades quando transferidas para o estresse hídrico (Tabela 19). A área radicular, do córtex e do estelo foram, de fato, maior para a Catetão quando comparado a Mira no tratamento de estresse. Por outro lado, quando se analisa a proporção de redução destes parâmetros no controle em relação ao estresse verifica-se que a redução foi muito similar para ambas as variedades. Dessa maneira, não é possível concluir que a variedade Catetão apresenta resultado diferenciado de parâmetros anatômicos em relação à Mira quando submetida ao

estresse. O número de células em cada camada também reduziu no estresse hídrico e não foram observadas diferenças significativas entre as variedades.

**Tabela 19.** Parâmetros anatômicos determinados a partir de 0,5cm das pontas nas variedades Catetão e Mira submetidas a tratamento controle e estresse hídrico durante 7 dias utilizando 20% de PEG.

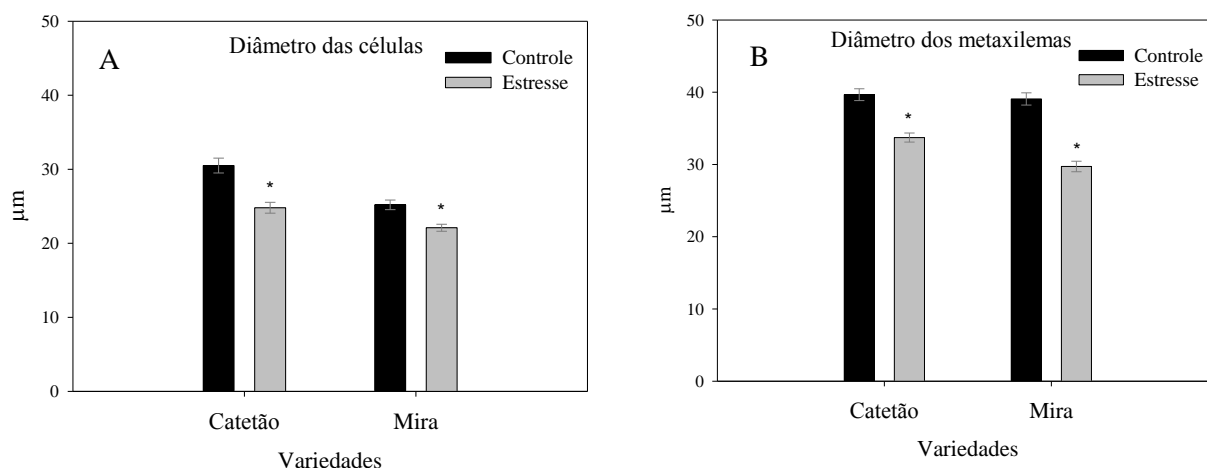
Variedades	Área radicular		Área do córtex		Área do estelo		C. do córtex	
	-----µm <sup>2</sup> -----							
	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.
Catetão	3882,62aA	2225,02bA	3161,69aA	1694,32bA	423,05aA	275,34bA	13,2aA	8,5bA
Mira	2801,08aB	1512,33bB	1959,15aB	1197,62bB	221,90aB	127,05bB	10,7aB	7,8bA
C.V%	24,16		26,41		23,84		15,00	

Variedade	N. Cel. Endo.		N. Cel. Cortex 1		N. Cel. Exod.		N. Cel. Epid.	
	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.
Catetão	72,0aA	53,3bA	77,7aA	60,2bA	129,6aA	119,4aA	132,9aA	136,3aA
Mira	68,2aA	54,5bA	69,3aB	57,7bA	128,7aA	108,1bA	128,1aA	119,8aA
C.V%	14,32		16,84		14,99		12,37	

<sup>a</sup> Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey  $p \leq 0,05$  de significância. Cont. = Controle e Est. = Estresse; N. Cel. Endo. = Número de células na endoderme; N. Cel. Cortex 1 = Número de células na primeira camada do córtex; N. Cel. Exod. = Número de células na exoderme; N. Cel. Epid. = Número de células na epiderme; C = camadas; N. repetições = 4.

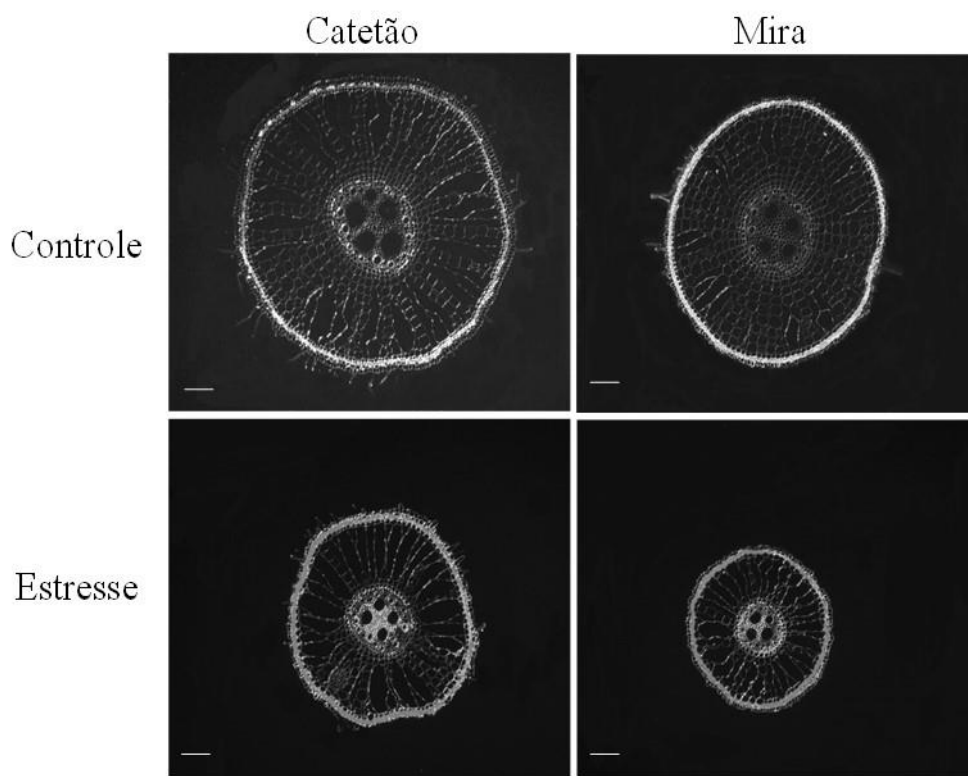
O diâmetro das células do córtex e o diâmetro dos metaxilemas foram reduzidos em ambas as variedades no tratamento de estresse hídrico (Figura 17A e B). A proporção de redução foi muito similar no que diz respeito ao diâmetro das células em ambas as variedades. Com relação ao diâmetro dos metaxilemas, observou-se que a redução foi significativamente menor para a Catetão.



**Figura 17.** Diâmetro das células do córtex (A) e diâmetro dos metaxilemas (B) obtidos das variedades Catetão e Mira submetidas a tratamento controle e estresse hídrico durante 7 dias utilizando 20% de PEG.

As imagens obtidas a partir do terço médio das raízes mostram resultado similar ao observado para as pontas. A área radicular e o número de metaxilemas reduziram em ambas as variedades submetidas ao estresse hídrico (Figura 18). Essa modificação anatômica,

geralmente, está associada apenas a variedade tolerante para reduzir o risco de cavitação dos vasos do xilema (HENRY et al., 2012).



**Figura 18.** Corte transversal retirado do terço médio das variedades Catetão e Mira após 7 dias de estresse hídrico utilizando 20% de PEG ou controle. Os fragmentos foram retirados de aproximadamente 80 mm para o tratamento sob estresse hídrico e 5,0 cm para o tratamento controle (uma vez que as raízes no tratamento de estresse hídrico são mais longas do que no tratamento controle).

Os parâmetros anatômicos no terço médio também foram reduzidos em ambas as variedades quando transferidas para o estresse hídrico (Tabela 20). As diferenças estatísticas observadas para área radicular, área do córtex e estelo não se traduzem em um efeito positivo para a variedade Catetão, visto que ambas as variedades reduziram proporcionalmente os seus parâmetros anatômicos quando submetidas ao estresse. Os resultados mostram que o estresse hídrico afetou a anatomia do sistema radicular de maneira similar para as duas variedades e pode-se concluir que a tolerância observada pela variedade Catetão não está diretamente ligada a uma modificação dos parâmetros anatômicos analisados.

KADAM et al. (2014) avaliaram a plasticidade do sistema radicular de variedades arroz e trigo submetidos ao estresse hídrico. Variedades de trigo apresentaram variações em relação ao diâmetro das raízes, estelo e metaxilemas em diferentes posições ao longo da raiz nodal que facilitaram o eficiente uso da água disponível, enquanto que as variedades de arroz apresentaram estratégia de rápida absorção de água por meio de raízes mais finas.

Trabalho realizado por MOSTAJERAN e RAHIMI-EICHI, (2008) demonstrou que a variedade de arroz Zayande Rood apresenta parâmetros anatômicos que podem contribuir para a sua maior tolerância ao estresse hídrico relacionado à espessura das paredes celulares, endoderme e exoderme. Trabalho de HENRY et al. (2012), observaram que variedades de arroz tolerantes apresentam decréscimo da suberização e compactação de células da camada

de esclerênquima, enquanto que a suberização da endoderme aumentou. Este resultado sugere o papel diferencial destas camadas de células na retenção de oxigênio sob condições de alagamento (camada de esclerênquima) e retenção de água sob seca (endoderme).

Em outro estudo uma variedade de arroz apresentou vasos do xilema ampliados e redução na formação de aerênquimas quando submetida ao estresse hídrico (SINGH e SINGH, 2013). YAMBAO et al. (1992) já haviam indicado a utilização da espessura radicular como um índice de seleção para o tamanho do xilema. No entanto, a seleção de variedades com maior diâmetro do xilema deve ser feita com cautela, já que nem sempre a resistência axial é um importante fator envolvido na resistência a seca. JEONG et al. (2010), também mostraram a existência de correlação entre a tolerância ao estresse hídrico e a espessura radicular.

Em outros trabalhos, a redução no número e diâmetro de metaxilemas tem sido relatada como característica marcante de variedades tolerantes (HENRY et al., 2011; LIMA et al., 2015). Em milho, genótipos que apresentaram maior formação de aerênquimas nas raízes mostraram menor respiração radicular, aumento da densidade radicular e aumento da biomassa da parte aérea sob estresse quando comparado com genótipos com menos aerênquimas (ZHU et al., 2010).

Acredita-se que estas modificações devem estar aliadas a uma ou mais características como redução da abertura estomática, enrolamento foliar, acúmulo de osmólitos compatíveis e crescimento radicular em profundidade para que a planta possa ser de fato considerada tolerante ao estresse hídrico. Em nosso trabalho não foi possível estabelecer uma relação entre a morfologia radicular observada e a anatomia em variedades de arroz submetidas ao estresse hídrico. No entanto, alguns parâmetros precisam ser mais bem investigados como a produção de aerênquimas e a suberização da exoderme e endoderme em diferentes partes do sistema radicular.

**Tabela 20.** Parâmetros anatômicos determinados a partir do terço médio nas variedades Catetão e Mira submetidas a tratamento controle e estresse hídrico durante 7 dias utilizando 20% de PEG.

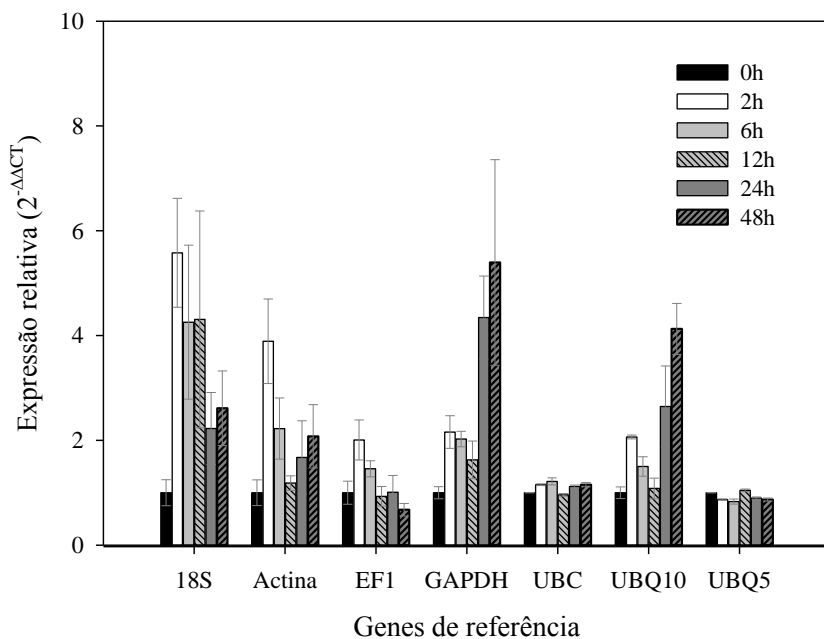
Variedades	Área radicular		Área do córtex		Área do estelo		C. do córtex	
	-----µm <sup>2</sup> -----							
	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.
Catetão	6334,99aA	3560,03bA	4742,54aA	2541,48bA	659,58aA	337,02bA	15,7aA	10,7bA
Mira	4481,72aB	2419,73bB	2855,39aB	1796,44bB	413,02aB	191,42bB	12,8aB	9,5bA
C.V%	21,58		25,86		20,52		12,53	
Variedade	N. Cel. Endo.		N. Cel. Exod.		N. Cel. Epid.		D. Metaxilemas	
	-----							
	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.
Catetão	87,8aA	68,2bA	152,5aA	142,7bA	158,7aA	157,2aA	59,6aA	39,7bA
Mira	83,2aA	69,5bA	152,8aA	130,5bA	151,9aA	145,6aA	49,1aB	32,1bB
C.V%	11,54		11,26		17,72		15,52	

<sup>a</sup> Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey  $p \leq 0,05$  de significância. Cont. = Controle e Est. = Estresse; N. Cel. Endo. = Número de células na endoderme; N. Cel. Cortex 1 = Número de células na primeira camada do córtex; N. Cel. Exod. = Número de células na exoderme; N. Cel. Epid. = Número de células na epiderme; C = camadas; D = diâmetro; N. repetições = 4.

Para a análise de expressão dos fatores de transcrição e demais genes envolvidos com a tolerância ao estresse hídrico, foi realizado um teste para selecionar dois genes de referência



estáveis. Os genes de referência 18S, Actina, EF1, GAPDH, UBC, UBQ10 e UBQ5 foram analisados nos tempos de coleta de 0, 2, 6, 12, 24 e 48h após a aplicação do estresse hídrico (Figura 19). O tempo 0h foi utilizado como controle. Os genes de referência UBC e UBQ5 foram selecionados como os mais estáveis para serem utilizados como controles endógenos deste experimento (Figura anexo 3). Os demais genes não foram utilizados nas análises.

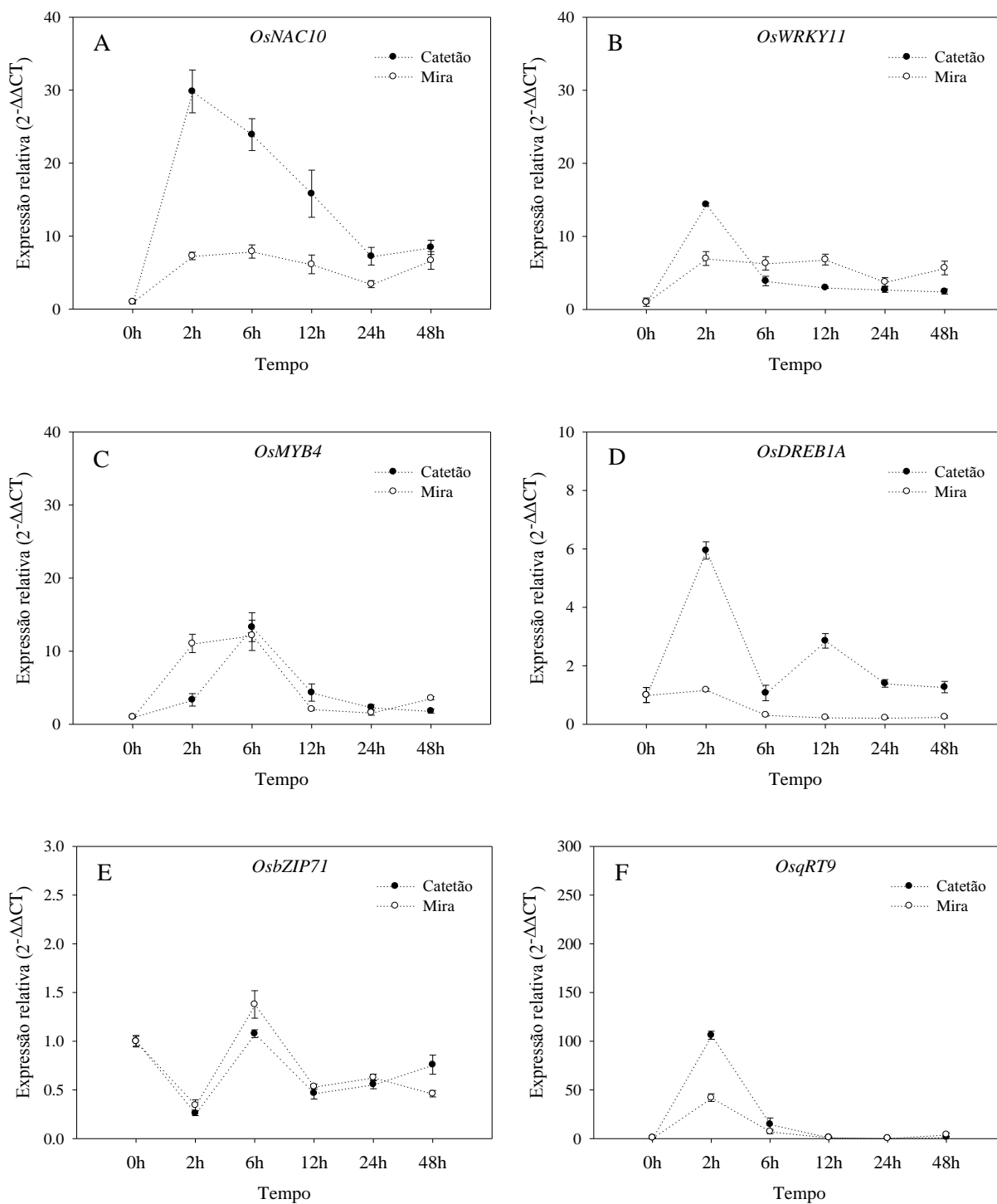


**Figura 19.** Expressão relativa de genes utilizados como controle endógeno em arroz nas variedades Catetão e Mira. Coletas foram realizadas às 0, 2, 6, 12, 24 e 48h após a aplicação de 20% de PEG. Os valores no tempo 0 foram utilizados como referência (n = 4).

A Figura 20 ilustra a expressão dos fatores de transcrição relacionados à tolerância ao estresse hídrico ao longo dos tempos de coleta. A variedade Catetão apresentou expressão, marcadamente, superior a Mira para os fatores *OsNAC10*, *OsWRKY11*, *OsDREB1A* e *OsqRT9*. Os altos níveis de expressão foram observados, principalmente, às 2h nesta variedade indicando uma resposta rápida da planta para ativação de genes de defesa. Para os genes *OsMYB4* e *OsZIP71* o pico de expressão ocorreu às 6h (Figura 20). A Mira apresentou expressão superior a Catetão às 2h para o *OsMYB4*, no entanto a partir das 6h as duas variedades apresentaram o mesmo padrão de expressão. A expressão do *OsZIP71* variou de forma silimar para ambas as variedades.

Os genes que apresentaram maior alteração quando submetidos ao estresse hídrico foram plotados em apenas um gráfico para observação dos tempos de maior indução. De acordo com a Figura anexo 4, o agrupamento da expressão gênica permitiu identificar os tempos de 2 e 6h como os mais induzidos pelo estresse hídrico em ambas as variedades.

Fatores de transcrição regulam a expressão de diversos genes que desencadeiam a ativação de um complexo mecanismo adaptativo e, conseqüentemente, representam principais alvos moleculares para a melhoria das culturas contra estresses bióticos e abióticos (KHONG et al., 2008). Diversos trabalhos têm mostrado os avanços adquiridos com o uso de FTs para o aumento da tolerância ao estresse hídrico em arroz, como observado para o *OsDREB1A* (DUBOUZET et al., 2003), *OsWRKY11* (WU et al., 2009), *OsNAC10* (JEONG et al., 2010), *OsZIP71* (LIU et al., 2014) e *OsqRT9* (LI et al., 2015).



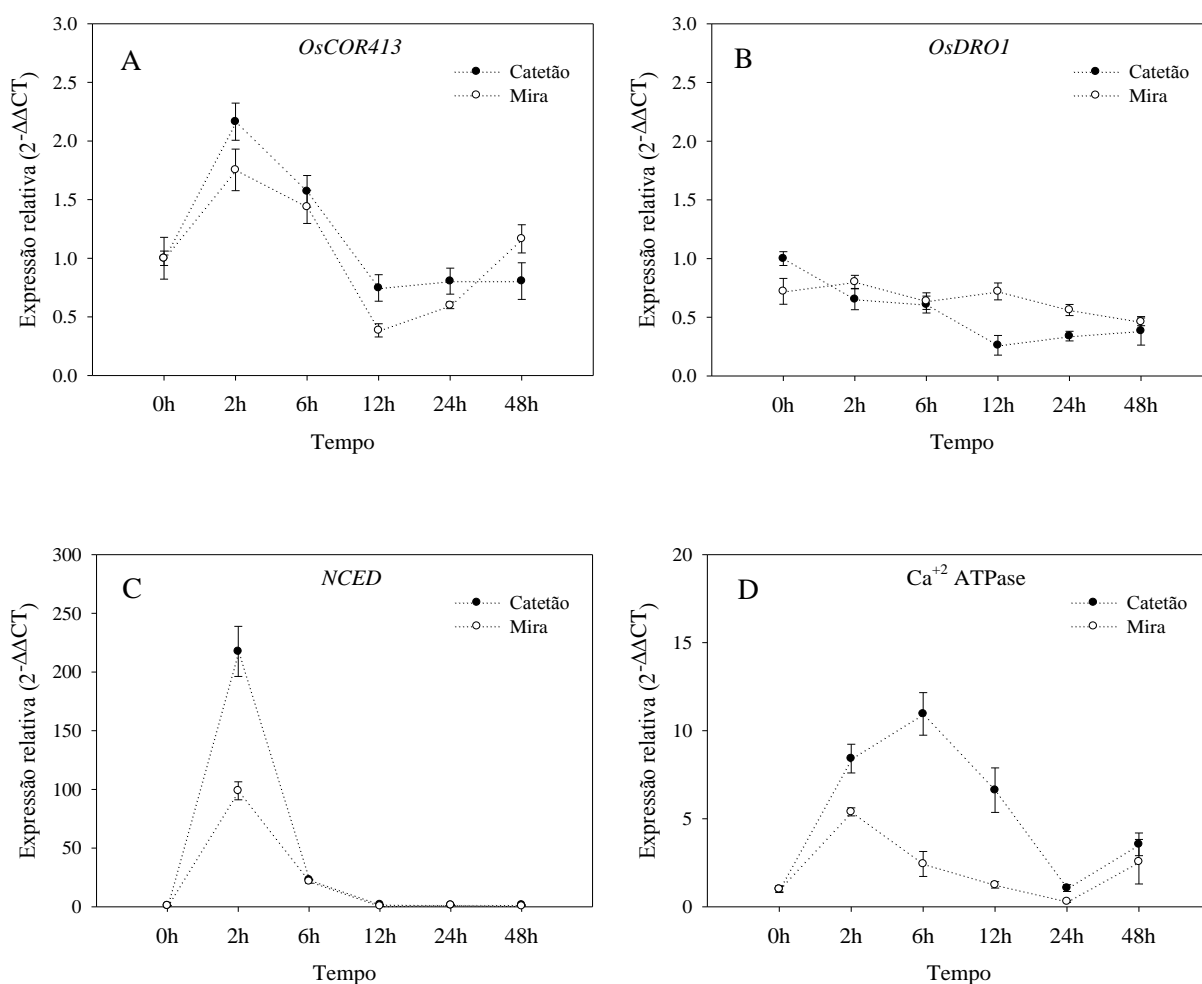
**Figura 20.** Expressão relativa de fatores de transcrição das famílias NAC, ZF, MYB, AREB/ABF, AP2/ERF representado pelos genes *OsNAC10* (A), *OsWRKY11* (B), *OsMYB4* (C), *OsDREB1A* (D), *OsbZIP71* (E) e *OsqRT9* (F) nas raízes das variedades Catetão e Mira. Coletas foram realizadas às 0, 2, 6, 12, 24 e 48h após a aplicação de 20% de PEG. Valores representam a razão entre o controle e estresse dentro de cada tempo (n = 4). Os genes da UBC e da UBQ5 foram utilizados como controle endógeno.

A superexpressão desses FTs estão relacionados com a indução de genes responsivos a estresses abióticos como mostrado em DUBOUZET et al. (2003) e WU et al. (2009). Além disso, o aumento de expressão de alguns desses FTs, como o *OsNAC10* e *OsqRT9* está relacionado a modificações na arquitetura radicular que beneficiam as plantas ao aumentar a possibilidade de escape frente a um estresse hídrico.

A expressão do gene *OsCOR413* apresentou a mesma tendência nas duas variedades avaliadas (Figura 21A). No entanto, é possível observar que a Catetão apresentou maior expressão desse gene, principalmente, às 2h. Este resultado corrobora o observado por BRETON et al. (2003) de aumento da expressão desse gene induzido por seca. A expressão do *OsDRO1* foi bastante similar nas duas variedades ao longo do tempo (Figura 21B). Como a variedade Catetão apresentou a maior taxa de raízes profundas sob estresse hídrico (Tabela 14) esperava-se observar diferenças na expressão desse gene entre as variedades, uma vez que ele está envolvido no aprofundamento do sistema radicular (UGA et al., 2013). No entanto, sabe-se que o crescimento radicular em profundidade é uma característica complexa em que diversos genes podem estar envolvidos, e não somente o *OsDRO1* (ARAKI et al., 2002).

Já para o gene *NCED* e a  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPase (Figura 21C e D) foi observada alta expressão na variedade Catetão às 2 e 6h após a aplicação do estresse hídrico. Trabalho de JEONG et al. (2010) observaram que a superexpressão do *OsNAC10* induziu a expressão do gene *NCED* em arroz que pode ter contribuído para a obtenção de plantas mais tolerantes ao estresse hídrico. REDILLAS et al. (2009) também observaram aumento na expressão de *NCED* e  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPase em plantas de arroz superexpressando o *OsNAC9*. A maior expressão desses genes pode estar relacionada a eventos de sinalização mediados por ABA e  $\text{Ca}^{+2}$  em resposta ao estresse hídrico.

A expressão dos genes *OsNAC10*, *OsqRT9* e *OsCa<sup>+2</sup>-ATPase* tem sido associada a modificações na anatomia e arquitetura radicular que podem contribuir para um melhor desempenho das plantas frente a um estresse abiótico (REDILLAS et al., 2009; JEONG et al., 2010; LI et al., 2015). Nós sugerimos que a alta expressão desses genes está associada a formação de um sistema radicular mais ramificado na Catetão em condição de estresse hídrico. No entanto, a anatomia radicular destas plantas precisa ser mais bem investigada para estudar a sua possível correlação com a expressão desses genes.

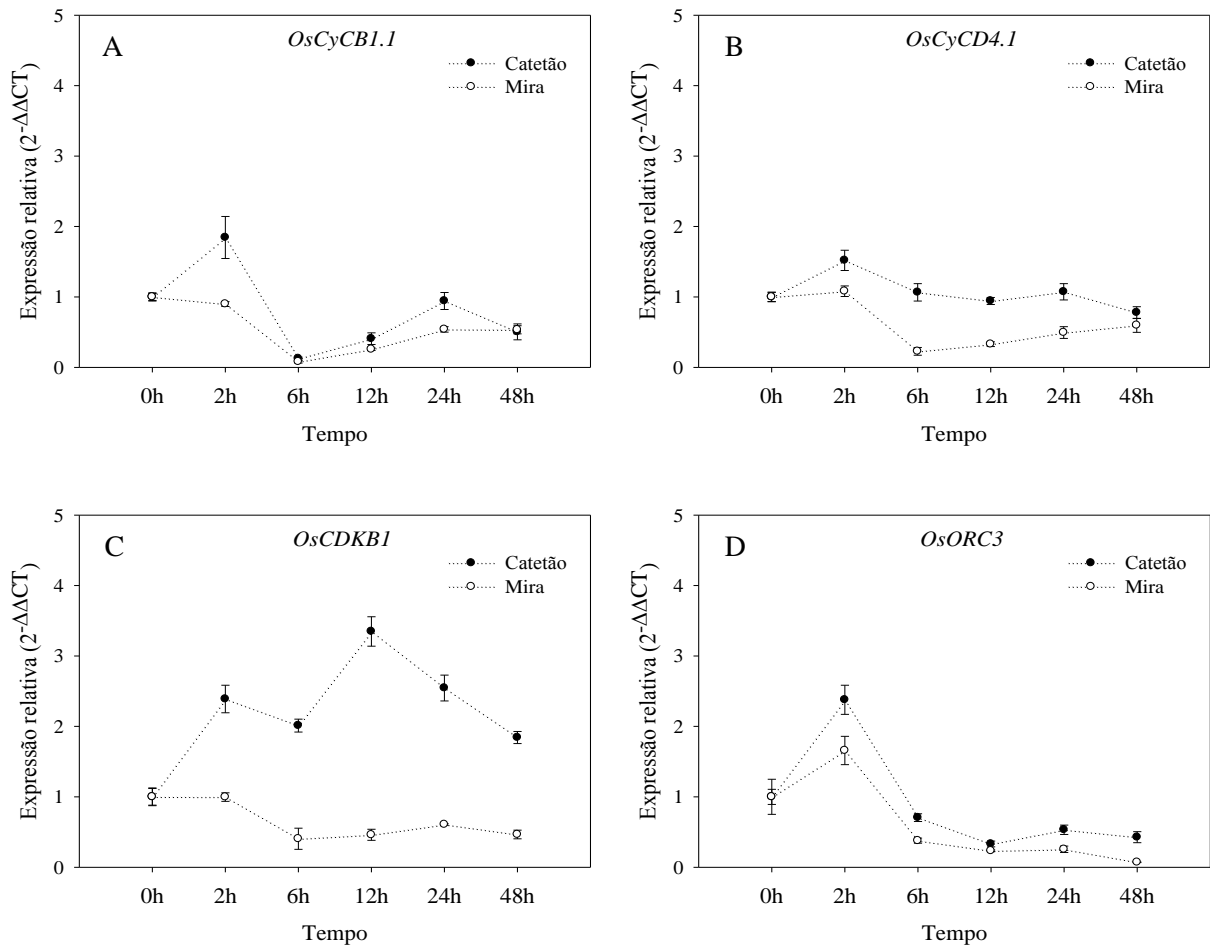


**Figura 21.** Expressão relativa de genes relacionados a tolerância ao estresse hídrico *OsCOR413* (A), *OsDRO1* (B), *NCED* (C) e *Ca<sup>2+</sup>-ATPase* (D) nas raízes das variedades Catetão e Mira. Coletas foram realizadas às 0, 2, 6, 12, 24 e 48h após a aplicação de 20% de PEG. Valores representam a razão entre o controle e estresse dentro de cada tempo (n = 4). Os genes da UBC e da UBQ5 foram utilizados como controle endógeno.

A expressão dos genes envolvidos com o ciclo celular foi maior na variedade Catetão ao longo do tempo de aplicação do estresse (Figura 22). De acordo com SHINOZAKI e SHINOZAKI (2007), plantas que possuem rápida percepção e resposta a essa condição são capazes de desenvolver mecanismos de tolerância com maior agilidade. A variedade Catetão apresentou expressão ligeiramente maior às 2 e 24h para o *OsCyCBI.1*, já para o *OsCyCD4.1* a expressão foi maior durante todas as coletas (Figura 22A e B). Dentre os genes analisados, o *OsCDKB1* foi o que apresentou diferença mais marcante entre as variedades com picos de expressão às 2 e 12h na Catetão, enquanto que os níveis de expressão, praticamente, não se alteraram na Mira (Figura 22C).

A expressão do *OsORC3* foi maior às 2h para a variedade Catetão, sendo reprimida ao longo do tempo (Figura 22D). A expressão diferencial desses genes pode contribuir para o alongamento da raiz principal, formação de pelos radiculares e desenvolvimento de raízes

laterais, como mostrado em plantas nocautes com alterações na expressão de genes do ciclo celular (CHEN et al., 2013; YU et al., 2015).



**Figura 22.** Expressão relativa de genes relacionados ao ciclo celular representado por ciclina tipo-B, *OsCyCBI.1* (A); Ciclina tipo-D, *OsCyCD4.1* (B); Ciclina dependente de kinase, *OsCDKBI* (C) e complexo de reconhecimento de origem, *OsORC3* (D) nas raízes das variedades Catetão e Mira. Coletas foram realizadas às 0, 2, 6, 12, 24 e 48h após a aplicação de 20% de PEG. Valores representam a razão entre o controle e estresse dentro de cada tempo (n = 4). Os genes da UBC e da UBQ5 foram utilizados como controle endógeno.

A partir dos resultados obtidos, a seleção dos tempos de coleta utilizados para o experimento VI se baseou na premissa de se estudar genes induzidos de forma rápida e tardia em resposta ao estresse hídrico. Além do mais, dessa maneira, seria possível estudar a regulação desses genes para verificar se a expressão é estável, induzida ou reprimida ao longo do tempo. O fato de a maior parte dos genes estudados apresentarem pico de indução nas primeiras horas após a aplicação do estresse hídrico tornou fácil a escolha do tempo de 2h como o ponto de rápida indução. Após os tempos de 2 e 6h, a maior parte dos genes sofrem regulação e tem sua expressão reduzida a níveis basais. A escolha do segundo ponto de indução tardia se baseou, portanto, na expressão do fator de transcrição, *OsDREB1A* e da ciclina dependente de quinase, *OsCDKBI*. Estes genes apresentaram pico de indução às 2 e

12h após a aplicação do estresse. Apesar de poucos genes terem sido induzidos no tempo de 12h, a escolha desse ponto de coleta pode permitir a descoberta de genes de indução tardia.

### **4.3 Identificação de Novos Alvos Biotecnológicos por Meio da Técnica de RNAseq**

A identificação de genes envolvidos com a tolerância ao estresse hídrico foi realizada neste último experimento utilizando as duas variedades contrastantes selecionadas nos experimentos prévios, Catetão (tolerante) e Mira (sensível). As plantas foram submetidas ao tratamento controle e estresse hídrico por 7 dias e coletadas para extração de RNA e sequenciamento do mRNA. Para maior uniformidade possível dos dados foram utilizadas 6 plântulas de arroz por repetição. As amostras extraídas foram enviadas para sequenciamento pelo VIB Nucleomics Core.

Os arquivos recebidos do sequenciamento contendo as “reads” (pequenos fragmentos oriundos do sequenciamento de RNA) foram carregados na plataforma Galaxy e, primeiramente, analisados quanto a qualidade por meio do programa FastQC. Logo após, as “reads” com baixa qualidade foram eliminadas por meio do programa Trimmomatic. Foi observada uma perda de, aproximadamente, 2% das “reads” para cada variedade sob tratamento controle e estresse hídrico após a utilização do Trimmomatic (Tabela 21). Após esta etapa, as reads foram reunidas em contigs e mapeadas contra o genoma de referência de japônica e índica (Tabela 21; Tabela anexo 10).

Observou-se que o mapeamento utilizando o genoma de japônica como referência foi muito mais preciso do que o realizado com índica. A porcentagem de perda do mapeamento ficou, em torno, de 5% para japônica, enquanto que para índica foi de, aproximadamente 8%. O número de reads mapeadas superou o observado em trabalho de SILVEIRA et al. (2015) e GAO et al. (2013). No entanto, a diferença mais marcante entre a utilização do genoma de referência de japônica ou índica foi na contagem das reads com o programa HTSeq. A contagem foi precisa e apresentou um percentual de reads sem padrão baixo de, aproximadamente, 12% (Tabela 21), já para as reads mapeadas com o genoma de índica, o percentual de reads sem padrão foi em mais de 50% (Tabela anexo 10). Também foi possível observar que a consistência e o percentual do genoma mapeado são maiores ao se utilizar o genoma de japônica (Tabela 22 e Tabela 23) quando comparado com o de índica (Tabela anexo 11 e Tabela anexo 12).

Esses resultados se devem ao fato do genoma de japônica ser muito mais utilizado em pesquisas moleculares e possuir liberações recentes com cobertura mais precisa e baixa taxa de erros, como o obtido por KAWAHARA et al. (2013). Diante disso, foram utilizadas as sequências mapeadas com o genoma de japônica para prosseguimento das análises.

**Tabela 21.** Parâmetros referentes ao mapeamento, trimagem e contagem das reads obtidas após o sequenciamento do RNA em raízes das variedades Catetão e Mira às 2 e 12h após a aplicação de 20% de PEG. O Genoma de japônica foi utilizado como referência para o mapeamento.

Parâmetros	Catetão controle			Catetão estresse		Mira controle			Mira estresse	
	0h	2h	12h	2h	12h	0h	2h	12h	2h	12h
<b>Reads</b>	29143710,0	29144537,3	29590056,0	29617752,7	29794171,3	29275139,7	28710318,7	30043388,7	30052371,0	31084879,7
<b>Trimmed FastQ</b>	28581000,3	28560306,0	29024813,3	29046716,3	29189080,0	28601211,3	28107974,0	29406060,0	29427887,7	30434529,3
<b>% Perda</b>	1,9	2,0	1,9	1,9	2,0	2,3	2,1	2,1	2,1	2,1
Reads mapeadas	23677572,0	23730051,7	24209012,3	24164067,0	24043103,0	23462619,3	23463547,3	24512858,0	24496362,7	25104458,0
Reads sem padrão	3410324,0	3172981,0	3236875,3	3280346,7	3509140,3	3368140,3	3106708,0	3272496,3	3349605,7	3619252,7
Reads ambíguas	65312,0	66840,7	62047,7	123300,7	80559,0	66635,0	65765,7	65756,7	122826,0	83828,3
<b>Reads mapeadas no GSNAP</b>	27153208,0	26969873,3	27507935,3	27567714,3	27632802,3	26897394,7	26636021,0	27851111,0	27968794,3	28807539,0
<b>% Perda do mapeamento</b>	5,0	5,6	5,2	5,1	5,3	5,9	5,2	5,3	5,0	5,4
<b>Reads sem padrão no HTSEQ</b>	3410324,0	3172981,0	3236875,3	3280346,7	3509140,3	3368140,3	3106708,0	3272496,3	3349605,7	3619252,7
<b>% Perda</b>	12,6	11,8	11,8	11,9	12,7	12,5	11,7	11,8	12,0	12,6

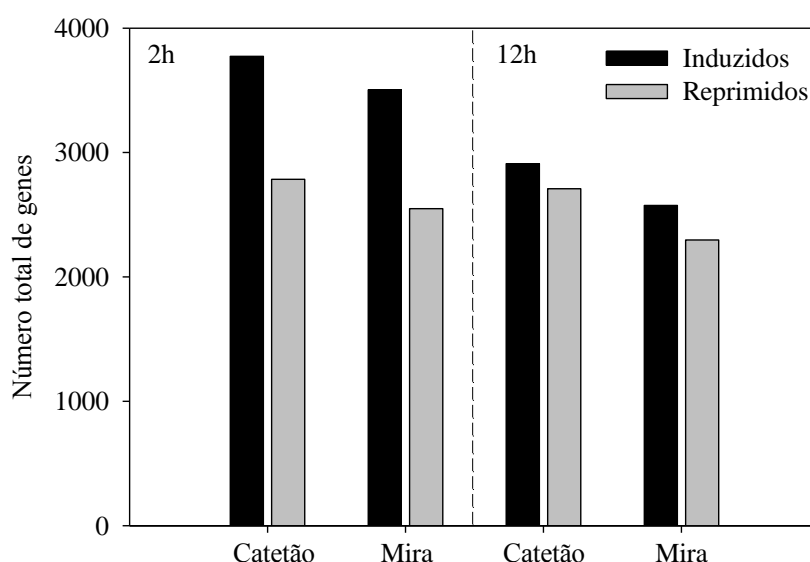
**Tabela 22.** Consistência do genoma de japônica mapeado de acordo com o número de reads.

Reads	Catetão controle			Catetão estresse		Mira controle			Mira estresse	
	0h	2h	12h	2h	12h	0h	2h	12h	2h	12h
1	80,6	80,6	80,4	80,4	79,9	78,2	79,5	78,8	79,1	78,4
3	91,1	91,7	91,7	91,1	91,3	90,8	91,8	91,7	91,5	90,1
5	93,0	93,2	93,3	92,9	93,1	92,5	93,4	93,3	92,9	91,8
10	94,3	94,9	94,6	94,1	94,5	93,6	94,4	94,7	94,2	93,4
30	94,8	95,2	95,0	94,6	95,3	94,4	94,9	95,4	94,3	93,9
50	94,6	95,0	94,9	94,5	94,8	94,1	95,0	95,1	94,4	93,9
75	94,1	94,4	94,5	94,2	94,6	94,0	94,8	94,6	93,3	93,7
100	93,6	94,2	94,6	94,3	94,2	93,5	94,7	94,3	93,0	92,8

**Tabela 23.** Percentual do genoma de japônica mapeado de acordo com o número de reads.

Reads	Catetão controle			Catetão estresse		Mira controle			Mira estresse	
	0h	2h	12h	2h	12h	0h	2h	12h	2h	12h
1	46,0	45,9	45,8	46,4	46,4	46,0	45,8	45,8	45,9	46,4
3	42,7	42,6	42,4	42,8	42,9	42,6	42,5	42,4	42,4	42,8
5	41,2	41,2	41,0	41,1	41,4	41,0	41,0	40,9	40,8	41,3
10	39,1	39,2	38,9	38,7	39,2	38,9	38,8	38,9	38,5	39,1
30	35,0	35,0	34,9	34,0	35,0	34,9	34,7	35,0	34,0	35,1
50	32,7	32,7	32,5	31,4	32,7	32,6	32,5	32,7	31,5	32,8
75	30,5	30,5	30,4	28,9	30,4	30,4	30,3	30,6	29,0	30,7
100	28,7	28,8	28,7	27,0	28,6	28,7	28,7	28,9	27,2	28,9

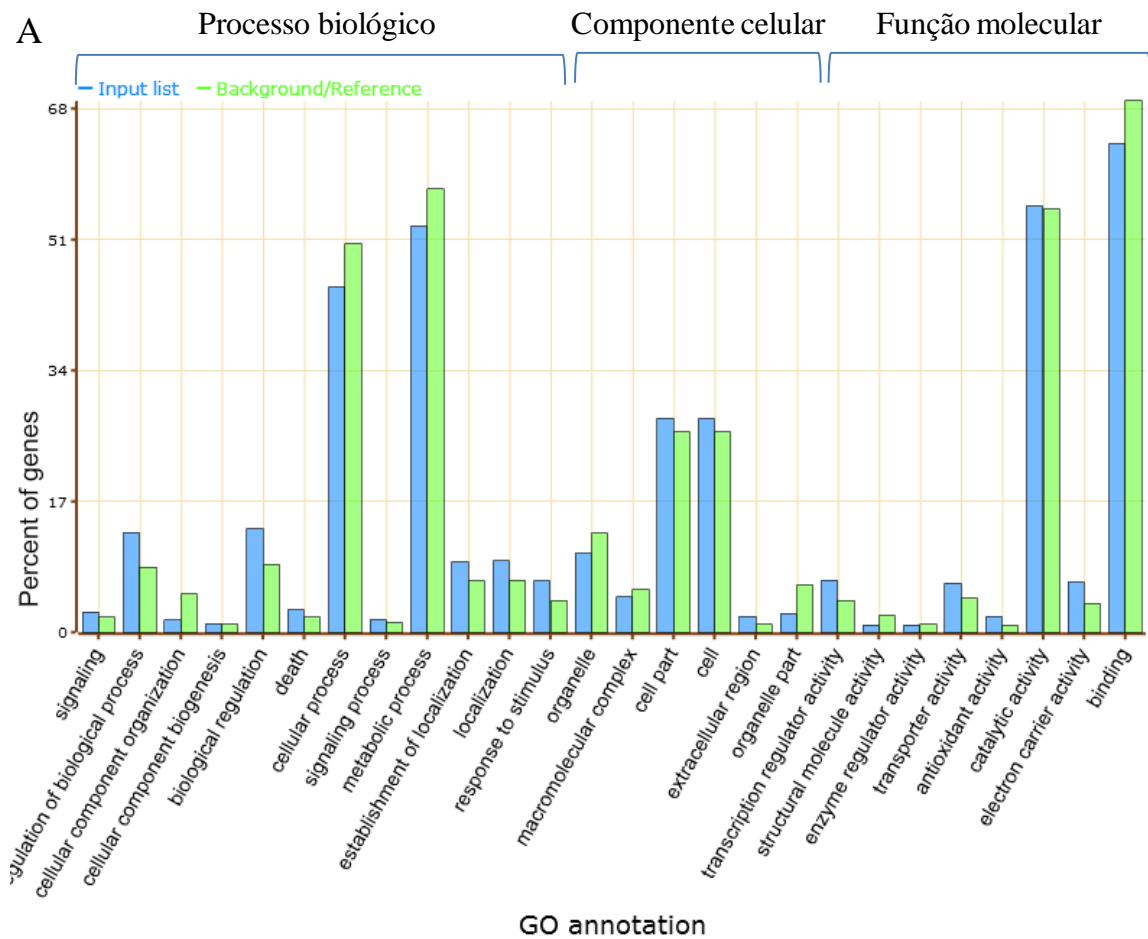
A Figura 23 ilustra a quantidade total de genes expressos diferencialmente entre os tratamentos controle e estresse hídrico às 2 e 12h na variedade Catetão e Mira. Foram observados 3.774 e 2.910 genes induzidos na variedade Catetão às 2 e 12h, respectivamente. Enquanto que para Mira foram observados 3.504 e 2.575 genes induzidos às 2 e 12h, respectivamente. Com relação ao número de genes reprimidos, a Catetão mostrou 2.785 e 2.709 às 2 e 12h, respectivamente, e a Mira mostrou 2.549 e 2.297 às 2 e 12h, respectivamente. Em ambos os tempos de coleta, a Catetão apresentou maior quantidade de genes induzidos e reprimidos pelo estresse hídrico. Resultado oposto foi observado no trabalho realizado por SILVEIRA et al. (2015), em que a variedade tolerante ao estresse hídrico apresentou menor indução e repressão de genes quando comparado a variedade sensível. As diferenças metodológicas e o material vegetal selecionado para essa análise podem ter sido os responsáveis por essa divergência de resultados.



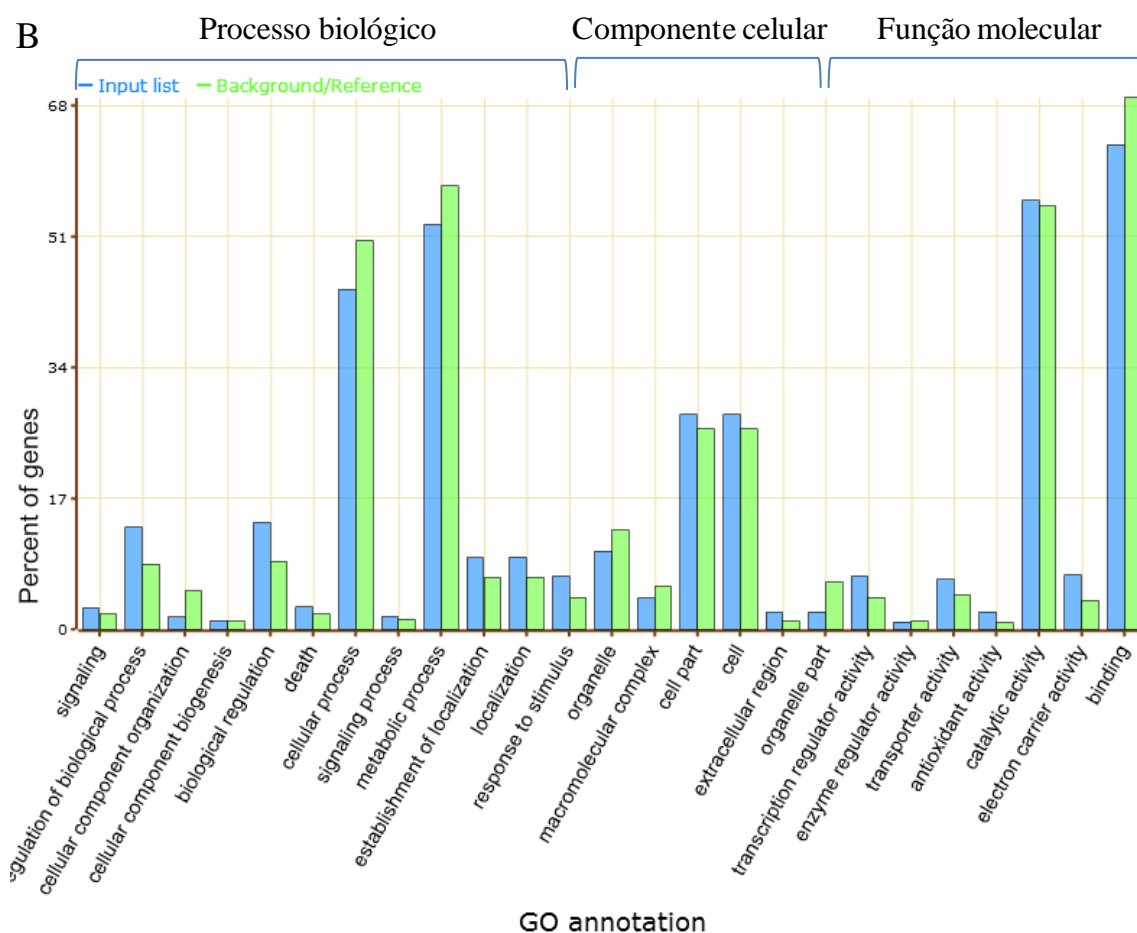
**Figura 23.** Número total de genes induzidos pelo estresse hídrico nas variedades Catetão e Mira às 2 e 12h após a aplicação de 20% de PEG.

Esse conjunto de genes foi utilizado para se obter a ontologia e categorização dos genes em processos biológicos, componente celular e função molecular (Figura 24). Os genes da Catetão se agruparam em 26 subcategorias. As que tiveram maior representação foi a de ligação, seguido de atividade catalítica, processos metabólicos e celulares, parte da célula e célula (Figura 24A). Resultado similar foi observado para a Mira (Figura 24B).



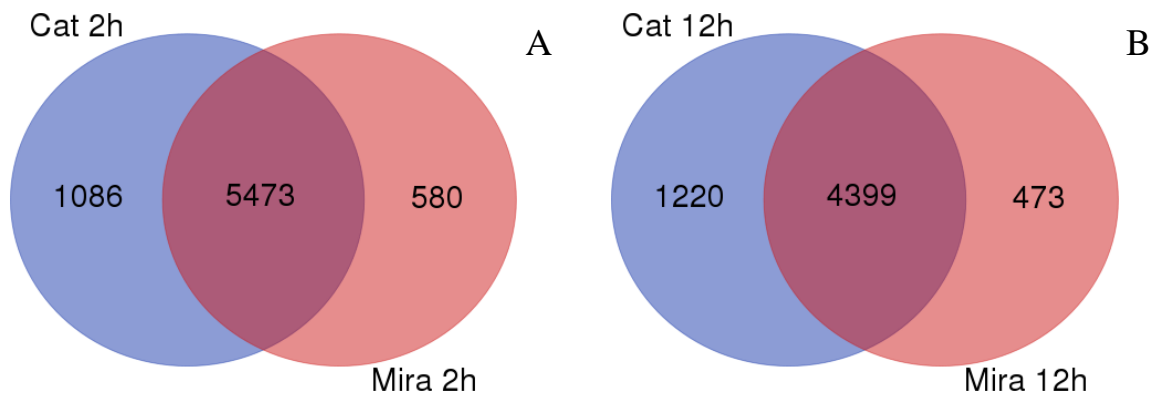


(Continua)



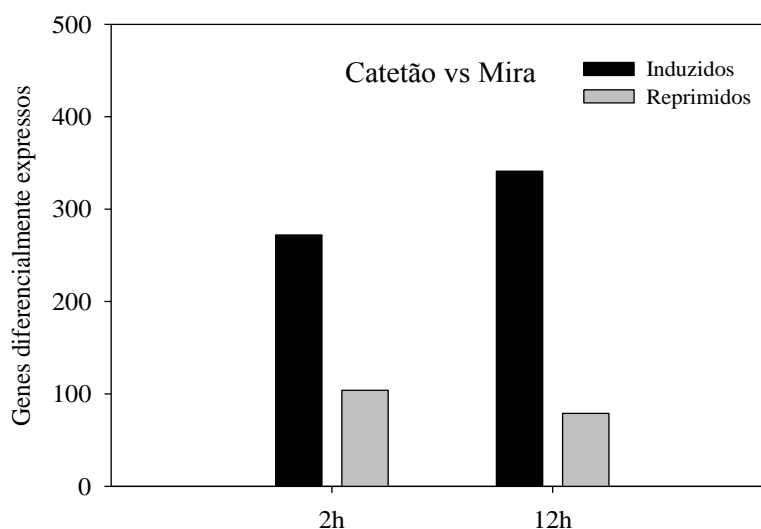
**Figura 24. Continuação.** Classificação de genes diferencialmente expressos na variedade Catetão às 2 e 12h (A) e na Mira às 2 e 12h através da ontologia do gene em 26 subcategorias considerando as três categorias principais: processos biológicos, componente celular e função molecular.

O diagrama de Venn mostra que a maior parte dos genes são expressos tanto na variedade Catetão quanto na Mira às 2 e 12h (Figura 25). Apenas uma pequena fração é diferencialmente expressa em uma única variedade, são eles os 1.086 e 580 genes expressos às 2h na Catetão e Mira, respectivamente, e os 1.220 e 473 genes expressos às 12h na Catetão e Mira, respectivamente. Como o foco são os genes expressos na variedade tolerante, a busca deve priorizar os genes mais induzidos na Catetão às 2 e 12h.



**Figura 25.** Diagrama de Venn representando o número de genes diferencialmente expressos entre Catetão e Mira às 2 e 12h após a aplicação do estresse hídrico com 20% de PEG.

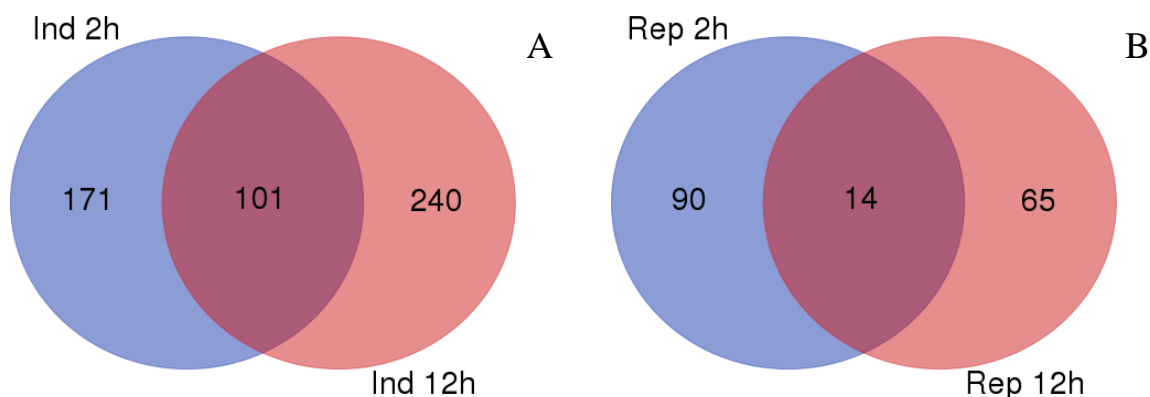
A partir das listas obtidas contendo os genes mais expressos em cada variedade às 2 e 12h, foi realizada a comparação entre Catetão e Mira para se identificar quantos genes são diferencialmente expressos em resposta ao estresse hídrico. Foram identificados 272 e 341 genes induzidos às 2 e 12h, respectivamente, enquanto que 104 e 79 foram reprimidos às 2 e 12h, respectivamente (Figura 26). A quantidade de genes induzidos em resposta ao estresse hídrico foi mais que o dobro da quantidade de genes reprimidos. É interessante notar que comparando as variedades separadamente apenas com os seus respectivos tratamentos controle há uma grande quantidade de genes expressos diferencialmente em resposta ao estresse hídrico (Figura 23), entretanto, quando esses genes diferencialmente expressos são comparados entre Catetão e Mira observa-se uma significativa redução do número de genes que foram induzidos ou reprimidos. Isto ocorre porque a seleção considera apenas aqueles diferencialmente expressos com  $FC > 2$  entre as variedades.



**Figura 26.** Número de genes diferencialmente expressos na comparação Catetão versus Mira às 2 e 12h após a aplicação do estresse hídrico com 20% de PEG.

O diagrama de Venn mostra que na comparação Catetão versus Mira há uma distinção entre os genes de resposta rápida às 2h e os genes de resposta tardia às 12h (Figura 27). Foi observada indução de 171 genes às 2h e 240 genes às 12h. Além de 101

genes induzidos às 2 e 12h (Figura 27A). Entre os genes que foram reprimidos a maior parcela ocorreu às 2h (90 genes) e 65 às 12h. Apenas 14 genes foram reprimidos às 2 e 12h (Figura 27B).



**Figura 27.** Diagrama de Venn representando o número de genes induzidos e reprimidos às 2 e 12h na comparação Catetão versus Mira após a aplicação do estresse hídrico com 20% de PEG.

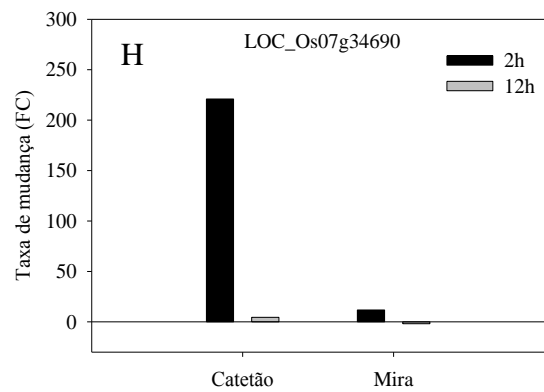
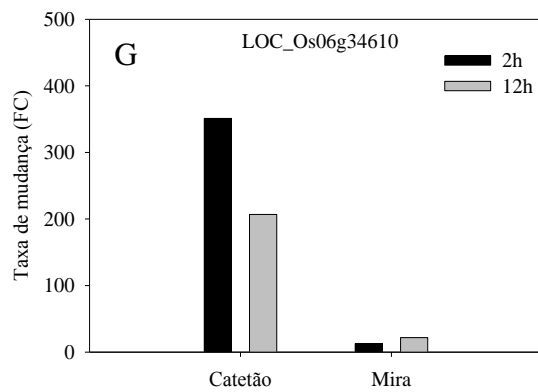
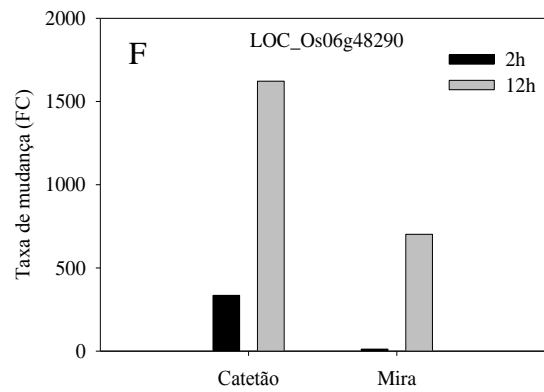
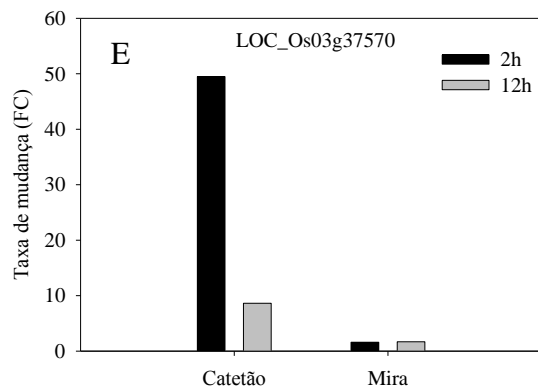
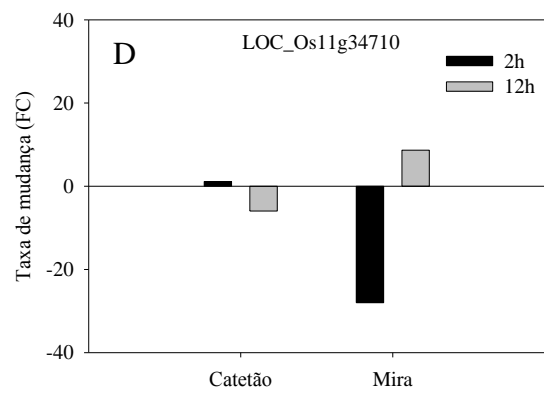
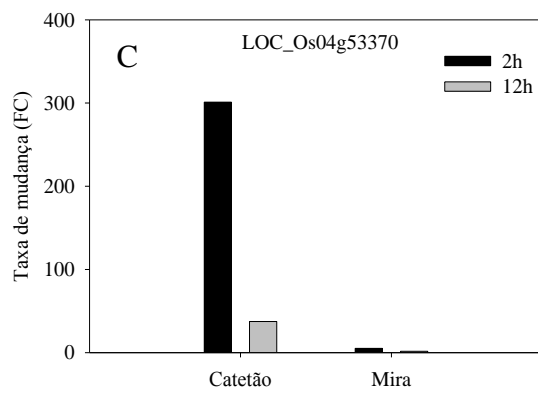
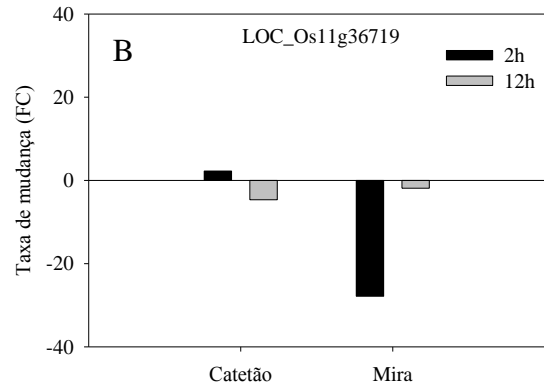
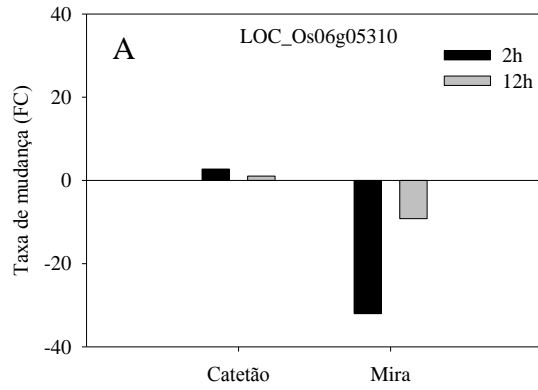
Baseado neste diagrama foram selecionados apenas os genes induzidos às 2 e 12h da comparação Catetão versus Mira para prosseguir os estudos. Desse conjunto foram selecionados vinte genes (Tabela 24; Figura 28), dez fatores de transcrição (Tabela 26; Figura 29) e dez genes desconhecidos (Tabela 27; Figura 30) mais expressos às 2 e 12h.

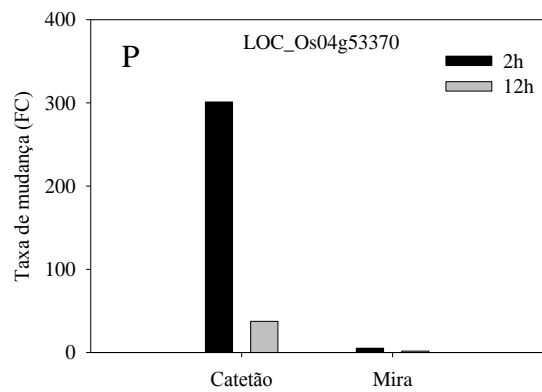
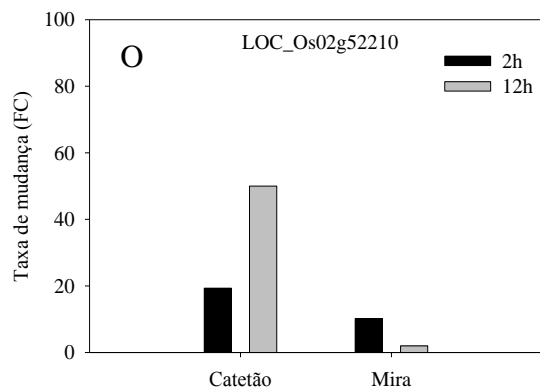
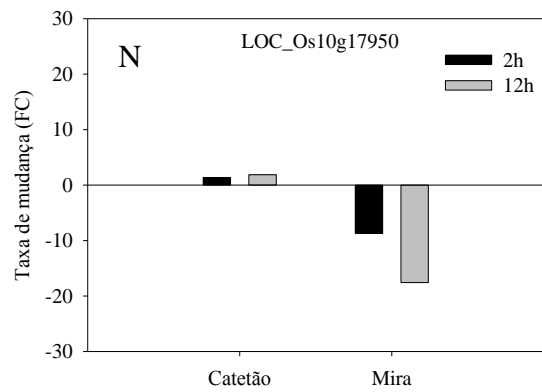
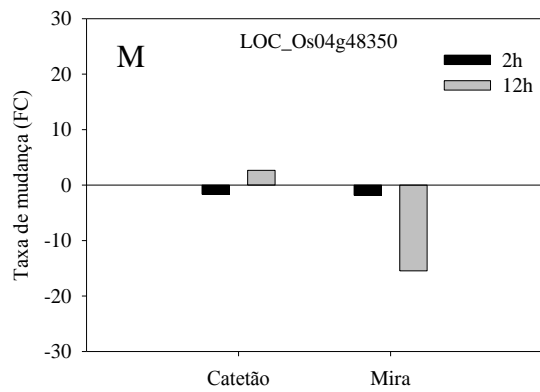
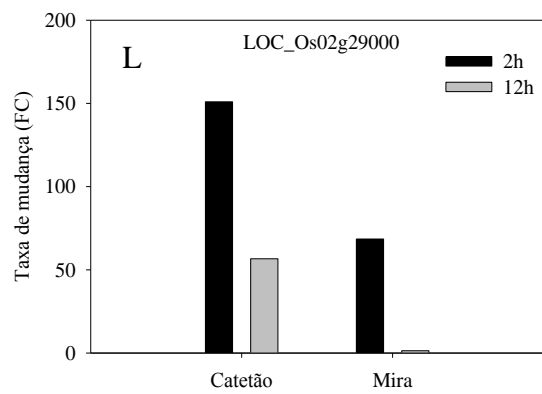
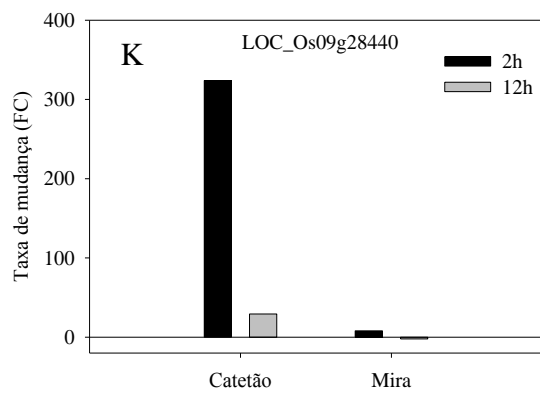
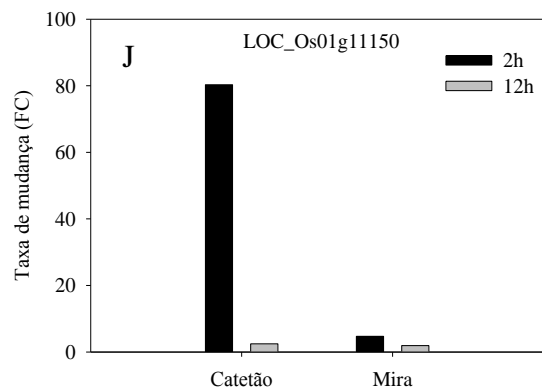
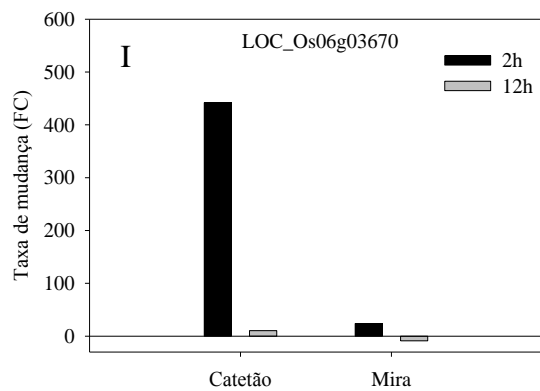
A Tabela 24 representa os vinte genes mais expressos às 2 e 12h na variedade Catetão com seus respectivos valores de taxa de mudança (FC). A partir dos valores de FC observa-se que alguns genes foram mais expressos em resposta ao estresse hídrico na Catetão. No entanto, a análise do FC isoladamente pode levar a uma falsa interpretação, já que nem sempre um alto valor de FC representa em um real aumento na expressão de um determinado gene por se tratar de uma comparação entre variedades. Para facilitar as interpretações, os dados da tabela abaixo foram representados em gráficos que mostram as diferenças de expressão entre as variedades dentro de cada tempo (Figura 28).

A análise dos dados da Tabela 24, aliados a Figura 28 permite uma interpretação mais precisa dos resultados. Genes como o LOC\_Os06g05310, LOC\_Os11g36719, LOC\_Os11g34710, LOC\_Os02g29000, LOC\_Os04g48350 não apresentaram um real aumento de expressão (Figura 28A, B, D, M e N). Neste caso a variedade Mira mostrou alta repressão desses genes o que contribuiu para o alto valor de FC observado. Genes como LOC\_Os04g53370, LOC\_Os03g37570, LOC\_Os06g48290, LOC\_Os06g34610, LOC\_Os07g34690, LOC\_Os06g03670 e LOC\_Os01g11150 mostraram, de fato, aumento de expressão às 2h na Catetão, enquanto pequena alteração foi observada para Mira (Figura 28C, E, F, G, H, I e J). Já os genes LOC\_Os06g03670, LOC\_Os09g28440, LOC\_Os10g17950, LOC\_Os02g52210, LOC\_Os04g53370, LOC\_Os01g64470, LOC\_Os01g66840 e LOC\_Os03g32230 mostraram aumento de expressão, principalmente, às 12h (Figura 28K, L, O, P, Q, R e S). Apenas o gene LOC\_Os06g03670 apresentou indução às 2 e 12h (Figura 28K).

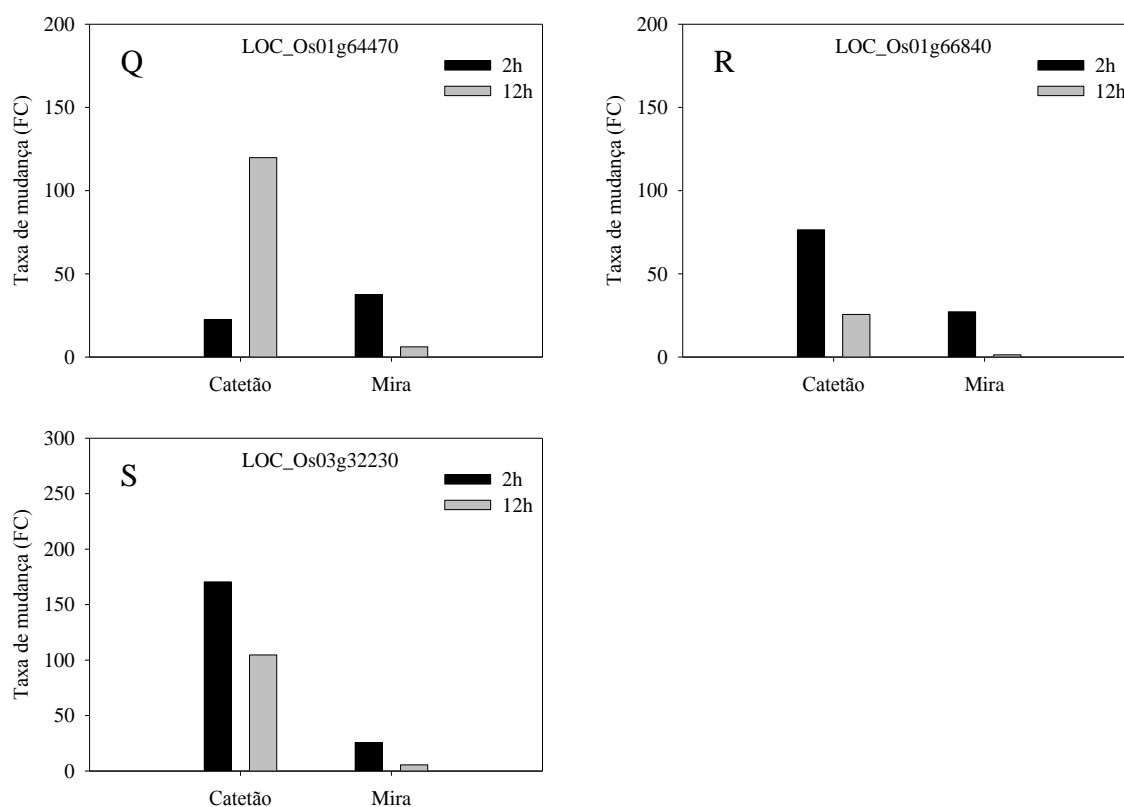
**Tabela 24.** Lista contendo os vinte genes mais expressos na variedade Catetão às 2 ou 12h após a aplicação do estresse hídrico com 20% de PEG. A taxa de mudança representa a comparação dos valores de expressão de Catetão versus Mira às 2 e 12h.

<b>2h</b>		
<b>LOC</b>	<b>Identidade</b>	<b>FC</b>
LOC_Os06g05310	Transferase domain containing protein	86,4
LOC_Os11g36719	Similar to Lipoxygenase	61,7
LOC_Os04g53370	Phospholipid/glycerol acyltransferase	58,9
LOC_Os11g34710	Metallophosphoesterase domain containing protein	30,8
LOC_Os03g37570	Conserved hypothetical protein	30,2
LOC_Os06g48290	Homeobox-leucine zipper protein HOX18	27,9
LOC_Os06g34610	Zinc finger, RING/FYVE/PHD-type	27,0
LOC_Os07g34690	Conserved hypothetical protein	18,7
LOC_Os06g03670	Dehydration-responsive element-binding protein	18,3
LOC_Os01g11150	Isopenicillin N synthase-like	16,9
<b>12h</b>		
LOC_Os06g03670	Dehydration-responsive element-binding	91,1
LOC_Os09g28440	AP2/ERF transcription factor	65,3
LOC_Os02g29000	Oxalate oxidase-like protein or germin-like protein	41,0
LOC_Os04g48350	AP2/ERF domain similar to CRT/DRE binding factor 1	41,0
LOC_Os10g17950	Similar to Protein kinase domain containing protein	32,8
LOC_Os02g52210	Zinc finger RING/FYVE/PHD-type domain	25,2
LOC_Os04g53370	Phospholipid/glycerol acyltransferase family protein	23,0
LOC_Os01g64470	Late embryogenesis abundant protein, LEA-14	19,5
LOC_Os01g66840	Similar to carboxylic ester hydrolase	19,0
LOC_Os03g32230	Zinc finger C2H2-type/integrase DNA-binding domain	18,9





(Continua)



**Figura 28. Continuação.** Gráficos dos dezenove genes mais expressos às 2 ou 12h na variedade Catetão e Mira após a aplicação do estresse hídrico com 20% de PEG. Cada variedade teve seus valores de taxa de mudança comparado com seus respectivos controles dentro do tempo.

Foi possível identificar diversos fatores de transcrição induzidos às 2 e 12h nas variedades Catetão e Mira (Tabela 25). Os fatores identificados foram expressos, especificamente, em apenas uma das variedades. A Catetão apresentou maior número de FTs induzidos, praticamente, em todas as famílias, com destaque para NAC, AP2/ERF/APETALA e WRKY. O número total de FTs induzidos na Catetão foi de 44, enquanto que na Mira foi de, apenas, 6. A maior indução de FTs na Catetão pode ter contribuído para sua maior tolerância ao estresse já que muitos desses genes estão diretamente relacionados a respostas de tolerância a estresses abióticos (KHONG et al., 2008).

**Tabela 25.** Lista contendo a quantidade de fatores de transcrição diferencialmente expressos às 2 e 12h na comparação Catetão versus Mira.

Fatores de transcrição	2h		12h	
	Catetão	Mira	Catetão	Mira
NAC	6	0	4	1
bZIP	3	0	1	0
AP2/ERF/APETALA	7	1	13	0
MYB	1	1	2	2
HSF, Heat Shock	2	0	1	0
WRKY	8	0	12	0
bHLH	0	1	2	1
HB, Homeobox	4	0	0	1
<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>3</b>	<b>35</b>	<b>5</b>



A Tabela 26 e Figura 29 mostram a expressão dos dez FTs mais expressos na Catetão. Da mesma maneira, a interpretação dos resultados deve considerar o valor de FC da comparação Catetão versus Mira, presente na Tabela 26, e os valores de FC para a variedade Catetão e Mira dentro de cada tempo comparado com seus respectivos controles (Figura 29). O fator de transcrição HOX18 foi o mais expresso às 2h (27,9), seguido do DREB1C (18,3), DREB1A (5,8), HsFC1B (5,8) e Mybst1 (5,7). Já às 12h, o FT DREB1C (91,1) foi o mais expresso, seguido do ERF102 (65,3), WRKY71 (14,6), ERF87 (11,1) e WRKY21 (8,9). O FT DREB1C foi, significativamente, expresso às 2 e 12h.

A família AP2/ERF de fatores de transcrição tem sido associada em diversos estudos a tolerância a estresses abióticos (HAAKE et al., 2002; NAKANO et al., 2006). Em *Arabisopsis*, foi relatado que a superexpressão do FT DREB1 aumentou a tolerância ao estresse hídrico pelas plantas transformadas (HAAKE et al., 2002). Em outro estudo, a superexpressão do FT AP2, nomeado HARDY, aumenta a eficiência de uso de água e a biomassa produzida por meio do aumento da assimilação fotossintética e redução da transpiração (KARABA et al., 2007). A família de FTs WRKY tem sido mais associada a defesa das plantas contra o ataque de patógenos (KHONG et al., 2013). No entanto, alguns membros dessa família já foram relatados em resposta a estresses abióticos (MARE et al., 2004; WU et al., 2009). SILVEIRA et al. (2015) estudando o transcriptoma diferencial de duas variedades de arroz submetidas ao estresse hídrico observaram alta expressão de FTs das famílias bHLH, MyB, NAC e WRKY na variedade tolerante.

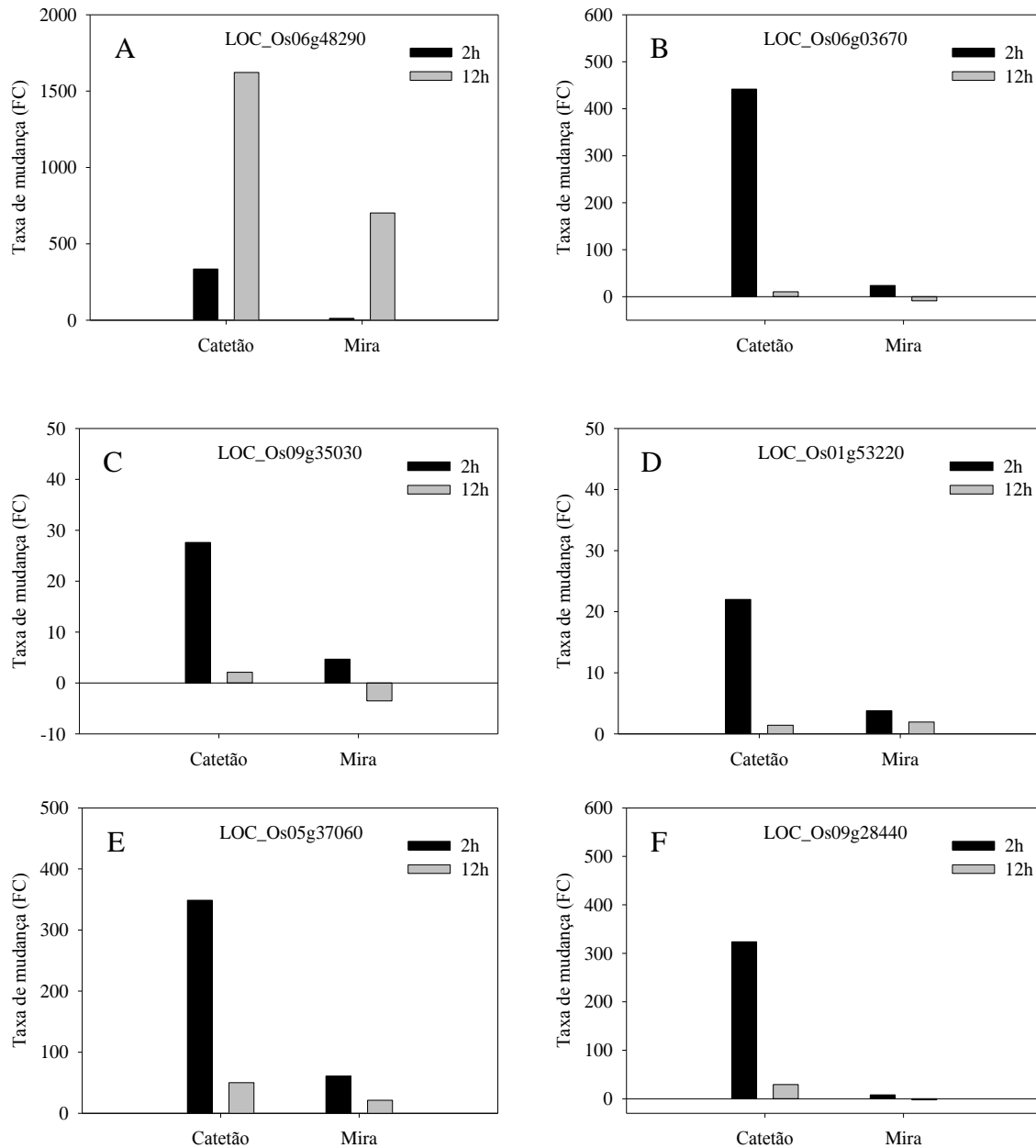
A alta expressão dessas famílias de FTs, como observado para o *OsNAC10*, *OsWRKY11* e *OsDREB1A* (Figura 20<sup>a</sup>, B e D) na Catetão é um indicativo de que muitos desses genes estão atuando em rotas metabólicas e/ou cascatas de eventos que levam ao aumento da tolerância a seca por essa variedade. A expressão diferencial de membros dessa família como observado na Tabela 26 abre uma “janela de oportunidades” para que outros FTs sejam caracterizados quanto a tolerância ao déficit hídrico.

**Tabela 26.** Lista contendo os dez fatores de transcrição mais expressos na variedade Catetão às 2 ou 12h após a aplicação do estresse hídrico com 20% de PEG. A taxa de mudança representa a comparação dos valores de expressão de Catetão versus Mira às 2 e 12h.

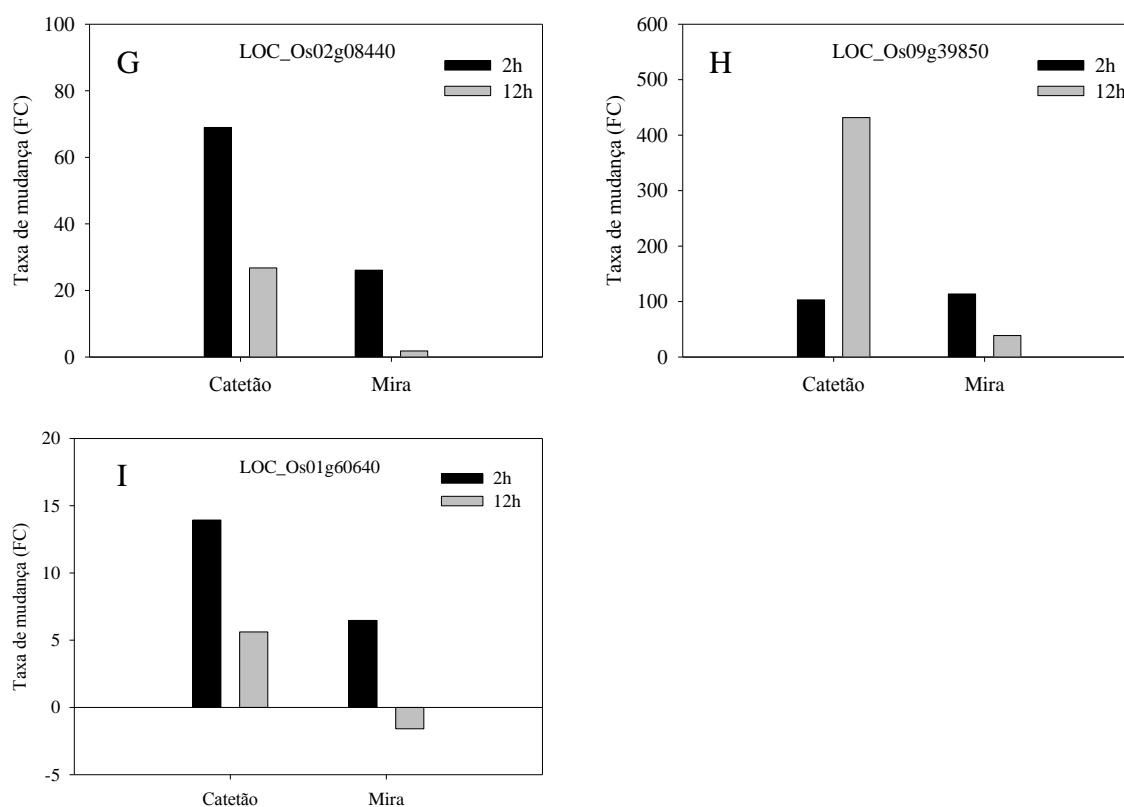
2h			
LOC	Identidade	Sigla	FC
LOC_Os06g48290	Homeobox-leucine zipper protein	HOX18	27,9
LOC_Os06g03670	Dehydration-responsive element binding	DREB1C	18,3
LOC_Os09g35030	DRE-binding protein 1A	DREB1A	5,8
LOC_Os01g53220	Heat shock transcription factor 29	HsFC1B	5,8
LOC_Os05g37060	Homeodomain-like	Mybst1	5,7
12h			
LOC_Os06g03670	Dehydration-responsive element-binding	DREB1C	91,1
LOC_Os09g28440	AP2/ERF transcription factor	ERF102	65,3
LOC_Os02g08440	WRKY transcription factor	WRKY71	14,6
LOC_Os09g39850	Pathogenesis-related transcriptional factor	ERF87	11,1
LOC_Os01g60640	WRKY transcription factor 48-like protein	WRKY21	8,9

Para os fatores de transcrição foi observado que as diferenças de FC da comparação Catetão versus Mira se traduziram, de fato, em aumento da expressão dos genes. A Catetão apresentou alta indução de todos os FTs às 2 e 12h (Figura 29). A Mira também aumentou

a expressão de alguns FTs como LOC\_Os06g48290, LOC\_Os01g53220, LOC\_Os05g37060, LOC\_Os02g08440, LOC\_Os09g39850 e LOC\_Os01g60640, no entanto esses valores são, consideravelmente, mais baixos quando comparado a Catetão (Figura 29A, D, E, G, H e I). Apenas o FT LOC\_Os06g03670 (DREB1C) apresentou alto FC às 2 e 12h na comparação Catetão versus Mira. Entretanto, o alto FC observado às 12h foi devido a repressão desse gene na Mira (Figura 29B).



(Continua)



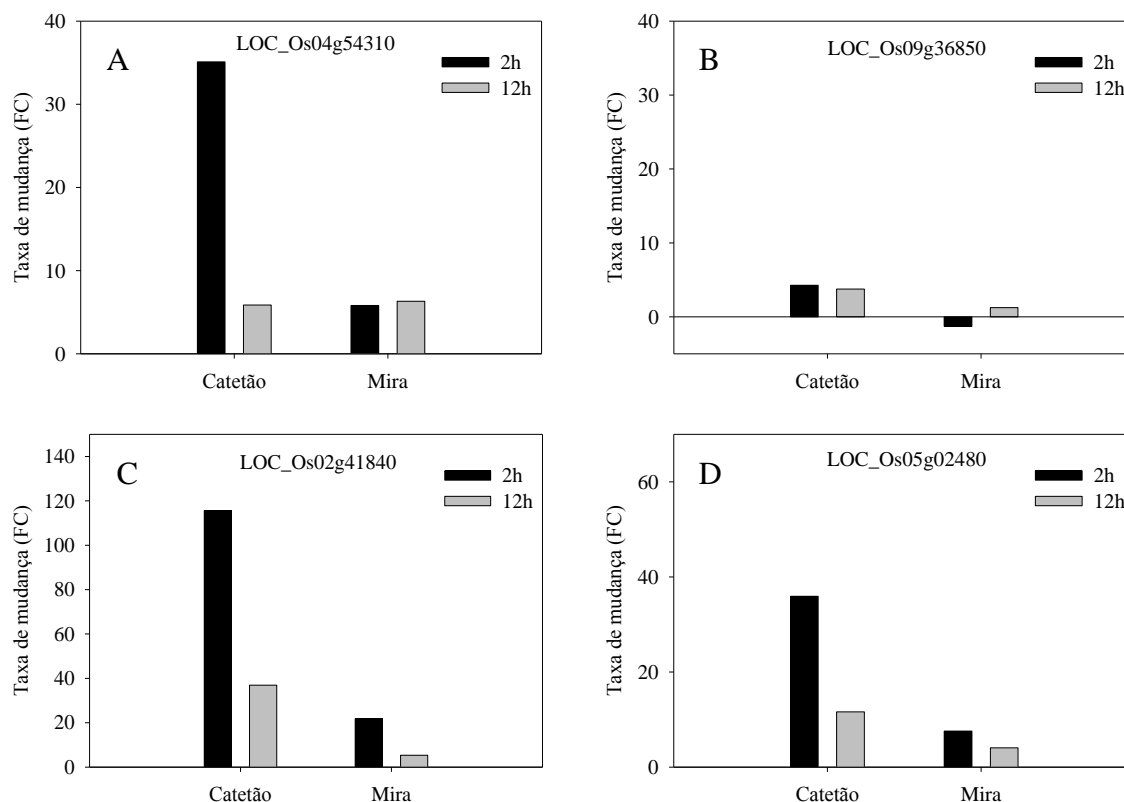
**Figura 29. Continuação.** Gráficos dos dez fatores de transcrição mais expressos às 2 ou 12h na variedade Catetão e Mira após a aplicação do estresse hídrico com 20% de PEG. Cada variedade teve seus valores de taxa de mudança comparado com seus respectivos controles dentro do tempo.

Diversos genes de função desconhecida também foram expressos diferencialmente entre Catetão e Mira (Tabela 27). O gene LOC\_Os06g03670 foi o mais expresso às 2h (6,0), seguido do LOC\_Os09g36850 (5,4), LOC\_Os02g41840 (5,2), LOC\_Os05g02480 (4,7) e LOC\_Os01g72360 (4,2). O gene LOC\_Os01g72360 foi o mais expresso às 12h (17,6), seguido do LOC\_Os02g48850 (10,7), LOC\_Os02g44990 (9,4), LOC\_Os02g41840 (6,9) e LOC\_Os02g04130 (4,8). É interessante destacar que não foi observado aumento de expressão desses genes na Mira, variedade sensível ao estresse hídrico. De acordo com WANG et al. (2011), já foram identificados uma grande gama de genes induzidos durante o estresse hídrico, no entanto a função específica de muitos deles ainda permanece desconhecida. Dessa forma, a continuação desse trabalho será de extrema importância para identificar o papel desses genes no aumento da tolerância ao estresse hídrico.

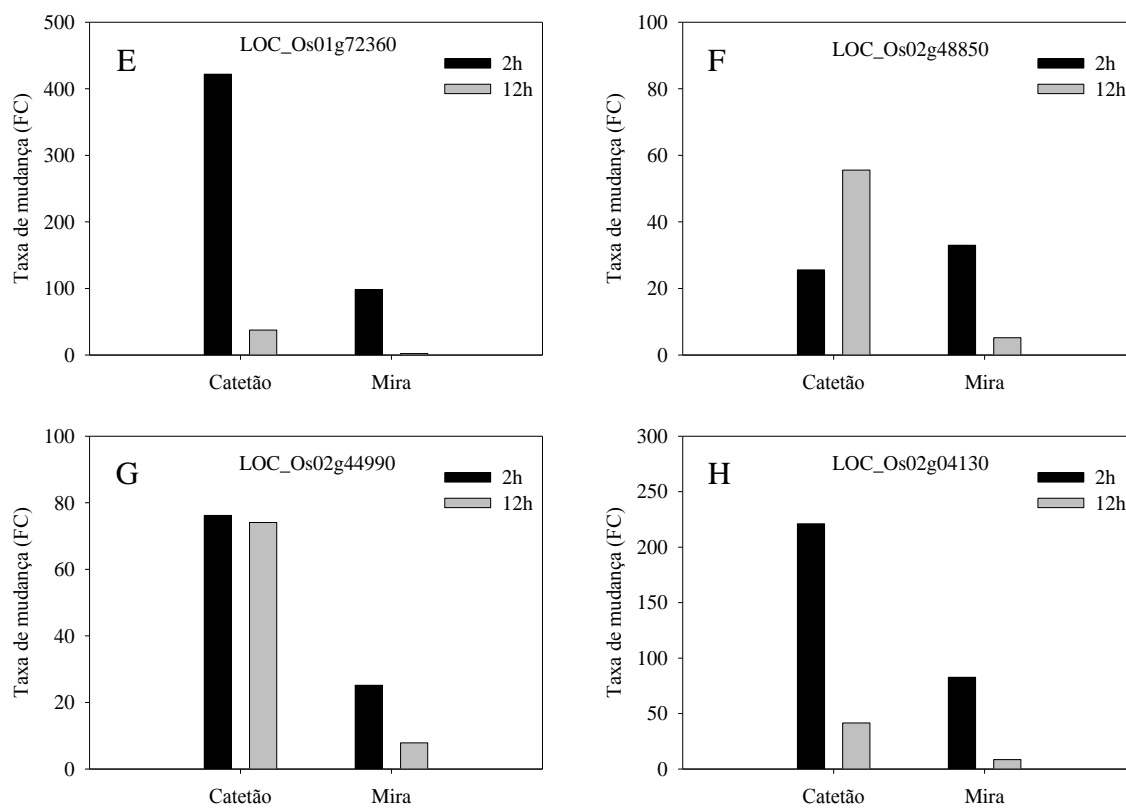
**Tabela 27.** Lista contendo os dez genes desconhecidos mais expressos na variedade Catetão às 2 ou 12h após a aplicação do estresse hídrico com 20% de PEG. A taxa de mudança representa a comparação dos valores de expressão de Catetão versus Mira às 2 e 12h.

2h		
LOC	Identidade	FC
LOC_Os04g54310	Protein of unknown function wound-induced	6,0
LOC_Os09g36850	Protein of unknown function DUF761	5,4
LOC_Os02g41840	Protein of unknown function DUF584 family	5,2
LOC_Os05g02480	Protein of unknown function DUF674 family	4,7
LOC_Os01g72360	Conserved hypothetical protein	4,2
12h		
LOC_Os01g72360	Protein of unknown function DUF4228	17,6
LOC_Os02g48850	Protein of unknown function DUF506	10,7
LOC_Os02g44990	Protein of unknown function DUF295	9,4
LOC_Os02g41840	Protein of unknown function DUF584	6,9
LOC_Os02g04130	Protein of unknown function DUF1645 family	4,8

A partir da análise da Figura 30, os genes que se destacaram como os mais promissores por apresentarem altos níveis de expressão foram o LOC\_Os04g54310, LOC\_Os02g41840, LOC\_Os05g02480 e LOC\_Os01g72360 às 2h (Figura 30A, C, D e E). Já o LOC\_Os02g48850, LOC\_Os02g44990 e LOC\_Os02g04130 se destacaram às 12h (Figura 30F, G e H). Os genes referentes ao LOC\_Os02g41840 e LOC\_Os01g72360 foram altamente expressos em ambos os tempos avaliados comparados a Mira (Figura 30C e E).



(Continua)



**Figura 30.** Gráficos dos oito genes desconhecidos mais expressos às 2 ou 12h na variedade Catetão e Mira após a aplicação do estresse hídrico com 20% de PEG. Cada variedade teve seus valores de taxa de mudança comparado com seus respectivos controles dentro do tempo.

## 5 CONCLUSÕES

- A análise conjunta dos resultados obtidos dos componentes de produtividade, índices de tolerância ao estresse e análise multivariada das características morfológicas e fisiológicas permitiram identificar as variedades Catetão e Piauí como as mais tolerantes ao estresse hídrico, e Quebra Cacho e Mira como as mais sensíveis.
- A tolerância ao estresse hídrico está correlacionada com o menor ângulo radicular, aumento da densidade e emissão de raízes laterais em condições de déficit hídrico na variedade Catetão. Não foi observada alteração anatômica nas seções analisadas que poderiam estar envolvidas com o aumento da tolerância ao estresse. A combinação de características radiculares como ângulo radicular e emissão de raízes laterais, aliados à sua plasticidade podem ser considerados importantes preditores da habilidade da planta em tolerar o estresse hídrico.
- A indução rápida e os elevados níveis de expressão de genes e fatores de transcrição podem estar relacionados a tolerância ao estresse hídrico na variedade Catetão. Além disso, foi possível identificar os pontos de coleta de 2 e 12h como de indução precoce e tardia, respectivamente, de genes envolvidos com a tolerância.
- A partir da análise do transcriptoma foram identificados genes induzidos e reprimidos que codificam fatores de transcrição e proteínas de função desconhecida. Estes genes precisam ser estudados para que se possa estabelecer seu papel na tolerância ao estresse. Os genes responsivos ao estresse hídrico que codificam para fatores de transcrição devem ser considerados como os principais candidatos para prosseguimento dos estudos.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho permitiu, a partir de dez variedades de arroz de sequeiro, identificar e caracterizar duas variedades de arroz contrastantes quanto a tolerância ao estresse hídrico, Catetão e Mira. Essas variedades foram caracterizadas em relação a características morfológicas, fisiológicas e anatômicas tornando possível endereçar qual característica estaria mais associada a tolerância ao estresse. Ao final, foi realizada a caracterização do transcriptoma das variedades frente ao estresse hídrico.

Os resultados obtidos neste tópico final de identificação de novos alvos biotecnológicos por meio da técnica de RNAseq ainda são resultados preliminares. No entanto, já foi possível observar que existe uma série de genes regulados diferencialmente entre as variedades selecionadas em resposta ao estresse. Dentre esses genes, há fatores de transcrição e proteínas de função desconhecidas que poderão ser os principais alvos utilizados para prosseguimento dos estudos. No entanto, o desafio atual é “separar o joio do trigo”, ou seja, selecionar os genes que realmente estão envolvidos com a tolerância ao estresse hídrico na variedade Catetão daqueles que são expressos diferencialmente, porém, não estão envolvidos com a tolerância.

Após a seleção desses genes, os trabalhos irão prosseguir para que seja estabelecido o papel de cada gene em resposta ao estresse hídrico e outros estresses abióticos. Além disso, este trabalho tentará priorizar genes que estejam de alguma forma relacionados ao desenvolvimento do sistema radicular, pelo fato de ter sido uma característica diferencial marcante entre as variedades. Este trabalho poderá ser desenvolvido utilizando diferentes estratégias, ex: utilização de linhagens de arabidopsis nocaute para o gene de interesse (linhagens SALK), superexpressão/silenciamento dos genes em arroz utilizando o sistema Gateway de clonagem ou obtenção de plantas de arroz nocaute por meio da técnica de CRISPR-CAS9. Essas plantas poderão ser caracterizadas quanto ao crescimento de parte aérea, morfologia, desenvolvimento do sistema radicular e expressão de genes em condições de estresse hídrico, salino e nutricional.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDI, N.; DARVISHZADEH, R.; MALEKI HATAMI, H. Effective selection criteria for screening drought tolerant recombinant inbred lines of sunflower. **Genetika**, v. 45, n. 1, p. 153-166, 2013.
- AFGAN, E.; BAKER, D.; VAN DEN BEEK, M.; BLANKENBERG, D.; BOUVIER, D.; ČECH, M.; GRUNING, B. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. **Nucleic acids research**, v. 1, n.1, p.1-8, 2016.
- AHMADI, N.; AUDEBERT, A.; BENNETT, M. J.; BISHOPP, A.; DE OLIVEIRA, A. C.; COURTOIS, B.; GUIDERDONI, E. The roots of future rice harvests. **Rice**, v. 7, n. 1, p. 1, 2014.
- ALI, M. L.; LUETCHENS, J.; NASCIMENTO, J.; SHAVER, T. M.; KRUGER, G. R.; LORENZ, A. J. Genetic variation in seminal and nodal root angle and their association with grain yield of maize under water-stressed field conditions. **Plant and Soil**, v. 397, n. 1-2, p. 213-225, 2015.
- AMBAVARAM, M. M.; BASU, S.; KRISHNAN, A.; RAMEGOWDA, V.; BATLANG, U.; RAHMAN, L.; BAISAKH, N.; PEREIRA, A. Coordinated regulation of photosynthesis in rice increases yield and tolerance to environmental stress. **Nature communications**, v. 5, n. 1, p. 1-14, 2014.
- ANDERS, S.; PYL, P. T.; HUBER, W. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. **Bioinformatics**, v. 31, n. 2, p. 166-169, 2014.
- ANDREWS, S. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. **Reference Source**, 2010. Disponível em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>. Acessado em: 24/11/2016.
- ARAKI, H.; MORITA, S.; TATSUMI, J.; IJIMA, M. Physiol-morphological analysis on axile root growth in upland rice. **Plant production science**, v. 5, n. 4, p. 286-293, 2002.
- ARAÚJO, Osmário José Lima de. **Caracterização do potencial produtivo e da relação entre produtividade e teor de proteína bruta dos grãos de variedades locais de arroz**. 2014. 44f. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.
- ARAUS, J. L.; SLAFER, G. A.; REYNOLDS, M. P.; ROYO, C. Plant breeding and drought in C3 cereals: what should we breed for? **Annals of Botany**, v. 89, n. 7, p. 925-940, 2002.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris. **Plant physiology**, v. 24, n. 1, p. 1, 1949.
- BABU, R. C. Breeding for drought resistance in rice: an integrated view from physiology to genomics. **Electronic Journal of Plant Breeding**, v.1, n. 4, p. 1133-1141, 2010.
- BAJJI, M.; KINET, J. M.; LUTTS, S. The use of electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as water stress tolerance test in durum wheat. **Plant Growth Regulation**. v. 36, 61-70, 2002.
- BARBAZUK, W. B., EMRICH, S. J., CHEN, H. D., LI, L.; SCHNABLE, P. S. SNP discovery via 454 transcriptome sequencing. **The plant journal**, v. 51, n. 5, p. 910-918, 2007.



BARRS, H. D. Determination of water deficits in plant tissues. In: KOZLOWSKI, T. T. (Ed.) **Water deficits and plant growth**, New York, Academic Press, 1968, p. 235-368.

BASU, S.; ROYCHOUDHURY, A.; SAHA, P. P.; SENGUPTA, D. N. Differential antioxidative responses of indica rice cultivars to drought stress. **Plant Growth Regulation**, v. 60, n. 1, p. 51-59, 2010.

BATES, L. S.; WALDREW, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, n.1, p. 205-207, 1973.

BEERS, R. F.; SIZER, I. W. A spectrophotometric method for measuring the break-down of hydrogen peroxide by catalase. **Journal of Biology Chemical**, v. 195, n. 1, p. 133–140, 1952.

BEGCY, K.; MARIANO, E. D.; GENTILE, A.; LEMBKE, C. G.; ZINGARETTI, S. M.; SOUZA, G. M.; MENOSSI, M. A novel stress-induced sugarcane gene confers tolerance to drought, salt and oxidative stress in transgenic tobacco plants. **PloS one**, v. 7, n. 9, p. e44697, 2012.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the royal statistical society**, v. 57, n. 1, p. 289-300, 1995.

BEVITORI, R.; OLIVEIRA, M. B.; GROSSI-DE-SA, M. F.; LANNA, A. C.; DA SILVEIRA, R. D.; PETROFEZA, S. Selection of optimized candidate reference genes for qRT-PCR normalization in rice (*Oryza sativa* L.) during Magnaporthe oryzae infection and drought. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 4, p. 9795-9805, 2014.

BIENERT, G. P.; CHAUMONT, F. **Plant Aquaporins: Roles in Water Homeostasis, Nutrition, and Signaling Processes**. In: GEISLER, M.; VENEMA, K. Transporters and Pumps in Plant Signaling. New York. Ed. Springer, 2010, p. 3-36.

BISCARINI, F.; COZZI, P.; CASELLA, L.; RICCARDI, P.; VATTARI, A.; ORASEN, G.; CATTIVELLI, L. Genome-Wide Association Study for Traits Related to Plant and Grain Morphology, and Root Architecture in Temperate Rice Accessions. **PloS one**, v. 11, n. 5, p. 1-28, 2016.

BLUM, A. Drought resistance – is it really a complex trait? **Functional Plant Biology**, v. 38, n. 10, p. 753-757, 2011.

BOGUSKI, M. S.; TOLSTOSHEV, C. M.; BASSETT, D. E. JR. Gene discovery in dbEST. **Science**, v. 265, n. 5181, p. 1993-1994, 1994.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014.

BOUMAN, B. A. M.; HUMPHREYS, E.; TUONG, T. P.; BARKER, R. Rice and water. **Advances in agronomy**, v. 92, n. 1, p. 187-237, 2007.

BOUMAN, B. A. M.; PENG, S.; CASTAÒEDA, A. R.; VISPERAS, R. M. Yield and water use of irrigated tropical aerobic rice systems. **Agricultural Water Management**, v. 74, n. 2, p. 87-105, 2005.

BOYER, J.S. Plant productivity and environment. **Science**, v. 218, n. 4571, p. 443-448, 1982.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRETON, G.; DANYLUK, J.; CHARRON, J. B. F.; SARHAN, F. Expression profiling and bioinformatic analyses of a novel stress-regulated multispinning transmembrane protein family from cereals and Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 132, n. 1, p. 64-74, 2003.

BROZYNSKA, M.; FURTADO, A.; HENRY, R. J. Genomics of crop wild relatives: expanding the gene pool for crop improvement. **Plant biotechnology journal**, v. 14, n. 1, p. 1070-1085, 2015.

BURSENS, S.; HIMANEN, K.; VAN DE COTTE, B.; BEECKMAN, T.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; VERBRUGGEN, N. Expression of cell cycle regulatory genes and morphological alterations in response to salt stress in Arabidopsis thaliana. **Planta**, v. 211, n. 5, p. 632-640, 2000.

CAI, J.; ZENG, Z.; CONNOR, J. N.; HUANG, C. Y.; MELINO, V.; KUMAR, P.; MIKLAVCIC, S. J. RootGraph: a graphic optimization tool for automated image analysis of plant roots. **Journal of experimental botany**, v. 66, n. 21, p. 6551-6562, 2015.

CASTILLO, E. G.; TUONG, T. P.; SINGH, U.; INUBUSHI, K.; PADILLA, J. Drought response of dry-seeded rice to water stress timing and N-fertilizer rates and sources. **Soil science and plant nutrition**, v. 52, n. 4, p. 496-508, 2006.

CHA-UM, S.; SAMPHUMPHUANG, T.; KIRDMANEE, C. Glycinebetaine alleviates water deficit stress in indica rice using proline accumulation, photosynthetic efficiencies, growth performances and yield attributes. **Australian Journal of Crop Science**, v. 7, n. 2, p. 213-218, 2013.

CHA-UM, S.; YOOYONGWECH, S.; SUPAIBULWATANA, K. Water deficit stress in the reproductive stage of four indica rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. **Pakistan Journal of Botany**, v. 42, n. 5, p. 3387-3398, 2010.

CHEN, X.; CUI, Z.; FAN, M.; VITOUSEK, P.; ZHAO, M.; MA, W.; DENG, X. Producing more grain with lower environmental costs. **Nature**, v. 514, n. 7523, p. 486-489, 2014.

CHEN, X.; SHI, J.; HAO, X.; LIU, H.; SHI, J.; WU, Y.; MAO, C. OsORC3 is required for lateral root development in rice. **The Plant Journal**, v. 74, n. 2, p. 339-350, 2013.

CHOUKAN, R. T.; TAHERKHANI, M. R.; GHANNADHA, A.; KHODARAHMI, M. Evaluation of drought tolerance maize lines by drought stress tolerance indices. **Iranian Journal of Agricultural Science**, v. 8, n. 1, p. 2000-2010, 2006.

CLOONAN, N.; FORREST, A. R.; KOLLE, G.; GARDINER, B. B.; FAULKNER, G. J.; BROWN, M. K.; TAYLOR, D. F.; STEPTOE, A. L.; WANI, S.; BETHEL, G.; ROBERTSON, A. J.; PERKINS, A. C.; BRUCE, S. J.; LEE, C. C.; RANADE, S. S.; PECKHAM, H. E.; MANNING, J. M.; MCKERNAN, K. J.; GRIMMOND, S. M. Stem cell transcriptome profiling via massive scale mRNA sequencing. **Nature methods**, v. 5, n. 7, p. 613-619, 2008.

CLOUGH, S. J.; BENT, A. F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 16, n. 6, p. 735-743, 1998.

COCHRAN, W. G. The distribution of the largest of a set of estimated variances as a fraction of their total. **Annals of Eugenics**, v. 22, n. 11, p. 47-52, 1947.

COMAS, L. H.; BECKER, S. R.; VON MARK, V. C.; BYRNE, P.F.; DIERIG, D. A. Root traits contributing to plant productivity under drought. **Ecophysiology of root systems-environment interaction**, v. 5, n. 4, p.1-18, 2014.

CONAB. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, sexto levantamento, março 2013. **Companhia Nacional de Abastecimento** – Brasília: Conab, 25p. 2013. Disponível em:

[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_03\\_07\\_10\\_39\\_19\\_levantamento\\_safras\\_graos\\_6.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_03_07_10_39_19_levantamento_safras_graos_6.pdf). Acessado em: 26/11/2016.

CORRÊA, L. G. G.; RIAÑO-PACHÓN, D. M.; SCHRAGO, C. G.; DOS SANTOS, R. V.; MUELLER-ROEBER, B.; VINCENTZ, M. The role of bZIP transcription factors in green plant evolution: adaptive features emerging from four founder genes. **PLoS One**, v. 3, n. 8, p. e2944, 2008.

CRAMER, G. R.; URANO, K.; DELROT, S.; PEZZOTTI, M.; SHINOZAKI, K. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. **BMC plant biology**, v. 11, n. 1, p. 163, 2011.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Volume 2. Viçosa: Editora UFV, 2003. 585 p.

DALAL, V. K.; TRIPATHY, B. C. Modulation of chlorophyll biosynthesis by water stress in rice seedlings during chloroplast biogenesis. **Plant, cell & environment**, v. 35, n. 9, p. 1685-1703, 2012.

DARVISHZADEH, R.; PIRZAD, A.; HATAMI-MALEKI, H.; POORMOHAMMAD-KIANI, S.; SARRAFI, A. Evaluation of the reaction of sunflower inbred lines and their F1 hybrids to drought conditions using various stress tolerance indices. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 8, n. 4, p. 1037-1046, 2010.

DAVID, L.; HUBER, W.; GRANOVSKAIA, M.; TOEDLING, J.; PALM, C. J.; BOFKIN, L.; JONES, T.; DAVIS, R. W.; STEINMETZ, L. M. A high-resolution map of transcription in the yeast genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 14, p. 5320-5325, 2006.

DE DATTA, S. K.; MALABUYOC, J. A.; ARAGON, E. L. A field screening technique for evaluating rice germplasm for drought tolerance during the vegetative stage. **Field Crops Research**, v. 19, n. 2, p. 123-134, 1988.

DEMIRAL, T.; TURKAN, I. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 53, n. 3, p. 247-257, 2005.

DING, L.; GAO, C.; LI, Y.; LI, Y.; ZHU, Y.; XU, G.; GUO, S. The enhanced drought tolerance of rice plants under ammonium is related to aquaporin (AQP). **Plant Science**, v. 234, n. 1, p. 14-21, 2015.

DOERNER, P. W. Cell cycle regulation in plants. **Plant physiology**, v. 106, n. 3, p. 823, 1994.

DONALD, C. M.; HAMBLIN, J. The biological yield and harvest index of cereals as agronomic and plant breeding criteria. **Advances in Agronomy**, v. 28, n. 1, p. 361-405, 1976.

DUBOUZET, J. G.; SAKUMA, Y.; ITO, Y.; KASUGA, M.; DUBOUZET, E. G.; MIURA, S.; YAMAGUCHI- SHINOZAKI, K. OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high- salt- and cold- responsive gene expression. **The Plant Journal**, v. 33, n. 4, p. 751-763, 2003.

DYSON T. World food trends and prospects to 2025. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA v. 96, p. 5929–5936, 1999.

EMBRAPA – **Cultivo do arroz irrigado no Brasil**. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrigadoBrasil/cap01.htm>. Acessado em: 23/07/2013.

EVENSON, R. E.; GOLLIN, D. Assessing the Impact of the Green Revolution, 1960 to 2000. **Science**, v. 300, n. 5620, p. 758-762, 2003. 2015.

FAGERIA, N. K.; MOREIRA, A. The Role of Mineral Nutrition on Root Growth of Crop Plants. **Advances in Agronomy**, v. 110, n. 1, p. 251-331, 2011.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://www.fao.org/nr/water/issues/scarcity.html>. Acessado em 26/01/2017. 2015.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT database: agriculture production. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://www.fao.org/home/en/>. Acessado em: 30/12/2016. 2016.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food outlook: Biannual report on global food markets. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i5703e.pdf>. Acessado em: 26/01/2017. 2016.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Global agriculture towards 2050. High Level Expert Forum-How to feed the world 2050, p. 1-4, 2009.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of Food Insecurity in the World. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/016/i3027e/i3027e.pdf> Acessado em 04/08/2013. 2012.

FEDURCO, M.; ROMIEU, A.; WILLIAMS, S.; LAWRENCE, I.; TURCATTI, G. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. **Nucleic acids research**, v. 34, n. 3, p. e22-28, 2006.

FENG, F.; XU, X.; DU, X.; TONG, H.; LUO, L.; MEI, H. Assessment of drought resistance among wild rice accessions using a protocol based on single-tiller propagation and PVC-tube cultivation. **Australian Journal of Crop Science**, v. 6, n. 7, p. 1204, 2012.

FERNANDEZ, G. C. J. Effective selection criteria for assessing plant stress tolerance. In: **Proceedings of the international symposium on adaptation of vegetative and other food crops in temperature and water stress**. 1992. v. 13, p. 257-270.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA. **Anais**. São Carlos: UFSCar, p. 255-258, 2000.

FISCHER, K. S.; LAFITTE, S.; FUKAI, S.; ATLIN, G.; HARDY, B. **Breeding rice for drought-prone environments**. International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines, 2003. 98p.

FISCHER, K. S.; WOOD, G. Breeding and selection for drought tolerance in tropical maize. In: **Proceedings of the Symposium on Principles and methods in crop improvement for drought resistance with emphasis on rice**. IRRI, Philippines. 1981. p. 47-58.

FISCHER, R. A.; MAURER, R. Drought resistance in spring wheat cultivars. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 29, n. 5, p. 897-912, 1978.

FONSECA, J. R.; VIEIRA, E. H. N.; PEREIRA, J. A.; DOS ANJOS CUTRIM, V. Descritores morfoagronômicos e fenológicos de cultivares tradicionais de arroz coletados no Maranhão. **Revista Ceres**, v. 51, n. 293, p. 45-56, 2004.

- FOSTER, J. G.; HESS, J. L. Responses of superoxide dismutase and glutathione reductase activities in cotton leaf tissue exposed to an atmosphere enriched in oxygen, **Plant Physiology**, v. 66, p. 482-487, 1980.
- FUKAI, S.; COOPER, M. Development of drought-resistant cultivars using physiomorphological traits in rice. **Field Crops Research**, v. 40, n. 2, p. 67-86, 1995.
- GAO, Y.; XU, H.; SHEN, Y.; WANG, J. Transcriptomic analysis of rice (*Oryza sativa*) endosperm using the RNA-Seq technique. **Plant molecular biology**, v. 81, n. 4-5, p. 363-378, 2013.
- GERBEAU, P.; AMODEO, G.; HENZLER, T.; SANTONI, V.; RIPOCHE, P.; MAUREL, C. The water permeability of Arabidopsis plasma membrane is regulated by divalent cations and pH. **The Plant Journal**, v. 30, n. 1, p. 71-81, 2002.
- GOMES, M. A. F. A água nossa de cada dia. **Revista Panorama Rural**, n. 122, p. 44 – 48, 2009. Disponível em: <http://www.eco21.com.br/textos/textos.asp?ID=1938>. Acessado em: 15/03/2015.
- GOWDA, V. R.; HENRY, A.; YAMAUCHI, A.; SHASHIDHAR, H. E.; SERRAJ, R. Root biology and genetic improvement for drought avoidance in rice. **Field Crops Research**, v. 122, n. 1, p.1-13, 2011.
- GOYA, R.; MEYER, I. M.; MARRA, M. A. **Applications for high-throughput sequencing**. In: RODRÍGUEZ-EZPELETA, N.; HACKENBERG, M.; ARANSAY, A. M. Bioinformatics for high throughput sequencing. Springer, 2012, p. 27-54.
- GRONDIN, A.; MAULEON, R.; VADEZ, V.; HENRY, A. Root aquaporins contribute to whole plant water fluxes under drought stress in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant, cell & environment**, v. 39, n. 2, p. 347-365, 2016.
- GUENDOUZ, A.; GUESSOUM, S.; HAFSI, M. Investigation and selection index for drought stress in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) under Mediterranean condition. **Electronic Journal of Plant Breeding**, v. 3, n. 2, p. 733-740, 2012.
- HAAKE, V.; COOK, D.; RIECHMANN, J.; PINEDA, O.; THOMASHOW, M. F.; ZHANG, J. Z. Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 130, n. 2, p. 639-648, 2002.
- HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and Stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, p.189-198, 1968.
- HENRY, A. IRRI's drought stress research in rice with emphasis on roots: accomplishments over the last 50 years. **Plant Root**, v. 7, p. 5-19, 2013.
- HENRY, A.; CAL, A. J.; BATOTO, T. C.; TORRES, R. O.; SERRAJ, R. Root attributes affecting water uptake of rice (*Oryza sativa*) under drought. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 13, p. 4751-4763, 2012.
- HENRY, A.; GOWDA, V. R.; TORRES, R. O.; MCNALLY, K. L.; SERRAJ, R. Variation in root system architecture and drought response in rice (*Oryza sativa*): phenotyping of the OryzaSNP panel in rainfed lowland fields. **Field Crops Research**, v. 120, n. 2, p. 205-214, 2011.
- HERDER, G. D.; VAN ISTERDAEL, G.; BEECKMAN, T.; DE SMET, I. The roots of a new green revolution. **Trends in plant science**, v. 15, n. 11, p. 600-607, 2010.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural of Experimental Station Bull**, v. 347, p. 1-32, 1950.

HORN, R.; PAULSEN, H. Folding in vitro of light-harvesting chlorophyll a/b protein is coupled with pigment binding. **Journal of molecular biology**, v. 318, n. 2, p. 547-556, 2002.

HOSHIDA, H.; TANAKA, Y.; HIBINO, T.; HAYASHI, Y.; TANAKA, A.; TAKABE, T.; TAKABE, T. Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthetase. **Plant molecular biology**, v. 43, n. 1, p. 103-111, 2000.

HOSSAIN, A. B. S.; SEARS, R. G.; COX, T. S.; PAULSEN, G. M. Desiccation tolerance and its relationship to assimilate partitioning in winter wheat. **Crop Science**, v. 30, n. 3, p. 622-627, 1990.

HU, H.; XIONG, L. Genetic engineering and breeding of drought-resistant crops. **Annual review of plant biology**, v. 65, p. 715-741, 2014.

HUANG, X. Y.; CHAO, D. Y.; GAO, J. P.; ZHU, M. Z.; SHI, M.; LIN, H. X. A. previously unknown zinc finger protein, DST, regulates drought and salt tolerance in rice via stomatal aperture control. **Genes & Development**, v. 23, n. 15, p. 1805-1817, 2009.

IBGE. Indicadores IBGE – Estatística da produção agrícola 2016. Disponível em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Fasciculo\\_Indicadores\\_IBGE/estProdAgr\\_201601.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Fasciculo_Indicadores_IBGE/estProdAgr_201601.pdf). Acessado em: 26/01/2017.

INZÉ, D.; DE VEYLDER, L. Cell cycle regulation in plant development. **Annual Review of Genetics**, v. 40, n. 1, p. 77-105, 2006.

IRRI, I. **Standard evaluation system for rice**. International Rice Research Institute, Philippine, 2002. Disponível em: <http://www.knowledgebank.irri.org/images/docs/rice-standard-evaluation-system.pdf>. Acessado em: 12/04/2014.

JAIN, M.; MATHUR, G.; KOUL, S.; SARIN, N. Ameliorative effects of proline on salt stress-induced lipid peroxidation in cell lines of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant Cell Reports**, v. 20, n. 5, p. 463-468, 2001.

JAIN, M.; NIJHAWAN, A.; TYAGI, A. K.; KHURANA, J. P. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 345, n. 2, p. 646-651, 2006.

JAN, A.; MARUYAMA, K.; TODAKA, D.; KIDOKORO, S.; ABO, M.; YOSHIMURA, E.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. OsTZF1, a CCCH-tandem zinc finger protein, confers delayed senescence and stress tolerance in rice by regulating stress-related genes. **Plant physiology**, v. 161, n. 3, p. 1202-1216, 2013.

JEONG, J. S.; KIM, Y. S.; BAEK, K. H.; JUNG, H.; HA, S. H.; DO CHOI, Y. KIM, M.; REUZEAU, C.; KIM, J. K. Root-specific expression of OsNAC10 improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought conditions. **Plant Physiology**, v. 153, n. 1, p. 185-197, 2010.

JI, K.; WANG, Y.; SUN, W.; LOU, Q.; MEI, H.; SHEN, S.; CHEN, H. Drought-responsive mechanisms in rice genotypes with contrasting drought tolerance during reproductive stage. **Journal of plant physiology**, v. 169, n. 4, p. 336-344, 2012.

JNANDABHIRAM, C.; SAILEN PRASAD, B. Water stress effects on leaf growth and chlorophyll content but not the grain yield in traditional rice (*Oryza sativa* Linn.) genotypes of Assam, India II.

Protein and proline status in seedlings under PEG induced water stress. **American Journal of Plant Sciences**, v. 3, n. 7, p. 971-980, 2012.

JOHANSSON, I.; KARLSSON, M.; SHUKLA, V. K.; CHRISPPEELS, M. J.; LARSSON, C.; KJELBOM, P. Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. **The Plant Cell Online**, v. 10, n. 3, p. 451-459, 1998.

JULIANO, B. O.; BECHTEL, D. B. **The rice grain and its gross composition**. In: JULIANO, B. O. (ed.). Rice Chemistry and Technology. American Association of Cereal Chemistry. Minnesota, 1985. p. 77-107.

JUNIOR, É. B.; ROSSIELLO, R. O. P.; SILVA, R. V. M. M.; RIBEIRO, R. C.; MORENZ, M. J. F. Um novo clorofilômetro para estimar os teores de clorofila em folhas do capim Tifton 85. **Ciência Rural**, v. 42, n. 12, p. 2241-2245, 2012.

KAMOSHITA, A.; RODRIGUEZ, R.; YAMAUCHI, A.; WADE, L. Genotypic variation in response of rainfed lowland rice to prolonged drought and rewatering. **Plant Production Science**, v. 7, n. 4, p. 406-420, 2004.

KANO, M.; INUKAI, Y.; KITANO, H.; YAMAUCHI, A. Root plasticity as the key root trait for adaptation to various intensities of drought stress in rice. **Plant and Soil**, v. 342, n. 1-2, p. 117-128, 2011.

KARABA, A.; DIXIT, S.; GRECO, R.; AHARONI, A.; TRIJATMIKO, K. R.; MARSCHMARTINEZ, N.; PEREIRA, A. Improvement of water use efficiency in rice by expression of HARDY, an Arabidopsis drought and salt tolerance gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 39, p. 15270-15275, 2007.

KATO, Y.; ABE, J.; KAMOSHITA, A.; YAMAGISHI, J. Genotypic variation in root growth angle in rice (*Oryza sativa* L.) and its association with deep root development in upland fields with different water regimes. **Plant and Soil**, v. 287, n. 1-2, p.117-129, 2006.

KAWAHARA, Y.; DE LA BASTIDE, M.; HAMILTON, J. P.; KANAMORI, H.; MCCOMBIE, W. R.; OUYANG, S.; CHILDS, K. L. Improvement of the *Oryza sativa* Nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data. **Rice**, v. 6, n. 4, p. 1-10, 2013.

KELLEY, L. A.; GARDNER, S. P.; SUTCLIFFE, M. J. An automated approach for clustering an ensemble of NMR-derived protein structures into conformationally related subfamilies. **Protein Engineering**, v.11, p.1063-1065, 1996.

KHONG, G. N.; RICHAUD, F.; COUDERT, Y.; PATI, P. K.; SANTI, C.; PÉRIN, C.; GANTET, P. Modulating rice stress tolerance by transcription factors. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 25, n. 1, p. 381-404, 2008.

KITSIOS, G.; DOONAN, J. H. Cyclin dependent protein kinases and stress responses in plants. **Plant signaling & behavior**, v. 6, n. 2, p. 204-209, 2011.

KNIGHT, H. Calcium signaling during abiotic stress in plants. **International review of cytology**, v. 195, n.1, p. 269-324, 1999.

KONDO, T.; KAJITA, R.; MIYAZAKI, A.; HOKOYAMA, M.; NAKAMURA-MIURA, T.; MIZUNO, S.; SAKAGAMI, Y. Stomatal density is controlled by a mesophyll-derived signaling molecule. **Plant and cell physiology**, v. 51, n. 1, p. 1-8, 2010.

KUMAR, A.; DIXIT, S.; RAM, T.; YADAW, R. B.; MISHRA, K. K.; MANDAL, N. P. Breeding high-yielding drought-tolerant rice: genetic variations and conventional and molecular approaches. **Journal of Experimental Botany**, v. 1, n. 1, p. 363, 2014A.

KUMAR, R. R.; KARAJOL, K.; NAIK, G. R. Effect of polyethylene glycol induced water stress on physiological and biochemical responses in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp.). **Recent Research in Science and Technology**, v. 3, n. 1, p. 148-152, 2011.

KUMAR, S.; DWIVEDI, S. K.; SINGH, S. S.; JHA, S. K.; LEKSHMY, S.; ELANCHEZHIAN, R.; BHATT, B. P. Identification of drought tolerant rice genotypes by analysing drought tolerance indices and morpho-physiological traits. **SABRAO Journal of Breeding & Genetics**, v. 46, n. 2, p. 217-230, 2014B.

LADEANA, W. H.; REINKE, V.; GREEN, P.; HIRST, M.; MARRA, M. A.; WATERSTON, R. H. Massively parallel sequencing of the polyadenylated transcriptome of *C. elegans*. **Genome Research**, v. 19, n. 4, p. 657-666, 2009.

LAFITTE, H. R.; COURTOIS, B.; ARRAUDEAU, M. Genetic improvement of rice in aerobic systems: progress from yield to genes. **Field Crops Research**, v. 75, n. 2, p. 171-190, 2002.

LAFITTE, H. R.; PRICE, A. H.; COURTOIS, B. Yield response to water deficit in an upland rice mapping population: associations among traits and genetic markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 109, n. 6, p. 1237-1246, 2004.

LANG, N. T.; QUANG, N.; BINH, C.; NHA, C. T.; BUU, B. C. A candidate gene response to drought stress condition in rice (*Oryza sativa* L.). **Omonrice**, v. 113, p. 105-113, 2010.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2000. 531p

LAROSA, P. C.; RHODES, D.; RHODES, J. C.; BRESSAN, R. A.; CSONKA, L. N. Elevated accumulation of proline in NaCl-adapted tobacco cells is not due to altered  $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate reductase. **Plant physiology**, v. 96, n. 1, p. 245-250, 1991.

LARTAUD, M.; PERIN, C.; COURTOIS, B.; THOMAS, E.; HENRY, S.; BETTEMBOURG, M.; DIVOL, F.; LANAU, N.; ARTUS, F.; BUREAU, C.; VERDEIL, J. L. PHIV-RootCell: a supervised image analysis tool for rice root anatomical parameter quantification. **Frontiers in plant science**. v. 5, n. 790, p. 1-7, 2014.

LAWLOR, D. W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, n. 2, p. 275-294, 2002.

LEFEBVRE, V.; NORTH, H.; FREY, A.; SOTTA, B.; SEO, M.; OKAMOTO, M.; MARION- POLL, A. Functional analysis of Arabidopsis NCED6 and NCED9 genes indicates that ABA synthesized in the endosperm is involved in the induction of seed dormancy. **The Plant Journal**, v. 45, n. 3, p. 309-319, 2006.

LI, H. W.; ZANG, B. S.; DENG, X. W.; WANG, X. P. Overexpression of the trehalose-6-phosphate synthase gene OsTPS1 enhances abiotic stress tolerance in rice. **Planta**, v. 234, n. 5, p. 1007-1018, 2011.



- LI, J. Y.; WANG, J.; ZEIGLER, R. S. The 3,000 Rice Genomes Project. **GigaScience**, v. 3, n. 8, p. 1-3, 2014.
- LI, J.; HAN, Y.; LIU, L.; CHEN, Y.; DU, Y.; ZHANG, J.; ZHAO, Q. qRT9, a quantitative trait locus controlling root thickness and root length in upland rice. **Journal of experimental botany**, v. 66, n. 9, p. 2723-2732, 2015.
- LIAN, H. L.; YU, X.; YE, Q.; DING, X. S.; KITAGAWA, Y.; KWAK, S. S.; SU, W.; TANG, Z. C. The role of aquaporin RWC3 in drought avoidance in rice. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, n. 4, p. 481-489, 2004.
- LIMA, J. M.; NATH, M.; DOKKU, P.; RAMAN, K. V.; KULKARNI, K. P.; VISHWAKARMA, C.; ROBIN, S. Physiological, anatomical and transcriptional alterations in a rice mutant leading to enhanced water stress tolerance. **AoB Plants**, v. 7, n.1, p. 1-19, 2015.
- LISTER, R.; O'MALLEY, R. C.; TONTI-FILIPPINI, J.; GREGORY, B. D.; MILLAR, A. H.; ECKER, J. R. Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in Arabidopsis. **Cell**, v. 133, n. 3, p. 523-536, 2008.
- LIU, C.; MAO, B.; OU, S.; WANG, W.; LIU, L.; WU, Y.; WANG, X. A bZIP transcription factor, confers salinity and drought tolerance in rice. **Plant molecular biology**, v. 84, n. 1-2, p. 19-36, 2014.
- LIU, G. L.; MEI, H. W.; YU, X. Q.; ZOU, G. H.; LIU, H. Y.; HU, S. P.; LUO, L. J. QTL analysis of panicle neck diameter, a trait highly correlated with panicle size, under well-watered and drought conditions in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Science**, v. 174, n. 1, p. 71-77, 2008.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- LOBELL, D. B.; GOURDJI, S. M. The influence of climate change on global crop the influence of climate change on global crop. **Plant Physiology**, v. 160, n. 4, p. 1686-1697, 2012.
- LU, T.; LU, G.; FAN, D.; ZHU, C.; LI, W.; ZHAO, Q.; HAN, B. Function annotation of the rice transcriptome at single-nucleotide resolution by RNA-seq. **Genome research**, v. 20, n. 9, p. 1238-1249, 2010.
- LUM, M. S.; HANAFI, M. M.; RAFII, Y. M.; AKMAR, A. S. N. Effect of drought stress on growth, proline and antioxidant enzyme activities of upland rice. **Journal of Animal and Plant Science**, v. 24, n. 5, p. 1487-1493, 2014.
- LUND, S. P.; NETTLETON, D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. Detecting differential expression in RNA-sequence data using quasi-likelihood with shrunken dispersion estimates. **Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology**, v. 11, n. 5, p. 8, 2012.
- MA, N.; WANG, Y.; QIU, S.; KANG, Z.; CHE, S.; WANG, G.; HUANG, J. Overexpression of OsEXPA8, a root-specific gene, improves rice growth and root system architecture by facilitating cell extension. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e75997, 2013.
- MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview; **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 444, n. 2, p. 139-158, 2006.
- MANSCHADI, A. M.; CHRISTOPHER, J.; HAMMER, G. L. The role of root architectural traits in adaptation of wheat to water-limited environments. **Functional Plant Biology**, v. 33, n. 9, p. 823-837, 2006.

MAPA. A cultura do arroz no Brasil. 2012. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/arroz/>. Acessado em 17/01/2013.

MARDIS, E. R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. **Trends in genetics**, v. 24, n. 3, p. 133-141, 2008.

MARE, C.; MAZZUCOTELLI, E.; CROSATTI, C.; FRANCIA, E.; CATTIVELLI, L. Hv-WRKY38: a new transcription factor involved in cold-and drought-response in barley. **Plant molecular biology**, v. 55, n. 3, p. 399-416, 2004.

MARIONI, J. C.; MASON, C. E.; MANE, S. M.; STEPHENS, M.; GILAD, Y. RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. **Genome research**, v. 18, n. 9, p. 1509-1517, 2008.

MARSHALL, A.; AALEN, R.B.; AUDENAERT, D.; BEECKMAN, T.; BROADLEY, M.R.; BUTENKO, M.A.; CAÑO-DELGADO, A.I.; DE VRIES, S.; DRESSELHAUS, T.; FELIX, G.; GRAHAM, N.S.; FOULKES, J.; GRANIER, C.; GREB, T.; GROSSNIKLAUS, U.; HAMMOND, J.P.; HEIDSTRA, R.; HODGMAN, C.; HOTHORN, M.; INZÉ, D. ØSTERGAARD, L.; RUSSINOVA, E.; SIMON, R.; SKIRYCH, A.; STAHL, Y.; ZIPFEL, C.; DE SMET, I. Tackling Drought Stress : RECEPTOR-LIKE KINASES Present New Approaches. **The Plant Cell**, v. 24, n. 6, p. 2262–2278, 2012.

MCGETTIGAN, P. A. Transcriptomics in the RNA-seq era. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 17, n. 1, p. 4-11, 2013.

MOHAN, M. M.; NARAYANAN, S. L.; IBRAHIM, S. M. Chlorophyll stability index (CSI): its impact on salt tolerance in rice. **International Rice Research Notes**, v. 25, n. 2, p. 38-39, 2000.

MOROZOVA, O.; MARRA, M. A. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. **Genomics**, v. 92, p. 255-264, 2008.

MORTAZAVI, A.; WILLIAMS, B. A.; MCCUE, K.; SCHAEFFER, L.; WOLD, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nature Methods**, v. 5, p. 621–628, 2008.

MOSTAJERAN, A.; RAHIMI-EICHI, V. Effects of drought stress on growth and yield of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars and accumulation of proline and soluble sugars in sheath and blades of their different ages leaves. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science**, v. 5, n. 2, p. 264-272, 2009.

MUELLER, K.; BITTEL, P.; CHINCHILLA, D.; JEHLE, A. K.; ALBERT, M.; BOLLER, T.; FELIX, G. Chimeric FLS2 receptors reveal the basis for differential flagellin perception in Arabidopsis and tomato. **Plant Cell**, v. 24, p. 2213–2224, 2012.

MURTHY, K. B. C.; KUMAR, A.; HITTALMANI, S. Response of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes under aerobic situations. **Electronic Journal of Plant Breeding**, v. 2, n. 2, p. 194-199, 2011.

NADA, R. M.; ABOGADALLAH, G. M. Aquaporins are major determinants of water use efficiency of rice plants in the field. **Plant Science**, v. 227, p. 165-180, 2014.

NAGALAKSHMI, U.; WAERN, K.; SNYDER, M. RNA-Seq: A method for comprehensive transcriptome analysis. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 4, n. 1, p. 4.11.1-4.11.13, 2010.

NAGALAKSHMI, U.; WANG, Z.; WAERN, K.; SHOU, C.; RAHA, D.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. The transcriptional landscape of the yeast whole genome defined by RNA sequencing. **Science**, v. 320, n. 5881, p. 1344-1349, 2008.

NAGHAVI, M. R.; ABOUGHADAREH, A. P.; KHALILI, M. Evaluation of drought tolerance indices for screening some of corn (*Zea mays* L.) cultivars under environmental conditions. **Notulae Scientia Biologicae**, v. 5, n. 3, p. 388, 2013.

NAKANO, T.; SUZUKI, K.; FUJIMURA, T.; SHINSHI, H. Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. **Plant physiology**, v. 140, n. 2, p. 411-432, 2006.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 1068-1072, 1981.

NASCIMENTO, Flávia Caldeira do. **A expressão de citocininas oxidases em raízes de arroz altera a morfologia radicular e aumenta a eficiência de aquisição de nutrientes**. 2014. 55f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

NEVES, O. S. C.; CARVALHO, J. G.; MARTINS, F. A. D.; PÁDUA, T. R. P.; PINHO, P. J. Uso do SPAD-502 na avaliação dos teores foliares de clorofila, nitrogênio, enxofre, ferro e manganês do algodoeiro herbáceo. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 40, n. 5, p. 517-521, 2005.

NOUNJAN, N.; NGHIA, P. T.; THEERAKULPISUT, P. Exogenous proline and trehalose promote recovery of rice seedlings from salt-stress and differentially modulate antioxidant enzymes and expression of related genes. **Journal of plant physiology**, v. 169, n. 6, p. 596-604, 2012.

O'TOOLE, J. C.; BLAND, W. L. Genotypic variation in crop plant root systems. **Advances in Agronomy**, v. 41, n. 2, p. 91-145, 1987.

OKONIEWSKI, M. J.; MILLER, C. J. Hybridization interactions between probesets in short oligo microarrays lead to spurious correlations. **BMC Bioinformatics**, v. 7, n. 1, p. 276-290, 2006.

OLIVEIRA, I. C.; CORUZZI, G. M. Carbon and amino acids reciprocally modulate the expression of glutamine synthetase in Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 121, n. 1, p. 301-310, 1999.

OONO, Y.; KAWAHARA, Y.; YAZAWA, T.; KANAMORI, H.; KURAMATA, M.; YAMAGATA, H.; MATSUMOTO, T. Diversity in the complexity of phosphate starvation transcriptomes among rice cultivars based on RNA-Seq profiles. **Plant molecular biology**, v. 83, n. 6, p. 523-537, 2013.

O'TOOLE, J. C.; CHANG T. T. **Drought resistance in cereals: rice, a case study**. In: MUSSELL, H.; STAPLES, R. C. eds. *Stress physiology in crop plants*. New York: J. Wiley & Sons, p. 373-405, 1979.

PASSIOURA, J. B. Drought and drought tolerance. In: **Drought tolerance in higher plants. Genetical, physiological and molecular biological analysis**. Belhassen E. (Ed.). Kluwer Academic Publisher, Dordrecht. 1997. p. 1-5.

PASSIOURA, J. B. The drought environment: physical, biological and agricultural perspectives. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 2, p. 113-117, 2007.

PASSIOURA, J. B. Water in the soil-plant-atmosphere continuum. In: **Physiological Plant Ecology II**. Springer Berlin Heidelberg, 1982. p. 5-33.

PAUL, M. J., JHURREEA, D., ZHANG, Y., PRIMAVESI, L. F., DELATTE, T., SCHLUEPMANN, H.; WINGLER, A. Upregulation of biosynthetic processes associated with growth by trehalose 6-phosphate. **Plant signaling & behavior**, v. 5, n. 4, p. 386, 2010.

PELEG, Z.; REGUERA, M.; TUMIMBANG, E.; WALIA, H.; BLUMWALD, E. Cytokinin-mediated source/sink modifications improve drought tolerance and increase grain yield in rice under water-stress. **Plant Biotechnology Journal**, v. 9, n. 7, p. 747-758, 2011.

PENNISI, E. The blue revolution, drop by drop, gene by gene. **Science**, v. 320, n. 5873, p. 171-173, 2008.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 14<sup>a</sup> ed. Piracicaba – SP: Editora da Universidade de São Paulo, 2000. 477p.

PIMENTEL, C. **A relação da planta com a água**. 1<sup>a</sup> ed. Edur – RJ: Editora da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2004. 191p.

PINHEIRO, B. S. **Cultivo do arroz de terras altas – Sistemas de produção**. Embrapa Arroz e Feijão. Versão eletrônica, 2003.

POEHLMAN, J.M.; SLEPER, D.A. **Breeding field crops**. Ames, Iowa, USA: Iowa State Press. 1995. 473p.

PRAKSH, V. Screening of wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes under limited moisture and heat stress environments. **The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, v. 67, n. 1, p. 31-33, 2007.

PRICE, A. H.; TOMOS, A. D.; VIRK, D. S. Genetic dissection of root growth in rice (*Oryza sativa* L.) I: A hydroponic screen. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, n. 1-2, p. 143-152, 1997.

PRICE, A. H.; TOWNEND, J.; JONES, M. P.; AUDEBERT, A.; COURTOIS, B. Mapping QTLs associated with drought avoidance in upland rice grown in the philippines and West Africa. **Plant Molecular Biology**, v. 48, n. 5-6, p. 683-695, 2002.

PROJECT, I. R. G. S. The map-based sequence of the rice genome. **Nature**, v. 436, n. 7052, p. 793-800, 2005.

QUAN, R.; HU, S.; ZHANG, Z.; ZHANG, H.; ZHANG, Z.; HUANG, R. Overexpression of an ERF transcription factor TSRF1 improves rice drought tolerance. **Plant biotechnology journal**, v. 8, n. 4, p. 476-488, 2010.

R CORE TEAM: A language and environment for statistical computing. 2014.

RABARA, R. C.; TRIPATHI, P.; RUSHTON, P. J. The Potential of Transcription Factor-Based Genetic Engineering in Improving Crop Tolerance to Drought. **Omics: a journal of integrative biology**, v. 18, n. 10, p. 601-614, 2014.

RABELLO, A. R.; GUIMARÃES, C. M.; RANGEL, P. H.; DA SILVA, F. R.; SEIXAS, D.; DE SOUZA, E.; BRASILEIRO, A. C. M.; SPEHAR, C. R.; FERREIRA, M. E.; MEHTA, Â.

Identification of drought-responsive genes in roots of upland rice (*Oryza sativa* L). **BMC genomics**, v. 9, n. 1, p. 485, 2008.

RABELLO, Aline Rodrigues. **Identificação de genes responsivos à seca em raiz de arroz de sequeiro (*Oryza sativa* L.)**. 2008. 80f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Brasília, DF, 2008.

RAMAN, A.; VERULKAR, S.; MANDAL, N.; VARIAR, M.; SHUKLA, V.; DWIVEDI, J.; SINGH, B.; SINGH, O.; SWAIN, P.; MALL, A.; ROBIN, S. Drought yield index to select high yielding rice lines under different drought stress severities. **Rice**, v. 5, n. 1, p.1-12, 2012.

RANGEL, Rafael Passos. **Morfologia, arquitetura radicular e metabolismo de nitrogênio em variedades de arroz sob baixa disponibilidade de amônio**. 2014. 49f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

REDILLAS, M. C. F. R.; JEONG, J. S.; KIM, Y. S.; JUNG, H.; BANG, S. W.; CHOI, Y. D.; HA, S. H.; REUZEAU, C.; KIM, J. K. The overexpression of OsNAC9 alters the root architecture of rice plants enhancing drought resistance and grain yield under field conditions. **Plant biotechnology journal**, v. 10, n. 7, p. 792-805, 2012.

REGUERA, M.; PELEG, Z.; ABDEL-TAWAB, Y. M.; TUMIMBANG, E. B.; DELATORRE, C. A.; BLUMWALD, E. Stress-Induced Cytokinin Synthesis Increases Drought Tolerance through the Coordinated Regulation of Carbon and Nitrogen Assimilation in Rice. **Plant Physiology**, v. 163, n. 4, p. 1609-1622, 2013.

RICARDO, T. R. **Viabilidade econômica e risco das principais culturas anuais no município de Rio Verde (GO)**. 2010. 91 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

RICH, S. M.; WATT, M. Soil conditions and cereal root system architecture: review and considerations for linking Darwin and Weaver. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 5, p.1193-1208, 2013.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139-140, 2010.

ROBINSON, M. D.; OSHLACK, A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. **Genome biology**, v. 11, n. 3, p. 1, 2010.

ROSIELLE, A. A.; HAMBLIN, J. Theoretical aspects of selection for yield in stress and non-stress environment. **Crop science**, v. 21, n. 6, p. 943-946, 1981.

ROYCE, T. E.; ROZOWSKY, J. S.; GERSTEIN, M. B. Toward a universal microarray: prediction of gene expression through nearest-neighbor probe sequence identification. **Nucleic acids research**, v. 35, n. 15, p. e99, 2007.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis". **Nature Methods**. v. 9, n. 1 p. 671-675, 2012.

SCHNEIDER, K. A.; ROSALES-SERNA, R.; IBARRA-PEREZ, F.; CAZARES-ENRIQUEZ, B.; ACOSTA-GALLEGOS, J. A.; RAMIREZ-VALLEJO, P.; KELLY, J. D. Improving common bean performance under drought stress. **Crop Science**, v. 37, n. 1, p. 43-50, 1997.

- SERRAJ, R.; MCNALLY, K. L.; SLAMET-LOEDIN, I.; KOHLI, A.; HAEFELE, S. M.; ATLIN, G.; KUMAR, A. Drought resistance improvement in rice: an integrated genetic and resource management strategy. **Plant Production Science**, v. 14, n. 1, p. 1-14, 2011.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 2, p. 221-227, 2007.
- SHIRASAWA, K.; TAKABE, T.; TAKABE, T.; KISHITANI, S. Accumulation of glycinebetaine in rice plants that overexpress choline monooxygenase from spinach and evaluation of their tolerance to abiotic stress. **Annals of botany**, v. 98, n. 3, p. 565-571, 2006.
- SIDDIQUE, M. R. B.; HAMID, A.; ISLAM, M. S. Drought stress effects on water relations of wheat. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 41, n.1, p. 35-39, 2000.
- SILVEIRA, R. D. D.; ABREU, F. R. M.; MAMIDI, S.; MCCLEAN, P. E.; VIANELLO, R. P.; LANNA, A. C.; BRONDANI, C. Expression of drought tolerance genes in tropical upland rice cultivars (*Oryza sativa*). **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 8181-8200, 2015.
- SINAKI, J. M.; HERAVAN, E. M.; RAD, A. H. S.; NOORMOHAMMADI, G. H.; ZAREI, G. H. The effects of water deficit during growth stages of canola (*Brassica napus* L.). **American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science**, v. 2, n. 4, p. 417-422, 2007.
- SINGH, A.; KUMAR, P.; GAUTAM, V.; RENGASAMY, B.; ADHIKARI, B.; UDAYAKUMAR, M.; SARKAR, A. Root transcriptome of two contrasting indica rice cultivars uncovers regulators of root development and physiological responses. **Nature Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-17, 2016.
- SINGH, A.; SHAMIM, M.; SINGH, K. N. Genotypic variation in root anatomy, starch accumulation, and protein induction in upland rice (*Oryza sativa*) varieties under water stress. **Agricultural Research**, v. 2, n. 1, p. 24-30, 2013.
- SINGH, B. U.; RAO, K. V.; SHARMA, H. C. Comparison of selection indices to identify sorghum genotypes resistant to the spotted stemborer *Chilo partellus* (Lepidoptera: Noctuidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 31, n. 1-2, p. 38-51, 2011.
- SINGH, K. K.; GHOSH, S. Regulation of glutamine synthetase isoforms in two differentially drought-tolerant rice (*Oryza sativa* L.) cultivars under water deficit conditions. **Plant cell reports**, v. 32, n. 2, p. 183-193, 2013.
- SIWI-IWMI. 2004. Water – More Nutrition Per Drop. Stockholm International Water Institute. Stockholm. Disponível em: [http://www.swedishwaterhouse.se/wp-content/uploads/CSD\\_More\\_nutrition\\_per\\_drop\\_2004.pdf](http://www.swedishwaterhouse.se/wp-content/uploads/CSD_More_nutrition_per_drop_2004.pdf). Acessado em: 12/03/2015.
- SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, v.11, p. 33-40, 1962.
- SU, J.; WU, R. Stress-inducible synthesis of proline in transgenic rice confers faster growth under stress conditions than that with constitutive synthesis. **Plant Science**, v. 166, n. 4, p. 941-948, 2004.
- SWAMY, B. P.; KUMAR, A. Genomics-based precision breeding approaches to improve drought tolerance in rice. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 8, p. 1308-1318, 2013.

- TABUCHI, M.; SUGIYAMA, K.; ISHIYAMA, K.; INOUE, E.; SATO, T.; TAKAHASHI, H.; YAMAYA, T. Severe reduction in growth rate and grain filling of rice mutants lacking OsGS1;1, a cytosolic glutamine synthetase1;1. **The Plant Journal**, v. 42, p. 641-651, 2005.
- TANAKA, Y.; SUGANO, S. S.; SHIMADA, T.; HARA-NISHIMURA, I. Enhancement of leaf photosynthetic capacity through increased stomatal density in Arabidopsis. **New Phytologist**, v. 198, n. 3, p. 757-764, 2013.
- TARDIEU, F.; TUBEROSA, R. Dissection and modelling of abiotic stress tolerance in plants. **Current opinion in plant biology**, v. 13, n. 2, p. 206-212, 2010.
- TERRA, T. G. R.; DE BARROS LEAL, T. C. A.; BORÉM, A.; RANGEL, P. H. N. Tolerância de linhagens de arroz de terras altas à seca. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n. 2, p. 201-208, 2013.
- TERRA, T. G. R.; LEAL, T. C. A. D. B.; RANGEL, P. H. N.; BARROS, H. B.; SANTOS, A. C. D. Tolerance to drought in rice cultivars in Southern Cerrado area from Tocantins state, Brazil. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 4, p. 715-719, 2010.
- TERRA, Thiago Gledson Rios. **Avaliação de características morfofisiológicas de tolerância à seca em uma coleção nuclear de acessos de arroz de terras altas (*Oryza sativa* L.)**. 2008. 70f. Dissertação (Mestrado em Produção vegetal). Universidade Federal do Tocantins, To, 2008.
- TILMAN, D.; FARGIONE, J.; WOLFF, B.; D'ANTONIO, C.; DOBSON, A.; HOWARTH, R.; SCHINDLER, D.; SCHLESINGER, W. H.; SIMBERLOFF, D.; SWACKHAMER, D. Forecasting agriculturally driven global environmental change. **Science**, v. 292, n. 5515, p. 281-284, 2001.
- TORRES NETO, A. **Atributos fisiológicos e relações hídricas em genótipos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) na fase juvenil**. 2005. 116p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, Campos dos Goytacazes – RJ, 2005.
- TROVATO, M.; MATTIOLI, R.; COSTANTINO, P. Multiple roles of proline in plant stress tolerance and development. **Rendiconti Lincei**, v. 19, n. 4, p. 325-346, 2008.
- TUTEJA, N. Abscisic acid and abiotic stress signaling. **Plant signaling & behavior**, v. 2, n. 3, p. 135-138, 2007.
- UGA, Y. Quantitative measurement of root growth angle by using the basket method p. 22-26. In: SHASHIDHAR, H. E. (Org.) **Methodologies for root drought studies in rice**. International Rice Research Institute, 2012, 65p.
- UGA, Y.; KITOMI, Y.; ISHIKAWA, S.; YANO, M. Genetic improvement for root growth angle to enhance crop production. **Breeding science**, v. 65, n. 2, p.111-119, 2015.
- UGA, Y.; OKUNO, K.; YANO, M. Dro1, a major QTL involved in deep rooting of rice under upland field conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 8, p. 2485-2494, 2011.
- UGA, Y.; SUGIMOTO, K.; OGAWA, S.; RANE, J.; ISHITANI, M.; HARA, N.; KITOMI, Y.; INUKAI, Y.; ONO, K.; KANNO, N.; INOUE, H.; TAKEHISA, H.; MOTOYAMA, R.; NAGAMURA, Y.; WU, J.; MATSUMOTO, T.; TAKAI, T.; OKUNO, K.; YANO, M. Control of root system architecture by DEEPER ROOTING 1 increases rice yield under drought conditions. **Nature genetics**, v. 45, n. 9, p. 1097-1102, 2013.

UMEZAWA, T.; FUJITA, M.; FUJITA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. **Current opinion in biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 113-122, 2006.

UNITED NATIONS. 2008. World population prospects: The 2008 revision population database. Disponível online em: [esa.un.org/unpp/index.asp?panel=1](http://esa.un.org/unpp/index.asp?panel=1). Acessado em: 20/04/2014.

USMAN, M.; RAHEEM, Z.; AHSAN, T.; IQBAL, A.; SARFARAZ, Z. N.; HAQ, Z. Morphological, physiological and biochemical attributes as indicators for drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **European Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 1, p. 23-28, 2013.

VAHDATI, K.; LESLIE, C. Abiotic Stress – Plant responses and applications in agriculture. In: DUQUE, A. S.; ALMEIDA, A. M.; SILVA, A. B.; SILVA, J. M.; FARINHA, A. P.; SANTOS, D.; FEVEREIRO, P.; ARAÚJO, S. S. **Abiotic Stress Responses in Plants: Unraveling the Complexity of Genes and Networks to Survive**, 2013, p.57-101.

VAN VERK, M. C.; HICKMAN, R.; PIETERSE, C. M.; VAN WEES, S. RNA-Seq: revelation of the messengers. **Trends in plant science**, v. 18, n. 4, p. 175-179, 2013.

VENUPRASAD, R.; LAFITTE, H. R.; ATLIN, G. N. Response to direct selection for grain yield under drought stress in rice. **Crop Science**, v. 47, n. 1, p. 285-293, 2007.

VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. **Current opinion in biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 123-132, 2005.

WALLACE, D. H.; BAUDOIN, J. P.; BEAVER, J.; COYNE, D. P.; HALSETH, D. E.; MASAYA, P. N.; ZOBEL, R. W. Improving efficiency of breeding for higher crop yield. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 86, n. 1, p. 27-40, 1993.

WANDER, A. L. A cultura. In: BORÉM, A.; RANGEL, P. H. N. **Arroz do plantio a colheita**. 1 ed. Viçosa. Universidade Federal de Viçosa, 2015, v.1, p. 9-26.

WANG, D.; PAN, Y.; ZHAO, X.; ZHU, L.; FU, B.; LI, Z. Genome-wide temporal-spatial gene expression profiling of drought responsiveness in rice. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 1, 2011.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 1, p. 57-63, 2009.

WASSMANN, R.; JAGADISH, S. V. K.; HEUER, S.; ISMAIL, A.; REDONA, E.; SERRAJ, R.; SUMFLETH, K. Climate change affecting rice production: the physiological and agronomic basis for possible adaptation strategies. **Advances in agronomy**, v. 101, n. 1, p. 59-122, 2009.

WEATHERLEY, P. E. Studies in the water relations of the cotton plant. I. The field measurements of water deficits in leaves. **New Phytologist**, v. 49, n. 1, p. 81-97, 1950.

WERNER, T.; NEHNEVAJOVA, E.; KÖLLMER, I.; NOVÁK, O.; STRNAD, M.; KRÄMER, U.; SCHMULLING, T. Root-specific reduction of cytokinin causes enhanced root growth, drought tolerance, and leaf mineral enrichment in *Arabidopsis* and tobacco. **The Plant Cell Online**, v. 22, n. 12, p. 3905-3920, 2010.

WU, T. D.; NACU, S. Fast and SNP-tolerant detection of complex variants and splicing in short reads. **Bioinformatics**, v. 26, n. 7, p. 873-881, 2010.

WU, W.; CHENG, S. Root genetic research, an opportunity and challenge to rice improvement. **Field Crops Research**, v. 165, p. 111-124, 2014.



WU, X.; SHIROTO, Y.; KISHITANI, S.; ITO, Y.; TORIYAMA, K. Enhanced heat and drought tolerance in transgenic rice seedlings overexpressing OsWRKY11 under the control of HSP101 promoter. **Plant cell reports**, v. 28, n. 1, p. 21-30, 2009.

XIONG, J.; ZHANG, L.; FU, G.; YANG, Y.; ZHU, C.; TAO, L. Drought-induced proline accumulation is uninvolved with increased nitric oxide, which alleviates drought stress by decreasing transpiration in rice. **Journal of plant research**, v. 125, n. 1, p. 155-164, 2012.

XU, H.; GAO, Y.; WANG, J. Transcriptomic analysis of rice (*Oryza sativa*) developing embryos using the RNA-Seq technique. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. e30646, 2012.

XU, Z. Z.; ZHOU, G. S. Combined effects of water stress and high temperature on photosynthesis, nitrogen metabolism and lipid peroxidation of a perennial grass *Leymus chinensis*. **Planta**, v. 224, n. 5, p. 1080-1090, 2006.

YAMADA, K.; LIM, J.; DALE, J. M.; CHEN, H.; SHINN, P.; PALM, C. J.; SOUTHWICK, A. M.; WU, H. C.; KIM, C.; NGUYEN, M.; PHAM, P.; CHEUK, R.; KARLIN-NEWMANN, G.; LIU, S. X.; LAM, B.; SAKANO, H.; WU, T.; YU, G.; MIRANDA, M.; QUACH, H. L.; TRIPP, M.; CHANG, C. H.; LEE, J. M.; TORIUMI, M.; CHAN, M. M.; TANG, C. C.; ONODERA, C. S.; DENG, J. M.; AKIYAMA, K.; ANSARI, Y.; ARAKAWA, T.; BANH, J.; BANNO, F.; BOWSER, L.; BROOKS, S.; CARNINCI, P.; CHAO, Q.; CHOY, N.; ENJU, A.; GOLDSMITH, A. D.; GURJAL, M.; HANSEN, N. F.; HAYASHIZAKI, Y.; JOHNSON-HOPSON, C.; HSUAN, V. W.; IIDA, K.; KARNES, M.; KHAN, S.; KOESEMA, E.; ISHIDA, J.; JIANG, P. X.; JONES, T.; KAWAI, J.; KAMIYA, A.; MEYERS, C.; NAKAJIMA, M.; NARUSAKA, M.; SEKI, M.; SAKURAI, T.; SATOU, M.; TAMSE, R.; VAYSBERG, M.; WALLENDER, E. K.; WONG, C.; YAMAMURA, Y.; YUAN, S.; SHINOZAKI, K.; DAVIS, R. W.; THEOLOGIS, A.; ECKER, J. R. Empirical analysis of transcriptional activity in the Arabidopsis genome. **Science**, v. 302, n. 5646, p. 842-846, 2003.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 781-803, 2006.

YAMBAO, E. B.; INGRAM, K. T.; REAL, J. G. Root xylem influence on the water relations and drought resistance of rice. **Journal of Experimental Botany**, v. 43, n. 7, p. 925-932, 1992.

YOO, C. Y.; PENCE, H. E.; HASEGAWA, P. M.; MICKELBART, M. V. Regulation of transpiration to improve crop water use. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 28, n. 6, p. 410-431, 2009.

YOO, C. Y.; PENCE, H. E.; JIN, J. B.; MIURA, K.; GOSNEY, M. J.; HASEGAWA, P. M.; MICKELBART, M. V. The Arabidopsis GTL1 transcription factor regulates water use efficiency and drought tolerance by modulating stomatal density via transrepression of SDD1. **The Plant Cell Online**, v. 22, n. 12, p. 4128-4141, 2010.

YOSHIDA, S.; BHATTACHARJEE, D. P.; CABUSLAY, G. S. Relationship between plant type and root growth in rice. **Soil science and plant nutrition**, v. 28, n. 4, p. 473-482, 1982.

YU, C.; SUN, C.; SHEN, C.; WANG, S.; LIU, F.; LIU, Y.; GEISLER, M. The auxin transporter, OsAUX1, is involved in primary root and root hair elongation and in Cd stress responses in rice (*Oryza sativa* L.). **The Plant Journal**, v. 83, n. 5, p. 818-830, 2015.

YU, L.; CHEN, X.; WANG, Z.; WANG, S.; WANG, Y.; ZHU, Q.; XIANG, C. Arabidopsis Enhanced Drought Tolerance1/HOMEODOMAIN GLABROUS11 confers drought tolerance in transgenic rice without yield penalty. **Plant physiology**, v. 162, n. 3, p. 1378-1391, 2013.

ZARE, M. Evaluation of drought tolerance indices for the selection of Iranian barley (*Hordeum vulgare*) cultivars. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 93, p. 15975-15981, 2012.

ZHOU, S.; HU, W.; DENG, X.; MA, Z.; CHEN, L.; HUANG, C.; WANG, C.; WANG, J.; HE, Y.; YANG, G.; HE, G. Overexpression of the wheat aquaporin gene, TaAQP7, enhances drought tolerance in transgenic tobacco. **PLoS one**, v. 7, n. 12, p. e52439, 2012.

ZHOU, X. F.; JIN, Y. H.; YOO, C. Y.; LIN, X. L.; KIM, W. Y.; YUN, D. J.; JIN, J. B. CYCLIN H; 1 regulates drought stress responses and blue light-induced stomatal opening by inhibiting reactive oxygen species accumulation in Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 162, n. 2, p. 1030-1041, 2013.

ZHU, J.; BROWN, K. M.; LYNCH, J. P. Root cortical aerenchyma improves the drought tolerance of maize (*Zea mays* L.). **Plant, cell & environment**, v. 33, n. 5, p. 740-749, 2010.

ZUBAER, M. A.; CHOWDHURY, A. K. M. M. B.; ISLAM, M. Z.; AHMED, T.; HASAN, M. A. Effects of water stress on growth and yield attributes of Aman rice genotypes. **International Journal of Sustainable Crop Production**, v. 2, n. 6, p. 25-30, 2007.

## 8. ANEXOS

**Tabela anexo 1.** Massa fresca (g vaso<sup>-1</sup>) de parte aérea e raiz das variedades de arroz de sequeiro cultivadas em casa de vegetação sob condição controle e estresse hídrico.

Variedades	Folha		Colmo		Raiz		Raiz/PA	
	g vaso <sup>-1</sup>							
	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.
Bico Ganga	29,4aD	22,1bA	103,6aD	107,2aA	159,1aD	158,6aC	1,21aA	1,23aC
Catetão	39,8aC	18,3bB	133,0aC	65,6bC	199,9aC	173,0bC	1,16bA	2,05aA
Manteiga	37,8aC	17,4bB	126,8aC	80,0bC	226,3aB	154,4bC	1,38bA	1,58aB
Mira	47,6aB	28,0bA	170,7aB	106,4bA	197,2aC	167,3bC	0,90bB	1,25aC
Palha Murcha	60,7aA	20,3bA	182,0aA	76,3bC	285,5aA	156,9bC	1,17bA	1,65aB
Piauí	52,8aB	23,4bA	163,0aB	105,3bA	202,1bC	265,8aA	0,93bB	2,07aA
Prata Ligeiro	31,3aD	16,8bB	131,6aC	65,3bC	134,0aE	137,2aD	0,83bB	1,67aB
Quebra Cacho	39,4aC	23,4bA	159,6aB	89,3bB	239,6aB	198,2bB	1,20aA	1,76aB
Sempre Verde	43,1aC	21,5bA	183,2aA	100,4bA	138,4aE	158,4aC	0,61bC	1,30aC
Três meses	33,7aD	16,4bB	129,4aC	74,3bC	106,7aF	104,0aE	0,65bC	1,15aC
C.V%	12,96		7,84		8,24		10,52	

<sup>a</sup> Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey entre linhas e Scott-Knott entre colunas a  $p \leq 0,05$  de significância. Cont. = Controle; Est. = Estresse e P.A. = Parte aérea.

**Tabela anexo 2.** Massa fresca (g vaso<sup>-1</sup>) de raiz em duas profundidades (0 – 30 cm) e (30 – 130 cm) nas variedades de arroz de sequeiro cultivadas em casa de vegetação sob condição controle e estresse hídrico.

Variedades	Raiz (0 - 30)		Raiz (30 - 130)		T.M (0 - 30)	T.M (30 - 130)
	g vaso <sup>-1</sup>				%	
	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont./Est.	Cont./Est.
Bico Ganga	100,5aD	84,6aB	58,5bD	73,9aC	0	+ 26
Catetão	145,0aC	95,2bB	54,9bD	77,8aC	- 35	+ 41
Manteiga	163,4aB	102,8bB	62,9aC	51,6bD	- 38	0
Mira	118,9aD	87,0bB	78,3aB	80,3aB	- 27	0
Palha Murcha	194,2aA	83,0bB	91,3aA	73,9bC	- 58	- 20
Piauí	134,8aC	144,9aA	67,3bC	120,9aA	0	+ 79
Prata Ligeiro	104,0aD	78,3bB	30,0bE	59,0aD	0	+ 96
Quebra Cacho	148,5aC	127,6bA	91,2aA	70,6bC	0	- 22
Sempre Verde	86,7aE	84,8aB	51,7bD	73,6aC	0	+ 42
Três meses	82,3aE	68,9aB	24,4bE	35,1aE	0	+ 43
C.V%	11,96		10,62			

<sup>a</sup> Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey entre linhas e Scott-Knott entre colunas a  $p \leq 0,05$  de significância. Cont = Controle, Est. = Estresse, T.M = Taxa de Mudança.

**Tabela anexo 3.** Resumo dos principais índices de tolerância ao estresse utilizado.

Índices	Resultado	Equação	Referência
Índice de suscetibilidade ao estresse (SSI)	As variedades com menor índice são as mais tolerantes	$SSI = (1 - (Y_s/Y_p)) / (1 - (\hat{Y}_s/\hat{Y}_p))$	FISHER e MAURER, 1978
Índice de suscetibilidade ao estresse modificado (SSSI)	As variedades com menor índice são as mais tolerantes	$SSSI = (1 - (Y_s/Y_p)) - (1 - (\hat{Y}_s/\hat{Y}_p))$	SINGH et al., 2011
Índice de tolerância ao estresse (TOL)	As variedades com menor índice são as mais tolerantes	$TOL = Y_p - Y_s$	ROSIELLE e HAMBLIN, 1981
Índice de produtividade no estresse (DYI)	As variedades com menor índice são as mais tolerantes	$DYI = (Y_s/Y_p) / (\hat{Y}_s/\hat{Y}_p)$	RAMAN et al., 2012
Média geométrica de produtividade (GMP)	As variedades com maior valor são as mais tolerantes	$GMP = (Y_s \times Y_p)^{1/2}$	KRISTIN et al., 1997
Índice de tolerância ao estresse (STI)	As variedades com maior índice são as mais tolerantes	$STI = (Y_s \times Y_p) / (\hat{Y}_p)^2$	FERNANDEZ, 1992
Média de desempenho relativo (MRP)	As variedades com maior valor são as mais tolerantes	$MRP = (Y_s/\hat{Y}_s) + (Y_p/\hat{Y}_p)$	HOSSAIN et al., 1990
Índice de produtividade relativa (REI)	As variedades com maior índice são as mais tolerantes	$REI = (Y_s/\hat{Y}_s) \times (Y_p/\hat{Y}_p)$	HOSSAIN et al., 1990
Eficiência a tolerância a seca (DTE)	As variedades com maior valor são as mais tolerantes	$DTE = (Y_s / Y_p) \times 100$	FISCHER e WOOD, 1981

$Y_s$  = produção da variedade submetida ao estresse hídrico;  $Y_p$  = produção da variedade submetida ao tratamento controle;  $\hat{Y}_s$  = produção média de todas as variedades submetidas ao tratamento de estresse hídrico;  $\hat{Y}_p$  = produção média de todas as variedades submetidas ao tratamento controle.

**Tabela anexo 4.** Análise de Variância Multivariada (MANOVA) baseada nas características morfológicas e fisiológicas em dez variedades de arroz cultivadas em casa de vegetação submetidas ao tratamento controle e estresse hídrico. Consistência do padrão de agrupamento proporcionado pelas técnicas do vizinho mais próximo, vizinho mais distante, UPGMA e Ward em relação à distância de Mahalanobis (D2), para variáveis quantitativas, em função do coeficiente de correlação cofenética, e consistência via Mantel.

	Df	Wilks	approx F	numDf	denDf	Pr(>F)
accession	9	$1,0046 \cdot 10^{-19}$	30,033	252	46,857	$2,2 \cdot 10^{-16}$ ***
Residuals	30					

Coeficiente de Correlação COFENÉTICO (CCC)				
	Single linkage clustering	Complete linkage Clustering	Average Clustering	Ward clustering
D2	0,3707	0,5650	0,5731	0,5642

Consistência via Mantel (Mantel statistic r:)				
	Single linkage clustering	Complete linkage Clustering	Average Clustering	Ward clustering
D2	0,3707	0,5651	0,5732	0,5642
Signif:	0,025	0,001	0,001	0,001

**Tabela anexo 5.** Componentes principais (CP), autovalores ( $\lambda_i$ ) e porcentagem de variância explicada pelos componentes (% VCP) das características morfológicas e componentes de produtividade nas dez variedades de arroz submetidas ao tratamento controle e estresse hídrico durante o período reprodutivo em casa de vegetação.

Componente principal	Autovalores ( $\lambda_i$ )	%VCP	%VCP (acumulada)
CP <sub>1</sub>	4,53	45,33	45,33
CP <sub>2</sub>	2,54	25,44	70,77
CP <sub>3</sub>	1,18	11,87	82,65
CP <sub>4</sub>	0,60	6,04	88,69
CP <sub>5</sub>	0,38	3,85	92,54
CP <sub>6</sub>	0,35	3,50	96,05
CP <sub>7</sub>	0,16	1,67	97,72
CP <sub>8</sub>	0,14	1,44	99,16
CP <sub>9</sub>	0,07	0,75	99,91
CP <sub>10</sub>	0,01	0,08	100,00

**Tabela anexo 6.** Componentes principais (CP), autovalores ( $\lambda_i$ ) e porcentagem de variância explicada pelos componentes (% VCP) das características fisiológicas nas dez variedades de arroz submetidas ao tratamento controle e estresse hídrico durante o período reprodutivo em casa de vegetação.

Componente principal	Autovalores ( $\lambda_i$ )	%VCP	%VCP (acumulada)
CP <sub>1</sub>	3,22	46,03	46,03
CP <sub>2</sub>	2,44	34,89	80,93
CP <sub>3</sub>	0,81	11,58	92,51
CP <sub>4</sub>	0,34	4,82	97,34
CP <sub>5</sub>	0,09	1,41	98,75
CP <sub>6</sub>	0,05	0,78	99,53
CP <sub>7</sub>	0,03	0,47	100,00

**Tabela anexo 7.** Correlação de pearson para as características morfológicas: folha, colmo, raiz, panícula, tamanho, perfilho, profundidade, produção, massa de 100 grãos, esterelidade da espigeta e índice de colheita (IC).

Variáveis	Folha	Colmo	Raiz	Panícula	Tamanho	Perf. Prof.	Prod. M. 100gr.	E. Esp.	IC		
Folha	<b>1,00</b>										
Colmo	<b>0,72</b>	<b>1,00</b>									
Raiz	<b>0,65</b>	<b>0,45</b>	<b>1,00</b>								
Panícula	0,28	0,34	0,25	<b>1,00</b>							
Tamanho	<b>0,78</b>	<b>0,66</b>	<b>0,56</b>	0,23	<b>1,00</b>						
Perfilhos	-0,14	0,23	0,05	<b>0,68</b>	-0,13	<b>1,00</b>					
Prof.	-0,05	-0,21	0,17	-0,19	0,17	-0,23	<b>1,00</b>				
Prod.	0,40	<b>0,50</b>	<b>0,54</b>	<b>0,73</b>	0,40	<b>0,56</b>	-0,03	<b>1,00</b>			
M. 100gr	<b>0,46</b>	0,42	0,37	0,32	0,41	0,09	-0,06	<b>0,64</b>	<b>1,00</b>		
E. Esp.	-0,26	-0,21	-0,41	-0,33	-0,38	-0,22	-0,30	<b>-0,73</b>	<b>-0,68</b>	<b>1,00</b>	
IC	-0,30	-0,21	0,10	<b>0,50</b>	-0,18	<b>0,53</b>	0,04	<b>0,69</b>	0,37	<b>-0,61</b>	<b>1,00</b>

\* Os valores em negrito são diferentes de 0 com um nível de significância  $\alpha = 0,05$

**Tabela anexo 8.** Correlação de pearson para as características fisiológicas: teor relativo de água (TRA), extravasamento de eletrólitos (EE), peroxidação de lipídeos (MDA), proteína, índice SPAD, clorofila a (Chla), clorofila b (Chlb) e carotenóides (caroten.).

Variáveis	TRA	EE	MDA	Proteína	SPAD	Chla	Chlb	Caroten.
TRA	<b>1,00</b>							
EE	<b>-0,95</b>	<b>1,00</b>						
MDA	<b>-0,66</b>	<b>0,59</b>	<b>1,00</b>					
Proteína	-0,01	0,01	0,30	<b>1,00</b>				
SPAD	0,30	-0,25	<b>-0,53</b>	0,17	<b>1,00</b>			
Chla	0,01	0,02	0,13	-0,15	0,22	<b>1,00</b>		
Chlb	0,05	-0,03	0,23	0,06	0,22	<b>0,88</b>	<b>1,00</b>	
Carotenóides	0,13	-0,12	0,06	-0,17	0,15	<b>0,92</b>	<b>0,88</b>	<b>1,00</b>

\* Os valores em negrito são diferentes de 0 com um nível de significância  $\alpha = 0,05$

**Tabela anexo 9.** Massa fresca (g vaso<sup>-1</sup>) de parte aérea, raiz e razão raiz parte aérea das variedades Catetão, Mira, Piauí e Quebra Cacho submetidas a tratamento controle e estresse hídrico durante 14 dias.

Variedades	Parte aérea		Raiz		Raiz/PA	
	Cont.	Est.	Cont.	Est.	Cont.	Est.
Catetão	1,36aB	0,64bAB	0,70aB	0,43bA	0,52bA	0,67aA
Mira	1,33aB	0,47bB	0,73aB	0,35bA	0,55bA	0,74aA
Piauí	1,66aA	0,60bAB	0,73aB	0,34bA	0,44bA	0,57aB
Quebra Cacho	1,74aA	0,70bA	0,90aA	0,43bA	0,52bA	0,61aB
C.V%	13,07		13,19		10,32	

<sup>a</sup> Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey  $p \leq 0,05$  de significância. Cont. = Controle e Est. = Estresse.

**Tabela anexo 10.** Parâmetros referentes ao mapeamento, trimagem e contagem das reads obtidas após o sequenciamento do RNA em raízes das variedades Catetão e Mira às 2 e 12h após a aplicação de 20% de PEG. O Genoma de Índica foi utilizado como referência para o mapeamento.

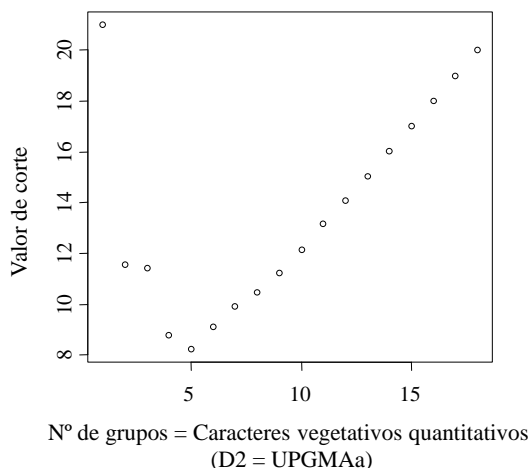
Parâmetros	Catetão controle			Catetão estresse		Mira controle			Mira estresse	
	0h	2h	12h	2h	12h	0h	2h	12h	2h	12h
<b>Reads</b>	29143710,0	29144537,3	29590056,0	29617752,7	29794171,3	29275139,7	28710318,7	30043388,7	30052371,0	31084879,7
<b>Trimmed FastQ</b>	28581000,3	28560306,0	29024813,3	29046716,3	29189080,0	28601211,3	28107974,0	29406060,0	29427887,7	30434529,3
<b>% Perda</b>	1,9	2,0	1,9	1,9	2,0	2,3	2,1	2,1	2,1	2,1
Reads mapeadas	12171921,3	12195551,0	12691846,3	12818495,3	12960894,7	12327224,3	11980972,3	12832948,0	12662373,7	13070368,0
Reads sem padrão	14252423,0	14063133,7	14100606,0	13975278,3	13893115,0	13836798,7	13939612,0	14247989,0	14456529,0	14888311,7
Reads ambíguas	1,3	1,0	1,0	1,0	1,3	0,0	0,7	0,3	0,0	0,0
<b>Reads mapeadas no GSNAP</b>	26424345,7	26258685,7	26792453,3	26793774,7	26854011,0	26164023,0	25920585,0	27080937,3	27118902,7	27958679,7
<b>% Perda do mapeamento</b>	7,5	8,1	7,7	7,8	8,0	8,5	7,8	7,9	7,9	8,1
<b>Reads sem padrão no HTSEQ</b>	14252423,0	14063133,7	14100606,0	13975278,3	13893115,0	13836798,7	13939612,0	14247989,0	14456529,0	14888311,7
<b>% Perda</b>	53,9	53,5	52,6	52,2	51,8	52,9	53,8	52,5	53,3	53,2

**Tabela anexo 11.** Consistência do genoma de índica mapeado de acordo com o número de reads.

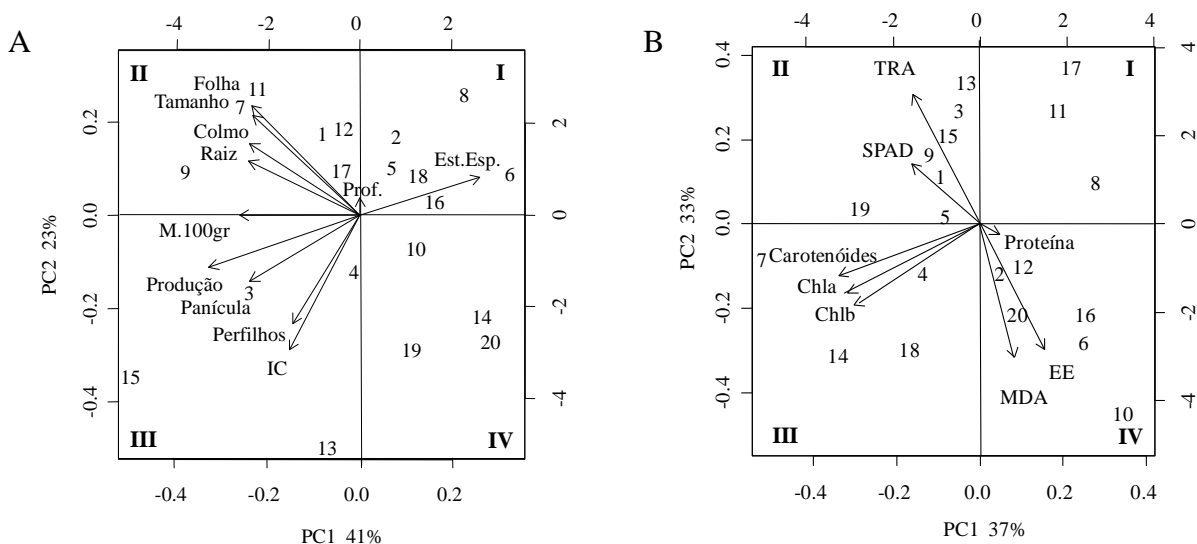
Reads	Catetão controle			Catetão estresse		Mira controle			Mira estresse	
	0h	2h	12h	2h	12h	0h	2h	12h	2h	12h
1	77,4	77,2	77,2	77,1	76,3	75,3	76,5	76,3	76,0	75,3
3	89,2	89,3	89,5	89,0	89,1	88,6	89,4	89,7	89,1	88,0
5	91,2	91,4	91,2	90,9	91,1	90,7	91,2	91,5	90,8	90,2
10	92,3	92,7	92,8	92,0	92,7	92,1	92,3	93,1	92,1	91,5
30	92,4	93,1	93,0	92,6	93,1	92,3	92,6	93,1	92,5	92,0
50	92,4	92,4	92,5	92,2	92,8	91,6	92,6	93,2	91,6	91,5
75	91,9	92,4	92,1	92,4	92,2	91,2	92,0	92,6	91,3	91,3
100	91,0	92,0	91,6	92,2	91,9	90,4	91,8	92,2	91,1	90,9

**Tabela anexo 12.** Percentual do genoma de índica mapeado de acordo com o número de reads.

Reads	Catetão controle			Catetão estresse		Mira controle			Mira estresse	
	0h	2h	12h	2h	12h	0h	2h	12h	2h	12h
1	41,0	40,8	40,8	41,0	41,2	41,0	40,7	40,7	40,6	41,2
3	37,1	37,1	37,0	37,0	37,3	37,1	36,9	37,0	36,6	37,3
5	35,4	35,5	35,2	35,1	35,5	35,4	35,2	35,3	34,7	35,6
10	32,9	33,0	32,8	32,2	33,0	32,8	32,6	32,9	32,1	33,0
30	27,8	28,0	27,9	26,8	28,0	27,9	27,6	28,1	26,8	28,1
50	25,0	25,1	25,0	23,8	25,2	25,0	24,9	25,3	23,8	25,2
75	22,5	22,6	22,5	21,3	22,7	22,5	22,3	22,8	21,2	22,8
100	20,5	20,7	20,7	19,4	20,7	20,6	20,5	20,9	19,4	20,9

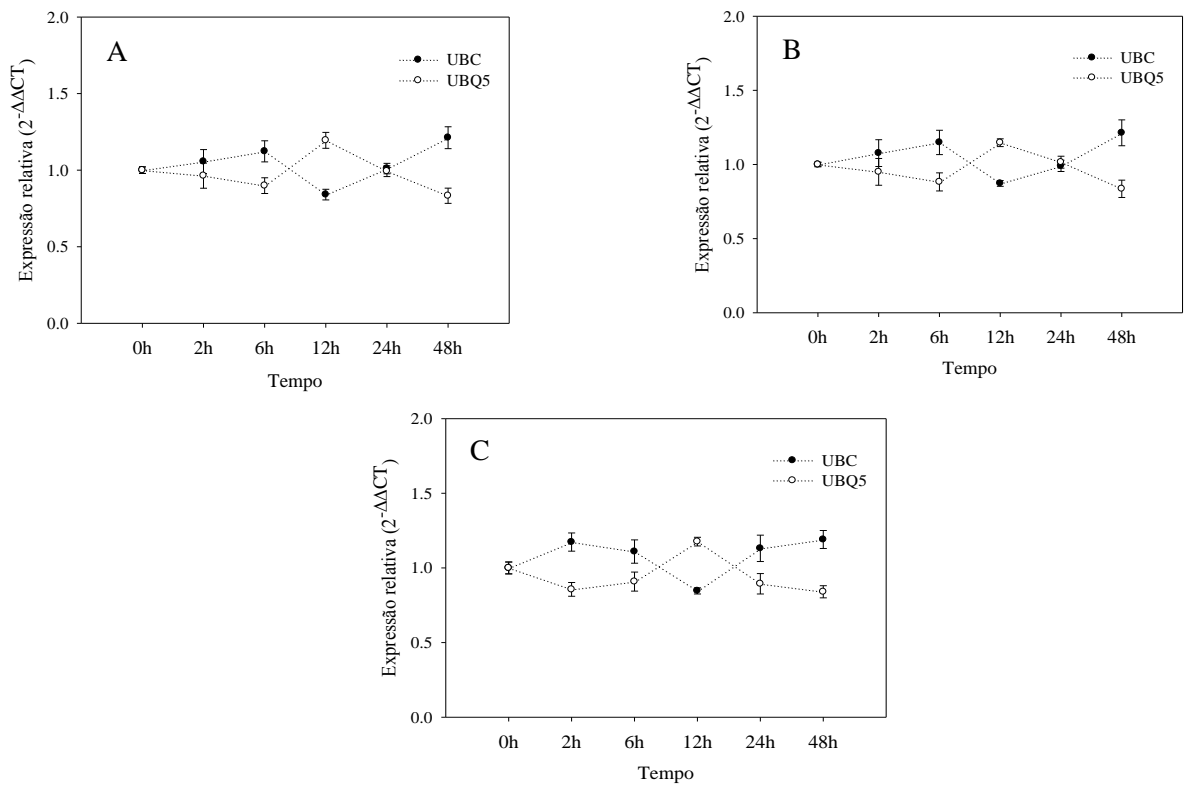


**Figura anexo 1.** Análise do número de grupos baseado no agrupamento pelo método UPGMA utilizando o pacote MapTree no programa R.

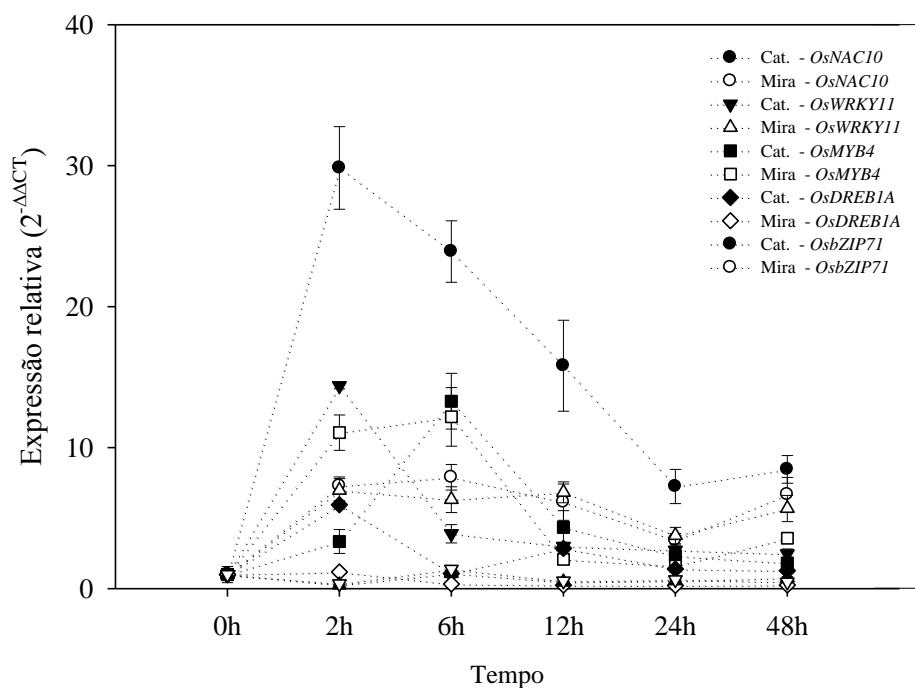


**Figura anexo 2.** Análise de componente principal baseado nas características morfológicas e componentes de produtividade (A) e características fisiológicas (B) em dez variedades de arroz de sequeiro cultivadas em casa de vegetação e submetidas ao tratamento controle e estresse hídrico durante o período reprodutivo. 1, 2 - Bico Ganga Controle/Estresse.; 3, 4 - Catetão Controle/Estresse; 5, 6 - Manteiga Controle/Estresse; 7, 8 - Mira Controle/Estresse; 9, 10 - Palha Murcha Controle/Estresse; 11, 12 - Piauí Controle/Estresse; 13, 14 - Prata Ligeiro Controle/Estresse; 15, 16 - Quebra Cacho Controle/Estresse; 17, 18 - Sempre Verde Controle/Estresse e 19, 20 - Três Meses Controle/Estresse.





**Figura anexo 3.** Expressão relativa dos genes da UBC e UBQ5 ao longo do tempo. Genes utilizados como controle endógeno no experimento V. Coletas foram realizadas às 0, 2, 6, 12, 24 e 48h após a aplicação de 20% de PEG (n = 4). As letras A, B e C representam três repetições técnicas.



**Figura anexo 4.** Agrupamento da expressão relativa dos fatores de transcrição das famílias NAC, ZF, MYB, AREB/ABF e AP2/ERF nas variedades Catetão e Mira para identificação dos tempos de maior alteração na expressão de genes relacionados a tolerância ao estresse hídrico. Coletas foram realizadas às 0, 2, 6, 12, 24 e 48h após a aplicação de 20% de PEG. Valores representam a razão entre o controle e estresse dentro de cada tempo (n = 4). Os genes da UBC e da UBQ5 foram utilizados como controle endógeno.