

CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE ARROZ
(*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) IMPORTANTES PARA A TOLERÂNCIA
AO FRIO NA FASE DE GERMINAÇÃO**

Andressa Dametto

Lajeado, janeiro de 2015

Andressa Dametto

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE ARROZ
(*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) IMPORTANTES PARA A TOLERÂNCIA
AO FRIO NA FASE DE GERMINAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro Universitário UNIVATES, como parte da exigência para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, na linha de pesquisa Produção Primária de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Raul Antonio Sperotto

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Janette Palma Fett

Lajeado, janeiro de 2015

Andressa Dametto

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE ARROZ
(*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) IMPORTANTES PARA A TOLERÂNCIA
AO FRIO NA FASE DE GERMINAÇÃO**

A Banca examinadora abaixo aprova a Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro Universitário UNIVATES, como parte da exigência para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, na linha de pesquisa Produção Primária de Alimentos.

Prof. Dr. Raul Antonio Sperotto - Orientador
Centro Universitário UNIVATES

Prof^a. Dr^a. Janette Palma Fett - Coorientadora
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
(UFRGS)

Prof. Dr. Walter Orlando Beys da Silva
Centro Universitário UNIVATES

Prof. Dr. Vanderlei Biolchi
Centro Universitário UNIVATES

Prof. Dr. Felipe dos Santos Maraschin
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
(UFRGS)

Lajeado, janeiro de 2015

Dedico este trabalho

Aos meus pais, José e Santinha,
e ao meu irmão, Andriago.

O apoio de vocês foi muito importante nesta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Em especial ao Prof. Dr. Raul Antonio Sperotto, meu orientador, pela disponibilidade, compreensão, confiança e inúmeras contribuições. És um exemplo de pesquisador, professor e coordenador de equipe a ser seguido.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo fornecimento da bolsa de mestrado.

Ao Centro Universitário UNIVATES, instituição à qual a pesquisa está vinculada.

Ao corpo docente, coordenação e funcionários do Programa de Pós Graduação Mestrado em Biotecnologia do Centro Universitário UNIVATES, pelos ensinamentos, pela estrutura de apoio e a eficiência em esclarecer dúvidas.

Ao Prof. Dr. André Jasper e bolsistas do Setor de Paleobotânica do Centro Universitário UNIVATES, pelo empréstimo da câmera e estereomicroscópio para aquisição de algumas imagens deste trabalho.

Ao Departamento de Fisiologia Vegetal da UFRGS, pela parceria, disponibilidade e apoio para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Anatomia Vegetal da UFRGS e Laboratório de Biotecnologia do IRGA pelos materiais e estrutura concedidos.

À todos os colegas da Turma II do mestrado. Durante nossa jornada aprendemos muito uns com os outros e formamos amizades muito especiais.

À todos os bolsistas e colegas do grupo de pesquisa do arroz, Édina Aparecida dos Reis Blasi, Cláudia Stein, Ronise Zeni, Eduardo Martins Souza e

Gisele Buffon, pela motivação, amizade, companheirismo, troca de ideias e ensinamentos. Foi muito bom estar ao lado de vocês durante esta trajetória.

Às funcionárias do Laboratório de Biotecnologia e Laboratório de Biologia Molecular do Centro Universitário UNIVATES, que sempre estiveram dispostas a auxiliar na manipulação de equipamentos e materiais.

Aos demais grupos de pesquisa que também utilizam os Laboratórios de Biotecnologia e de Biologia Molecular do Centro Universitário UNIVATES pelo bom ambiente de trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Elisete Maria de Freitas por ter me incentivado a fazer o mestrado. Foi você que me instigou e plantou a primeira sementinha do querer ir além e buscar novos desafios. Agora, após dois anos, aqui estou... finalizando esta etapa.

À minha família, por ter me proporcionado a oportunidade de estudo. Por sempre acreditar na minha capacidade, apoiar minhas escolhas e me fazer acreditar que obstáculos podem ser superados.

À todos os amigos verdadeiros que me apoiaram de alguma forma.

RESUMO

O arroz é uma das culturas mais importantes do mundo. No entanto, sua produtividade é muito afetada por diferentes estresses abióticos, incluindo a baixa temperatura, que pode ser prejudicial durante todas as fases de desenvolvimento, desde a germinação até o enchimento dos grãos. Durante a germinação, os sintomas mais comuns dos danos provocados pela baixa temperatura são o atraso e a menor porcentagem de germinação das sementes. No sul do Brasil, a maioria das cultivares de arroz pertence à subespécie *indica*, que apresenta germinação lenta e não uniforme em baixas temperaturas, resultando em plantações irregulares. A fim de identificar e caracterizar novos genes envolvidos na tolerância ao frio durante a fase de germinação, foram realizadas análises transcricionais (RNAseq) de dois genótipos de arroz da subespécie *indica* (linhagens irmãs previamente identificadas como tolerante e sensível ao frio) sob tratamento com baixas temperaturas (germinação à 13°C por 7 dias). Foram detectadas 1.361 sequências diferencialmente expressas. Destas, 758 sequências (56%) mostraram-se mais expressas no genótipo tolerante ao frio, enquanto que 603 (44%) mostraram-se mais expressas no genótipo sensível ao frio. Análises posteriores por RT-qPCR de onze sequências selecionadas foram utilizadas para confirmar a elevada qualidade dos resultados do RNAseq. Este estudo revelou que vários processos são mais ativos no genótipo tolerante, incluindo taxas de divisão celular e de crescimento, integridade e extensibilidade da parede celular, absorção de água e capacidade de transporte de membrana, síntese de sacarose, geração de açúcares simples, insaturação de ácidos graxos de membrana, biossíntese de cera, capacidade antioxidante e sinalização por hormônios e Ca^{+2} , levando à adaptação e tolerância ao frio. Por outro lado, o genótipo sensível ao frio responde à baixa temperatura aumentando a síntese de proteínas de choque térmico (HSPs) e deidrininas, além de apresentar uma maior taxa de degradação proteica via ubiquitina/proteassoma e biossíntese de poliaminas. Nossos resultados revelaram características de expressão gênica no processo de germinação sob condições de estresse à baixa temperatura que podem ser úteis em futuras abordagens biotecnológicas visando a tolerância ao frio em arroz.

Palavras-chave: atividade antioxidante, divisão celular, expressão gênica, homeostase iônica, resposta à estresse, RNAseq.

ABSTRACT

Rice is one of the most important crops in the world. However, productivity is greatly affected by different abiotic stresses, including low temperature which can be harmful during all developmental stages of rice plants, from germination to grain filling. During germination, the most common symptoms of cold temperature damage are delayed and lower percentage of germination. In southern Brazil, most rice cultivars belong to *indica* subspecies, which present slow and not uniform germination under cold temperature, resulting in irregular crop establishment. In order to identify and characterize novel genes involved in rice cold tolerance during the germination stage, we used two *indica* rice genotypes (sister lines previously identified as cold-tolerant and cold-sensitive) in parallel transcriptomic analysis (RNAseq) under cold treatment (germination at 13 °C for 7 days). We detected 1,361 differentially expressed sequences. From these, 758 sequences (56%) showed higher expression in the cold-tolerant genotype, while 603 (44%) showed lower expression in the cold-sensitive genotype. Further analysis by quantitative RT-PCR of eleven selected sequences was used to confirm the high-quality of RNAseq results. This study revealed that several processes are more active in the cold-tolerant genotype, including cell division and growth rates, cell wall integrity and extensibility, water uptake and membrane transport capacity, sucrose synthesis, generation of monosaccharides, unsaturation of membrane fatty acids, wax biosynthesis, antioxidant capacity, and hormone and Ca⁺²-signaling, which ultimately lead to cold adaptation and tolerance. On the other hand, the cold-sensitive cultivar responds to low temperature stress increasing the synthesis of heat shock proteins (HSPs) and dehydrins, along with enhanced ubiquitin/proteasome protein degradation pathway and polyamine biosynthesis. Our findings revealed the gene expression characteristics in the process of germination under low temperature stress conditions, and can be useful in future biotechnological approaches aiming to cold stress tolerance in rice.

Keywords: antioxidant activity, cell division, gene expression, ionic homeostasis, stress response, RNAseq.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Mapa da produção agrícola de arroz no Brasil..... | 23 |
| Figura 2 - Exportação brasileira de arroz | 24 |
| Figura 3 - Partes da semente de arroz | 25 |
| Figura 4 - Fases da germinação da semente de arroz | 26 |
| Figura 5 - Tecnologia do RNAseq | 38 |
| Figura 6 - Distribuição das leituras..... | 51 |
| Figura 7 - Categorias enriquecidas encontradas nos genótipos tolerante e sensível ao frio usando o <i>Gene Ontology</i> | 52 |
| Figura 8 - Confirmação do RNAseq por RT-qPCR | 60 |
| Figura 9 - Localização histoquímica <i>in situ</i> de radical superóxido (O_2^-) | 61 |
| Figura 10 - Localização histoquímica <i>in situ</i> de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) | 61 |
| Figura 11 - Acúmulo de prolina nos coleótilos das sementes dos genótipos tolerante e sensível ao frio | 62 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Seleção dos genes possivelmente envolvidos com a tolerância ao frio ...53

Tabela 2 - Genes selecionados para a confirmação da expressão gênica utilizando RT-qPCR e seus respectivos *primers* específicos58

Tabela 3 - Sequências com potencial biotecnológico de marcador molecular de tolerância ao frio em arroz da subespécie *indica*77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------|---|
| ABA | Ácido abscísico |
| AGEITEC | Agência Embrapa de Informação Tecnológica |
| AP2 | <i>APETALA2</i> |
| AP2/EREBP | <i>APETALA2/ethylene response element-binding protein</i> |
| AREBs | <i>ABA-responsive element-binding protein</i> |
| ARS | <i>ABA-stress-ripening</i> |
| CAM | <i>Calmodulin</i> |
| CBF/DREB1 | <i>C-repeat binding factors/ dehydration-responsive element-binding protein 1</i> |
| CDKs | <i>Cyclin-dependent kinases</i> |
| CDPKs | <i>Calcium/calmodulin dependent protein kinases</i> |
| CONAB | Companhia Nacional de Abastecimento |
| CSL | <i>Cellulose synthase-like</i> |
| Ct | <i>CycleThreshold</i> |
| DAB | <i>Diaminobenzidine</i> |
| DREB | <i>Dehydration-responsive element-binding protein</i> |
| EREBP | <i>Ethylene response element-binding protein</i> |

| | |
|-------------------------------|--|
| EROs | Espécies reativas de oxigênio |
| FAO | <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> |
| FT | Fatores de transcrição |
| GO | <i>Gene Ontology</i> |
| GSTZs | Glutathionas transferases |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrogênio |
| HSPs | <i>Heat shock protein</i> |
| HyPRP | <i>Hybrid proline-rich proteins</i> |
| IRGA | Instituto Rio-Grandense do Arroz |
| LEA | <i>Late Embryogenesis Abundant</i> |
| MDA | <i>Malondialdehyde</i> |
| MLG | <i>Mixed-linkage glucan</i> |
| MTs | <i>Metallothioneins</i> |
| NACs | <i>NAM, ATAF and CUC</i> |
| NBT | <i>Nitro blue tetrazolium</i> |
| O ₂ ⁻ | Radical superóxido |
| OsAQU | <i>Aquaporin protein</i> |
| OsAUX | <i>OsIAA13 - Auxin-responsive Aux/IAA gene family member</i> |
| OsCDKB2;1 | <i>Cyclin-dependent kinase B2-1</i> |
| OsCOIN | <i>Oryza sativa cold-inducible</i> |
| OsCSLE1 | <i>Cellulose synthase-like family E</i> |
| OsCYC | <i>Cyclin</i> |
| OsDHN | <i>Dehydrin</i> |
| OsEXD | <i>Expressed protein</i> |

| | |
|------------|--|
| OsFBX221 | <i>F-box domain containing protein</i> |
| OsKET | <i>3-ketoacyl-CoA synthase</i> |
| OsLEA | <i>Late embryogenesis abundant protein, group 3</i> |
| OsMYB3R-2 | <i>Oryza sativa R1R2R3 MYB-2</i> |
| OsNAC5 | <i>Oryza sativa, NAM, ATAF and CUC 5</i> |
| OsNAC6 | <i>Oryza sativa, NAM, ATAF and CUC 6</i> |
| OsPRX | <i>Peroxidase precursor</i> |
| OsRAN2 | <i>Oryza sativa, Ras-related nuclear protein 2</i> |
| OsUBQ5 | Ubiquitina 5 |
| PSK | <i>Phytosulfokine</i> |
| QTLs | Lócus controladores de características quantitativas |
| RLKs | <i>Receptor-like protein kinases</i> |
| RT-qPCR | PCR em Tempo Real |
| SAMDC | S-adenosil-L methioninede carboxilase |
| Secex/MDIC | Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior |
| SNAC2 | <i>STRESS-RESPONSIVE NAC 2</i> |
| SNAC2 | <i>STRESS-RESPONSIVE NAC 2</i> |
| Tm | Temperatura de <i>melting</i> |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 16 |
| 1.1 Tema..... | 17 |
| 1.2 Problema | 18 |
| 1.3 Objetivos | 18 |
| 1.3.1 Objetivo geral | 18 |
| 1.3.2 Objetivos específicos | 18 |
| 1.4 Justificativa | 19 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 21 |
| 2.1 Produção e consumo do arroz | 21 |
| 2.2 Germinação do arroz | 25 |
| 2.3 Vias de sinalização dos estresses abióticos em arroz..... | 29 |
| 2.4 Alterações visuais e fisiológicos do frio no arroz | 31 |
| 2.5 Genes de arroz ativados por baixas temperaturas | 32 |
| 2.6 Obtenção de plantas tolerantes ao frio | 35 |
| 2.7 RNAseq ou sequenciamento em grande escala (<i>deep sequencing</i>) | 37 |
| 3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS | 41 |
| 3.1 Colaboradores do trabalho | 41 |
| 3.2 Ambiente de pesquisa | 42 |
| 3.3 Procedimentos técnicos | 43 |
| 3.3.1 Identificação de genótipos de arroz tolerantes e sensíveis ao frio | 43 |
| 3.3.2 Germinação e coleta de amostras | 43 |
| 3.3.3 Extração de RNA e sequenciamento em grande escala (<i>deep sequencing</i>)..... | 44 |
| 3.3.4 Análises de bioinformática | 44 |
| 3.3.5 Categorização <i>Gene Ontology</i> (GO) para comparar os transcriptomas dos genótipos tolerante e sensível ao frio | 45 |
| 3.3.6 Seleção de genes..... | 45 |
| 3.3.7 Confirmação da expressão gênica por RT-qPCR | 46 |
| 3.3.8 Análises fisiológicas | 47 |
| 3.3.8.1 Localização histoquímica <i>in situ</i> de radical superóxido (O ₂ ⁻) e | |

| | |
|--|-----------|
| peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) | 47 |
| 3.3.8.2 Avaliação do acúmulo de prolina..... | 47 |
| 3.3.9 Sequenciamento de um gene que codifica a glutathione transferase 2.. | 48 |
| 3.3.10 Análises estatísticas | 49 |
| | |
| 4 RESULTADOS | 50 |
| 4.1 <i>Deep sequencing</i> dos genótipos tolerante e sensível à baixa temperatura..... | 50 |
| 4.2 Comparação entre os transcriptomas dos genótipos tolerante e sensível usando a categorização do <i>Gene Ontology</i> | 51 |
| 4.3 Caracterização dos genes diferencialmente expressos..... | 53 |
| 4.4 Confirmação dos padrões de expressão do RNAseq utilizando RT-qPCR..... | 58 |
| 4.5 Localização histoquímica <i>in situ</i> de radical superóxido (O ₂ ⁻) e peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) | 60 |
| 4.6 Acúmulo de prolina livre nos coleótilos das sementes germinadas no frio..... | 62 |
| | |
| 5 DISCUSSÃO | 63 |
| 5.1 Bibliotecas dos genótipos tolerante e sensível à baixa temperatura..... | 63 |
| 5.2 Comparação dos transcriptomas tolerante e sensível utilizando a categorização do <i>Gene Ontology</i> (GO) | 64 |
| 5.3 Caracterização dos genes diferencialmente expressos | 64 |
| 5.4 Confirmação das sequências do RNAseq usando RT-qPCR..... | 81 |
| 5.5 Comparação do acúmulo de prolina livre entre os genótipos tolerante e sensível ao frio | 81 |
| | |
| 6 CONCLUSÃO..... | 83 |
| | |
| 7 CONTINUIDADE DO TRABALHO | 85 |
| | |
| REFERÊNCIAS..... | 86 |

1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais importantes e consumidos no mundo, contribuindo com a nutrição de pessoas de todas as classes sociais. Sua importância se destaca principalmente nos países em desenvolvimento, desempenhando papel estratégico no âmbito social e econômico (FAO, 2013). A produção mundial anual é de aproximadamente 610 milhões de toneladas, e o Brasil ocupa uma posição de destaque nesse cenário, sendo o nono maior produtor mundial deste cereal e o maior produtor entre os países não-asiáticos (<http://irri.org/>).

O Rio Grande do Sul é o estado que mais produz arroz no Brasil, sendo que em 2013 foi responsável por 66,9% da produção nacional, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2013). A produção no estado poderia ser ainda maior se não fosse a ocorrência de noites com baixas temperaturas no período de plantio, nos meses de outubro e novembro. Ao contrário de outros cereais, como trigo e cevada, as plantas de arroz têm alta sensibilidade ao frio por serem de um grupo vegetal com origem tropical. Desta forma, a germinação da semente é prejudicada, afetando o seu desenvolvimento e produtividade (CRUZ et al., 2013).

Existem alguns genótipos que possuem maior capacidade de desenvolvimento sob baixas temperaturas quando comparados com outros da mesma espécie. Estes são classificados como genótipos tolerantes ao frio (SANGHERA et al., 2011). Na cultura de arroz, a subespécie *japonica* apresenta os

genótipos com os maiores índices de tolerância ao frio, porém, possuem também outros genes que geram grãos curtos e arredondados, menos aceitos pelos consumidores brasileiros, tornando-se comercialmente pouco atrativos no nosso mercado (MACKILL; LEI, 1997). Os fatores de aceitação mais importantes para os consumidores são a aparência e o aroma do arroz, revelando a importância do plantio de cultivares que apresentem estas características desejáveis (ZHOU et al., 2002; MEULLENET et al., 2007). Por isso, a maior parte do arroz cultivado no Brasil pertence à subespécie *indica*, que apresenta grãos finos e longos, com alto rendimento. Na sua grande maioria, as plantas de arroz desta subespécie são sensíveis ao frio (LOPES et al., 2008), entretanto, estudos apontam que dentro das subespécies existe variabilidade quanto a este aspecto (CRUZ; MILACH, 2004).

Considerando os aspectos agrícolas e comerciais, surge a interrogativa de como diminuir os impactos causados pelo frio e aumentar a produção de grãos no Rio Grande do Sul e em outros locais onde ocorre este fator climático. A utilização de técnicas de transgenia, ferramentas que permitem a introdução ou interrupção de sequências específicas de DNA, é uma forma bastante promissora para melhorar a tolerância à baixa temperatura na cultura do arroz, permitindo o estabelecimento adequado da cultura (TAKESAWA et al., 2002; CRUZ; MILACH, 2004; SANGHERA et al., 2011). Para tanto, é necessário identificar os genes que são responsáveis por desencadear a tolerância/sensibilidade a este estresse e elucidar os mecanismos que atuam na proteção da planta. A análise de expressão gênica diferencial tem colaborado para facilitar a identificação destes genes potencialmente envolvidos no mecanismo de tolerância à baixa temperatura (GAO; CHAO; LIN, 2008) e podem ser utilizados posteriormente como marcadores moleculares em processos biotecnológicos.

1.1 Tema

Identificação de genes e mecanismos moleculares responsáveis pela tolerância ao frio na subespécie *indica*, utilizando um par de genótipos de arroz com

background genético semelhante, porém contrastantes quanto à tolerância e sensibilidade ao frio na fase de germinação.

1.2 Problema

A subespécie de arroz mais cultivada no Brasil é a *indica*, pois apresenta grãos com características mais desejáveis comercialmente ao mercado ocidental. Porém, as plantas são normalmente mais sensíveis ao frio, o que acarreta queda na produtividade e aumento no uso de insumos químicos, necessitando o desenvolvimento de alternativas para minimizar estes impactos na produção.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo Geral

Identificar e caracterizar genes relacionados à tolerância ao frio na fase de germinação do arroz da subespécie *indica*, para posterior uso em abordagens biotecnológicas visando a tolerância ao frio e para conhecer as diferenças no mecanismo fisiológico entre as plantas.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Analisar a expressão gênica diferencial entre as sementes de genótipos de arroz da subespécie *indica*, com graus contrastantes de tolerância ao frio, germinadas em baixas temperaturas;
- Selecionar genes possivelmente envolvidos na tolerância ao frio na fase de

germinação, com base na sua expressão gênica diferencial encontrada no sequenciamento em grande escala;

- Confirmar os diferentes níveis de expressão de alguns genes candidatos potencialmente envolvidos na tolerância ao frio;

- Investigar, através de análises fisiológicas, alguns mecanismos de proteção ao frio presentes no genótipo tolerante.

1.4 Justificativa

O frio é considerado um obstáculo para obtenção de uma maior produção de grãos de arroz no Rio Grande do Sul, visto que a ocorrência de noites com baixas temperaturas nos meses de outubro e novembro, que corresponde ao período de plantio, prejudica a germinação da semente por causa da temperatura da água e do solo que frequentemente encontra-se abaixo de 15°C (ZHANG et al., 2005). A semeadura ocorre neste período para que a fase de enchimento dos grãos coincida com o período de maior incidência de luz no Estado, possibilitando espiguetas com maior qualidade. A ocorrência de falhas na germinação impede o desenvolvimento adequado da plântula, conduzindo à heterogeneidade da lavoura com consequente perda no rendimento dos grãos (ANDAYA; MACKILL, 2003). O crescimento mais lento da planta influencia também no aumento de custos com produtos químicos, uma vez que os mesmos acabam perdendo sua eficiência devido ao seu tempo hábil de reação. De acordo com SHINADA et al. (2013), áreas com alta latitude ou alta altitude sofrem ainda mais com este fator climático. A temperatura mais favorável para o desenvolvimento da cultura está entre 25°C e 30°C (YOSHIDA, 1981; CRUZ; MILACH, 2004).

Diversas pesquisas têm demonstrado que muitas alterações fisiológicas e moleculares ocorrem durante a tentativa de aclimação ao frio, sendo que diversas vias metabólicas são alteradas com o estresse (CRUZ; MILACH, 2004). As vias que levam à tolerância ao frio são bastante complexas, havendo necessidade de um

melhor entendimento dos mecanismos moleculares e fisiológicos envolvidos (CRUZ et al., 2013). Vários genes relacionados à tolerância ao frio já foram identificados. No entanto, a maioria dos estudos utilizou genótipos da subespécie *japonica*. Como no Brasil a subespécie *indica* é a mais cultivada, e considerando-se que há variabilidade de tolerância ao frio dentro da subespécie, a identificação e caracterização de genes envolvidos na tolerância à baixa temperatura originários do próprio grupo *indica* é ideal para a geração de genótipos tolerantes ao frio a serem cultivados no Rio Grande do Sul, visto que cruzamentos entre as subespécies *japonica* e *indica* podem resultar em problemas de fertilidade e passagem de características indesejáveis da *japonica* para a *indica* (KUBO; EGUCHI; YOSHIMURA, 2000; CRUZ; MILACH, 2004).

Desta forma, o presente estudo fundamenta-se na análise de expressão gênica diferencial de genótipos de arroz da subespécie *indica* com *background* genético semelhante, porém contrastantes quanto à característica de tolerância ao frio, a fim de identificar genes com potencial para utilização como marcadores moleculares e/ou melhoramento da cultura.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Produção e consumo do arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma monocotiledônea da família Poaceae originária de regiões tropicais, que vem sendo consumida pelos seres humanos há aproximadamente 5000 anos (ZHOU et al., 2002; WANG; YUAN; YIN et al., 2012). Esta espécie adaptou-se a diversos ambientes, sendo cultivada atualmente em todos os continentes, exceto na Antártida, tornando-se um alimento de extrema importância por ser a principal fonte de calorias diárias para aproximadamente metade da população mundial (ZHOU et al., 2002; CRUZ et al., 2013).

O arroz é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo. Na Ásia, América e África, que são continentes em desenvolvimento, o cultivo de arroz apresenta grande valor sócio-econômico, representando uma cultura com grande potencial para o combate à fome. De acordo com a Agência Embrapa de Informação Tecnológica - AGEITEC (2013), cerca de 81% do arroz mundial é cultivado e consumido na Ásia. A América é o continente que está em segundo lugar na produção, sendo que o Brasil é o maior consumidor de arroz das Américas. A África é o terceiro continente quanto à produção e o segundo no consumo (AGEITEC, 2013).

De acordo com dados da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* - FAO (2013), a produção de arroz aumenta em média 1,09% ao ano,

confrontando-se com o aumento da população mundial que é de cerca de 1,32% ao ano, gerando um aumento de 1,27% no consumo anual. Estas pesquisas apontam que o consumo de arroz vem aumentando gradativamente, porém, a produção mundial não está acompanhando este crescimento, evidenciando a importância da criação de estratégias para aumentar a produção deste grão (FAO, 2013).

O Brasil tem importante papel na produção deste alimento, classificando-se como nono maior produtor mundial (<http://irri.org/>). Conforme levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) realizado em junho/2014, o Brasil teve uma produção de 12,3 milhões de toneladas de grãos na safra 2013/2014, cultivados em uma área de 2,4 milhões de hectares, distribuídos principalmente nas regiões indicadas na Figura 1. Isto representa um acréscimo de 0,2% na área plantada em relação à safra anterior (CONAB, 2014). O Rio Grande do Sul é o estado que mais contribui anualmente com a produção nacional. Na safra 2013/2014 foi responsável pela colheita de 8,1 milhões de toneladas de grãos, representando um incremento de 1,6% em relação à safra passada (CONAB, 2014).

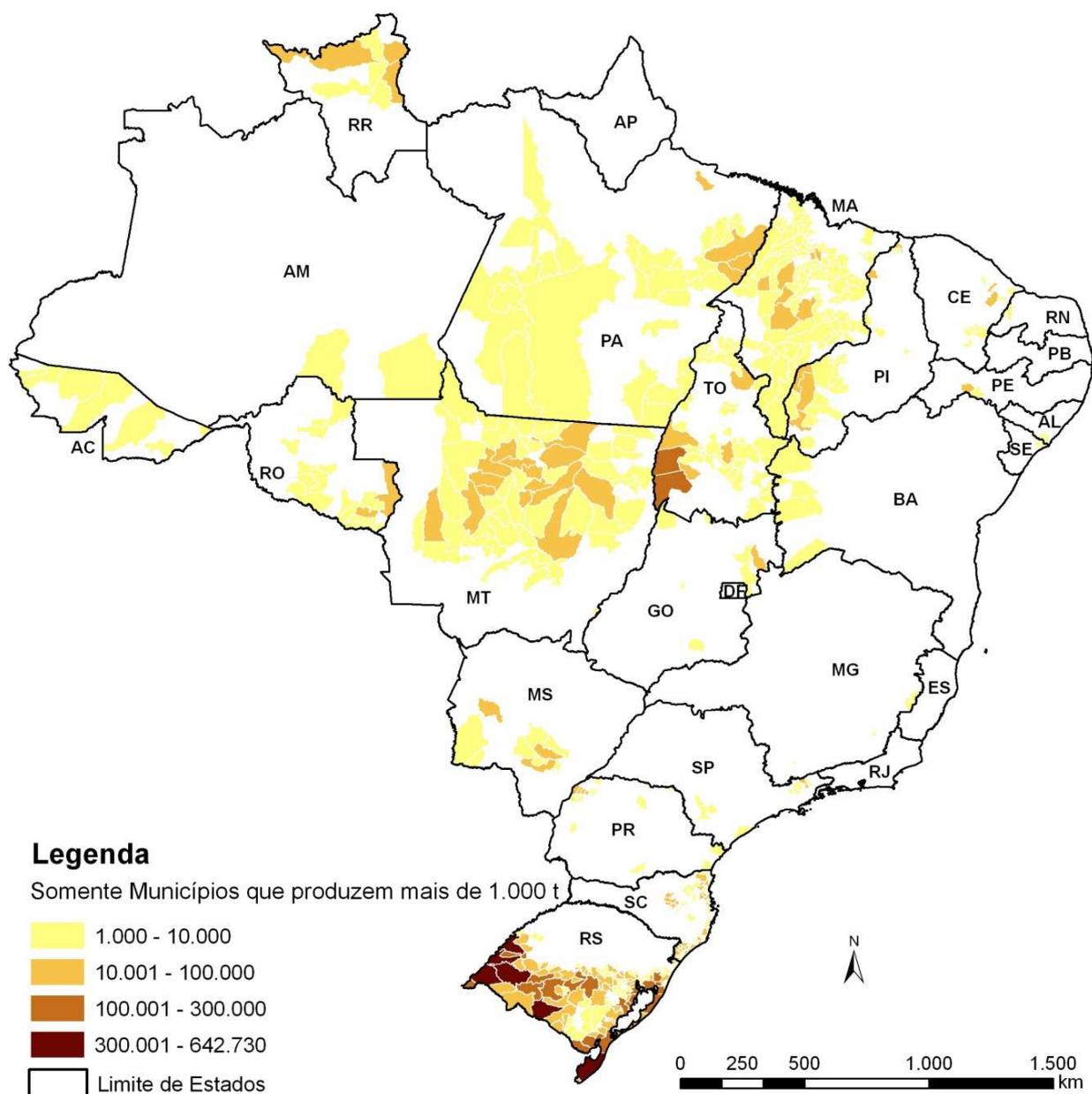


Figura 1 – Mapa da produção agrícola de arroz no Brasil.

Fonte: Conab (2014).

Parte da produção nacional de arroz é exportada para diversos países. Na Figura 2, é possível comparar quais foram os principais destinos deste cereal no período de janeiro/abril de 2013 e no mesmo período deste ano. Constata-se que os países que se destacaram em 2014 foram Cuba, Venezuela, Serra Leoa e Senegal

(CONAB, 2014). Segundo o levantamento do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (Secex/MDIC), as exportações passaram de 114,7 mil toneladas em abril de 2013 para 129,5 mil toneladas em abril de 2014, mostrando que houve ampliação do segmento.

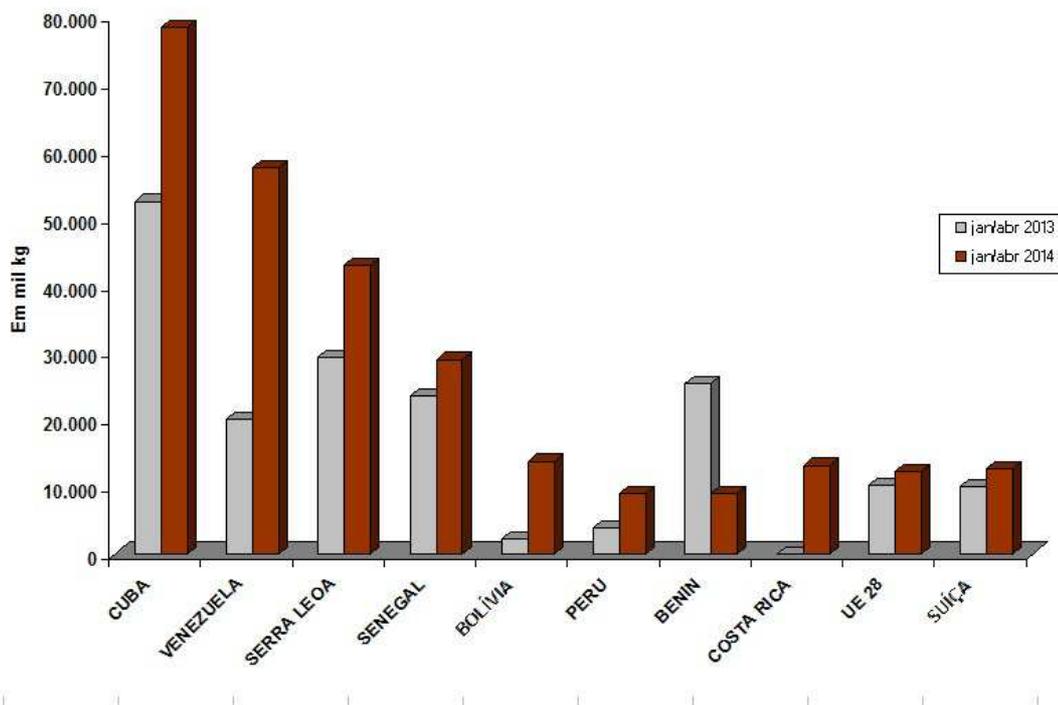


Figura 2. Exportação brasileira de arroz. Principais países importadores no período de jan/abr dos anos 2013 e 2014.

Fonte: Conab (2014).

O arroz é um alimento importante para a dieta das pessoas por ser uma das principais fontes de carboidratos. Se o arroz for integral, além de carboidratos, pode fornecer vitaminas, sais minerais, fósforo, cálcio e pequenas quantidades de micronutrientes como ferro e zinco (BATISTA et al., 2011; FAO, 2013). Sua composição química pode diferenciar de acordo com o ambiente, solo e variedade da cultivar (ZHOU et al., 2002).

2.2 Germinação do arroz

A semente é definida pelos botânicos como o óvulo desenvolvido após a fecundação, que contém o embrião, reservas nutritivas e tegumento. A Legislação Brasileira (Lei nº 10.711, de 5 de agosto de 2003) apresenta uma definição mais abrangente, conceituando semente como sendo o material de reprodução vegetal de qualquer gênero, espécie ou cultivar, proveniente de reprodução sexuada ou assexuada, que tenha finalidade específica de semeadura.

A semente de arroz é constituída, em sua maior parte, pelo endosperma que armazena reservas de nutrientes, principalmente o amido (Figura 3). O endosperma é cercado por uma camada de aleurona que é formada por células que armazenam proteínas e enzimas essenciais para a germinação. Os brotos surgem a partir do embrião e são envolvidos por uma bainha protetora denominada de coleóptilo (HE; YANG, 2013).

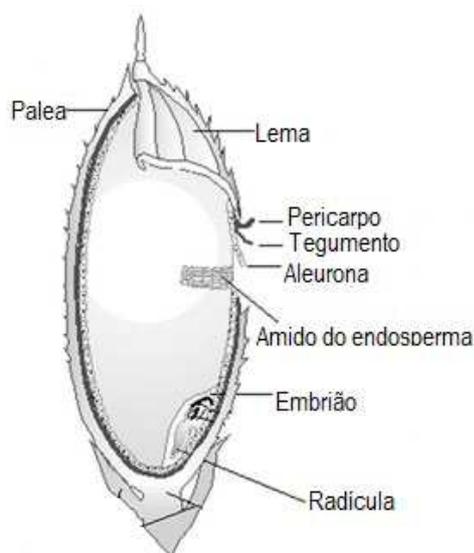


Figura 3 – Partes da semente de arroz.

Fonte: Adaptado de Rice Knowledge Management Portal (<http://www.rkmp.co.in/content/parts-of-a-rice-seed>)

A germinação adequada da semente é essencial para o ciclo de desenvolvimento da planta (HE; YANG, 2013). Durante a germinação, as células das sementes mudam do estado de repouso para o estado metabolicamente ativo

(YANG et al., 2007). O processo inicia a partir da absorção de água (embebição) pela semente seca em repouso e termina com a eclosão do eixo embrionário e da radícula (BEWLEY, 1997; YE et al., 2012), sendo um processo fisiológico e bioquímico bastante complexo, associado à regulação da expressão de diversos genes, desencadeados de forma coordenada e sequencial, e uma série de transduções de sinais metabólicos. Apesar de não se saber por completo como estas atividades são reguladas, constata-se que a qualidade da germinação da semente está associada com o crescimento da plântula e com a produção de grãos (HE; YANG, 2013).

Diversos elementos exógenos e endógenos participam na regulação da germinação, tais como água, temperatura, ritmo circadiano, luz e fitohormônios (YANG, et al., 2007; HUNDERTMAR et al., 2011). Porém, a água é o elemento decisivo para o desencadeamento do processo (HUNDERTMAR et al., 2011). A germinação pode ser dividida em três fases principais, como mostrado na Figura 4. Na fase I, ocorre a rápida absorção de água e início da biossíntese de mRNA (HOWELL et al., 2009; HE; YANG, 2013). Na fase II, ocorre a reativação do metabolismo, mobilização das reservas energéticas, afrouxamento da parede celular, reorganização celular e alongamento do coleóptilo. Esta fase é classificada como etapa de platô por ser a mais importante, pois todas as reações metabólicas necessárias à germinação são ativadas. Na fase III, ocorre ativação do TCA (Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos) e da respiração aeróbica, início da divisão celular, propulsão da radícula e estabelecimento da plântula (HE; YANG, 2013).

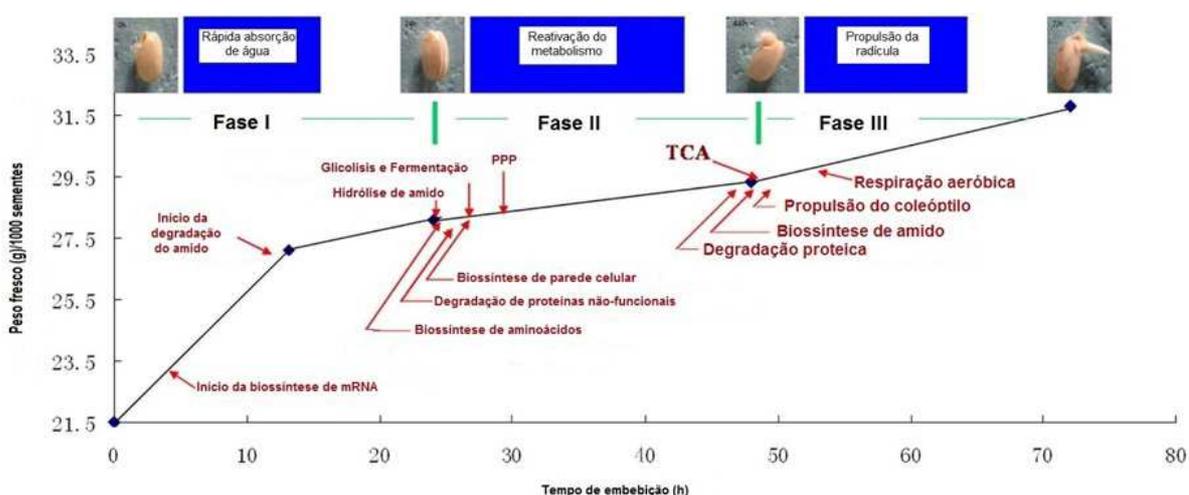


Figura 4 – Fases da germinação da semente de arroz. Principais eventos que

ocorrem durante as três fases da germinação, desde a absorção de água até o estabelecimento da plântula.

Fonte: Adaptado de He; Yang, 2013.

A partir da embebição, ocorre a ativação metabólica do embrião que começa a produzir fitohormônios. Entre eles, destaca-se o ácido giberélico, que se difunde para a camada de aleurona, provocando a ativação de uma cascata de sinalização que irá sintetizar amilases e outras enzimas hidrolíticas. Estas enzimas são conduzidas para o endosperma, onde iniciarão a quebra dos compostos de armazenamento que promoverão o estabelecimento da plântula (BETHKE; SCHUURINK; JONES, 1997; HE; YANG, 2013).

A mobilização de reservas de energia é imprescindível para a germinação das sementes. Nas monocotiledôneas, estas reservas estão sob a forma de lipídios, proteínas e amido no endosperma. No arroz, o amido é a reserva mais abundante, o qual é degradado por várias etapas incluindo a via glicolítica e o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (YANG et al., 2007). A enzima α -amilase é uma das principais enzimas que catalisam essa reação. Yang e colaboradores (2007) constataram que a quantidade de α -amilase aumenta substancialmente no final da fase II da germinação do arroz, sugerindo que a maior taxa de mobilização do amido pode acontecer em estágios avançados da fase II da germinação. A mobilização de reservas proteicas também é importante nesse processo. Neste mesmo estudo, verificou-se que a maioria das reservas de proteínas foi utilizada após 48 horas de embebição (YANG et al., 2007). Todos estes resultados indicam que as reservas energéticas são mobilizadas até o final da germinação da semente (YANG et al., 2007). Além das proteínas de reservas energéticas, análises em nível proteico também identificaram alterações em proteínas funcionais durante a germinação, que podem auxiliar na defesa da planta e no desenvolvimento morfológico, proporcionando um crescimento rápido e eficaz das mudas (YANG et al., 2007).

Evolutivamente, algumas plantas desenvolveram mecanismos de proteção das sementes contra diferentes estresses sazonais, como desidratação e baixas temperaturas, visando à preservação da capacidade de germinação e garantia da sobrevivência da espécie. Um destes mecanismos é a manutenção de um estado de

dormência (FOOTITT et al., 2011). Vários fitohormônios estão relacionados com o processo de dormência e quebra de dormência das sementes. No arroz, o ácido giberélico é o fitohormônio responsável pela quebra de dormência da semente para promover a germinação. Por outro lado, o ácido abscísico (ABA) induz a dormência após a maturação das sementes (HE; YANG, 2013). Entretanto, a dormência da semente a protege apenas parcialmente, pois foi verificado que o armazenamento da semente por longos períodos, mesmo sob condições ideais, pode diminuir gradativamente seu potencial de germinação, visto que o envelhecimento da semente é controlado por fatores genéticos (MIURA et al., 2002; HE; YANG, 2013).

Sementes de grande parte das espécies botânicas não germinam sob condições anaeróbicas. No arroz, entretanto, as fases iniciais (fase I e II) da germinação ocorre com sucesso mesmo quando privado de oxigênio (estado metabólico de anoxia) (MAGNESCHI; PERATA, 2009). Isto se deve ao fato que o amido que compõe a semente não é mobilizado somente por vias centrais do metabolismo do carbono (glicólise e ciclo dos ácidos tricarboxílicos), mas também por vias de fermentação, levando à capacidade de manter o funcionamento do metabolismo energético mesmo sem a presença do oxigênio (RAYMOND; AL-ANI; PRADET, 1985; MAGNESCHI; PERATA, 2009; HE; YANG, 2013). Além disso, o rápido alongamento do coleóptilo do arroz permite a difusão de oxigênio para o interior do endosperma, auxiliando no desenvolvimento de plântulas robustas (TURNER; CHEN; MCCAULEY, 1981; MAGNESCHI; PERATA, 2009). Análises de expressão diferencial de proteínas mostraram que coleóptilos em condições de anoxia apresentam expressão elevada de proteínas relacionadas à defesa, como proteínas antioxidantes, além de apresentar alta concentração de aminoácidos (serina, glicina e alanina), que contribuem na adaptação à falta de oxigênio (SHINGAKI-WELLS et al., 2011). Somente na fase final da germinação (fase III) é necessária a disponibilidade de oxigênio para a propulsão e alongamento da radícula (HOWELL et al., 2007; HE; YANG, 2013).

Análises proteômicas identificaram um total de 673 proteínas envolvidas na fase de germinação do arroz (HE et al., 2011). Estas proteínas foram classificadas em 14 grupos funcionais, entre os quais estão os grupos relacionados com o metabolismo, formação de citoesqueleto e defesa. O principal grupo foi das

proteínas relacionadas com o metabolismo de carboidratos, glicólise, ciclo dos ácidos tricarboxílicos, fermentação, gliconeogênese, ciclo do glioxilato e via das pentoses fosfato (HE et al., 2011).

Oscilações nos níveis das espécies reativas de oxigênio (EROs) ocorrem continuamente durante o desenvolvimento da semente e durante a germinação. As moléculas de EROs são consideradas potencialmente nocivas. No entanto, crescentes evidências têm mostrado que EROs também podem ter função de mensageiro ou transmissor de sinais ambientais durante a germinação das sementes de arroz, agindo positivamente no controle do processo (YE et al., 2012; DIAZ-VIVANCOS; BARBA-ESPÍN; HERNÁNDEZ, 2013).

2.3 Vias de sinalização dos estresses abióticos em arroz

O desenvolvimento e a produção mundial de arroz são afetados por diversos tipos de estresses abióticos, principalmente alta salinidade, seca e baixas temperaturas (WU et al., 2011; DIAZ et al., 2013; YOKOTANI et al., 2013). Estes fatores modificam a fisiologia da planta, causando danos ao seu metabolismo (CRUZ et al., 2013). As plantações de arroz no Rio Grande do Sul apresentam altos índices de produtividade, superiores a 6 t/ha^{-1} . As oscilações que ocorrem nos níveis de produtividade ao longo dos anos estão diretamente relacionadas com a ocorrência de baixas temperaturas e disponibilidade da radiação solar durante a fase inicial de desenvolvimento da planta (STEINMETZ et al., 2007). Alguns genótipos de arroz, mesmo pertencendo ao mesmo gênero e espécie na classificação botânica, apresentam fortes distinções nas reações do metabolismo quando submetidas aos diferentes estresses, diferenciando-se pela tolerância ou sensibilidade ao fator. Existem genótipos que possuem maior capacidade de desenvolvimento sob estresses, classificando-se como genótipos tolerantes (SANGHERA et al., 2011). Os genótipos tolerantes possuem características fisiológicas, bioquímicas e moleculares que desencadeiam respostas adequadas para combater o estresse (SINGH; FOLEY; OÑATE-SÁNCHEZ, 2002; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007).

Estudos apontam que a exposição da planta ao estresse salino e de seca leva a uma grande mudança na expressão gênica, o que está relacionado com diferentes vias de sinalização, sendo que algumas delas são dependentes do hormônio ácido abscísico (ABA) (RABBANI et al., 2003; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007). O ABA, quando produzido sob condições de adversidade, atua como um mediador no controle das respostas da planta, regulando o fechamento dos estômatos e/ou estimulando a atividade de vários genes envolvidos na resposta ao estresse (NAKASHIMA et al., 2012). O ABA também tem sido relacionado ao mecanismo de respostas às baixas temperaturas (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2006).

O mecanismo completo de proteção da planta aos estresses abióticos ainda permanece desconhecido. Estudos para verificar como as plantas reagem a estes estresses, principalmente seca e baixas temperaturas, constataram que elas agem defensivamente contra a desidratação, através da transdução de sinais que resultam no acúmulo de diferentes proteínas, moléculas de açúcar e antioxidantes (GONZALEZ; IUSEM, 2014). Entre as proteínas que se acumulam, destacam-se as da família ASR (*ABA-stress-ripening*) (GONZALEZ; IUSEM, 2014). Outras análises também sugerem que os genes que codificam proteínas do grupo ASR podem desempenhar papel de proteção nas células vegetais sob condições de déficit hídrico, devido à sua alta hidrofília. Em algumas circunstâncias, as ASR's podem ainda ter atividade de estabilização das proteínas, evitando a desnaturação das mesmas (KONRAD; BAR-ZVI, 2008; DIAZ et al., 2013).

Mecanismos de resposta também são ativados nos genótipos de arroz sensíveis aos estresses abióticos. No entanto, as proteínas sintetizadas não são suficientes para assegurar tolerância à planta. Mesmo assim, muitas variedades sensíveis continuam sendo cultivadas por apresentarem características morfológicas mais aceitas comercialmente. Em áreas propensas às condições de estresse salino, hídrico e de baixa temperatura, estas cultivares ainda apresentam falhas no desenvolvimento normal, acarretando queda na produção dos grãos (WU et al., 2011; NAKASHIMA et al., 2012).

2.4 Alterações visuais e fisiológicas causadas pelo frio em arroz

As baixas temperaturas podem ser prejudiciais ao desenvolvimento normal de plantas de arroz por estas possuírem uma origem tropical. Nas cultivares sensíveis, o frio desencadeia diversas alterações fisiológicas, morfológicas, bioquímicas e moleculares que geram alterações deletérias em seu metabolismo, afetando a produtividade (SANGHERA et al., 2011; CRUZ et al., 2013). O grau de dano pode variar de acordo com a severidade do estresse, que engloba o tempo de exposição, a temperatura e a fase de desenvolvimento em que a planta se encontra. No período germinativo e vegetativo, que correspondem às fases iniciais, o início das alterações fisiológicas surgem quando a temperatura está em torno de 10-13°C. A fase de reprodução é mais sensível, observando-se danos quando a temperatura está entre 18-20°C (YOSHIDA, 1981). Algumas características de danos visuais são murchamento, clorose, necrose e crescimento lento (KIM; ANDAYA; TAI, 2011; CRUZ et al., 2013).

O frio pode prejudicar todas as fases do desenvolvimento da planta, desde a germinação até a maturação dos grãos (YE et al., 2009), sendo que os estádios de germinação, estabelecimento das mudas e reprodutivo são os mais afetados no arroz (CRUZ; MILACH, 2000). Na fase de germinação, o frio provoca diminuição na porcentagem e/ou qualidade das sementes germinadas (CRUZ; MILACH, 2000). No estágio de estabelecimento das mudas pode ocorrer despigmentação das folhas, murchamento e baixa taxa de crescimento (YANG; DAI;ZHANG, 2012; SONG et al., 2011). Na fase reprodutiva, a formação do pólen pode ser afetada, tornando a planta de arroz estéril (MACKILL; COFFMAN; GARRITY, 1996) ou interferindo no desenvolvimento das anteras e estigma (ITO et al., 1970; CRUZ et al., 2013).

Folhas de plantas de arroz da subespécie *japonica* apresentam menor taxa de degradação de clorofila que plantas da subespécie *indica* quando submetidas a baixas temperaturas, revelando que os cloroplastos e, conseqüentemente, a fotossíntese, são mais afetados nas cultivares sensíveis (DAI; VERGARA; VISPERAS, 1990; GLASZMANN; KAW; KHUSH, 1990; AGHAEI et al., 2011). Em alguns genótipos de arroz sensíveis à baixa temperatura foram verificadas lesões no

sistema de membrana da célula, desencadeando desidratação celular (STEPONKUS; UEMURA; WEBB, 1993). Segundo Strauss e Hause (1986) o desenvolvimento da tolerância ao frio envolve o aumento da insaturação dos ácidos graxos de membrana, o acúmulo de sacarose e elevação dos níveis de açúcares simples. Espécies reativas de oxigênio também são produzidas na presença do frio, ocasionando sérios danos a diversos componentes intracelulares, tais como lipídios de membrana, proteínas estruturais e enzimas (SONG et al., 2011; YANG; DAI; ZHANG, 2012; CRUZ et al., 2013). Todavia, constatou-se que as espécies reativas de oxigênio, ao mesmo tempo em que causam danos, podem agir na sinalização da produção de enzimas antioxidantes, numa tentativa de superação do estresse (THEOCHARIS; CLÉMENT; BARKA, 2012).

2.5 Genes de arroz ativados por baixas temperaturas

Para superar condições de adversidade, as plantas induzem a expressão de diversos genes, gerando diferentes respostas de aclimatação que iniciam com uma série de processos de sinalização, incluindo a ativação de fatores de transcrição (HU et al., 2008; CRUZ et al., 2013). Vários destes fatores são estimulados na presença de estresses abióticos em plantas, tais como AP2/EREBP (*APETALA2/ethylene response element binding protein*), Zinc Finger, NAC, MYB e WRKY, entre outros (HUANG et al., 2009).

Uma das maiores famílias de fatores de transcrição específica de plantas são as proteínas NAC (OLSEN et al., 2005). Estima-se que existam 151 genes *NAC* no genoma de arroz (NURUZZAMAN et al., 2010). As proteínas NAC desempenham atividades importantes no desenvolvimento da planta, no controle hormonal e na defesa aos diferentes estresses, incluindo resposta à baixa temperatura (OLSEN et al., 2005; NAKASHIMA et al., 2012). Alguns integrantes do grupo NAC ativados por baixa temperatura já foram identificados, tais como o *SNAC2* (*STRESS-RESPONSIVE NAC 2*), *OsNAC5* e *OsNAC6* (OHNISHI et al., 2005; HU et al., 2008; SONG et al., 2011). O *SNAC2* está envolvido na manutenção da estabilidade da

membrana celular (HU et al., 2008). A superexpressão de *OsNAC5* leva à regulação da biossíntese de açúcares e prolina, além de aumento na atividade de enzimas antioxidantes (SONG et al., 2011). Tem-se observado que um aumento nos níveis de prolina e açúcares solúveis atua no ajuste osmótico da planta, auxiliando na tolerância ao frio através da manutenção da integridade da membrana, evitando a desidratação celular provocada pela pressão osmótica (HUANG et al., 2012). Análises revelaram que a superexpressão dos genes *OsNAC5* e *OsNAC6* regula a atividade de outros genes importantes para a tolerância ao frio, como *OsLEA3* (TAKASAKI et al., 2010).

Outras pesquisas constataram que os genes da família AP2 (*APETALA2*) estão envolvidos na regulação do crescimento das plantas (VOGEL et al., 2005). Este grupo de genes também está relacionado à transdução de sinal dos hormônios vegetais, respostas a agentes patogênicos e nas respostas a outros estresses abióticos, como seca e alta salinidade (WU et al., 2011). O domínio AP2 está presente em diversas categorias de fatores de transcrição, como EREBP (*ethylene response element binding protein*), RAV e outras. Dentre elas, destaca-se o grupo EREBP que inclui o fator de transcrição DREB (*Dehydration-responsive element-binding protein*), o qual participa da resposta ao estresse induzido pelo frio, regulando a expressão do gene *cor15a* através da ligação ao elemento CRT (*C-repeat*), caracterizado pela sequência TGGCCGA (BAKER; WILHELM; THOMASHOW, 1994; WU et al., 2011).

Os fatores de transcrição MYB também atuam nos processos de resposta aos estresses abióticos. Plantas de arroz superexpressando *OsMYB3R-2*, por exemplo, possuem níveis transcricionais aumentados de genes específicos, como a ciclina *OsCycB1;1*, que está envolvida na regulação do ciclo celular (MA et al., 2009). O gene *OsMYBS3* participa das respostas adaptativas a longo prazo, necessárias para uma eficaz aclimação do arroz frente ao estresse por baixa temperatura (SU et al., 2010). Os genes do grupo *ARS* (*ABA-stress-ripening*) auxiliam na tolerância a baixas temperaturas ativando o transporte de açúcar em tecidos específicos, necessários para o desenvolvimento normal da planta, e regulando a atividade fotossintética (DIAZ et al., 2013).

Através de análises de microarranjo, evidenciou-se que um gene que codifica uma proteína de transferência de lipídios da família HyPRP (*Hybrid proline-rich proteins*) foi regulado pela superexpressão do gene *OsWRKY76*, levando à estabilização das membranas plasmáticas. A maioria das proteínas HyPRPs estão localizadas na parede celular, e contêm um domínio N-terminal rico em prolina e um domínio C-terminal hidrofóbico (XU et al., 2011; YOKOTANI et al., 2013). Em linhagens de arroz foi observado que a superexpressão de *OsWRKY76* atuou diretamente na regulação de genes que codificam proteínas envolvidas com defesa, tais como a enzima antioxidante peroxidase, resultando em uma maior tolerância ao frio (YOKOTANI et al., 2013). Isto evidencia que a superexpressão de *OsWRKY76*, em plantas de arroz, atua como um ativador da expressão de outros genes associados ao estresse por baixas temperaturas. Entre eles, genes que codificam peroxidases e genes do metabolismo lipídico (YOKOTANI et al., 2013).

De modo geral, os genes induzidos pelos estresses, inclusive baixas temperaturas, desempenham funções de proteção através da síntese de proteínas funcionais (enzimas e proteínas metabólicas essenciais) e proteínas reguladoras, que regulam a transdução de sinais e a expressão gênica em resposta ao estresse. Entre as proteínas reguladoras que são ativadas na presença de estresses abióticos estão os fatores de transcrição DREBPs (*Dehydration responsive element-binding proteins*), AREBPs (*ABA-responsive element-binding protein*) e NACs (*NAM, ATAF and CUC*). As proteínas funcionais integram proteínas hidrofílicas, como a deidrina e as proteínas do tipo LEA (*Late Embryogenesis Abundant*), e enzimas necessárias para a síntese de osmoprotetores como a prolina e açúcares compatíveis (NAKASHIMA; ITO; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2009; NAKASHIMA et al., 2012).

Analisando-se a atividade dos genes frente ao estresse pelo frio, parece que vias distintas procedem sequencialmente e complementarmente a fim de promover a aclimação da planta a curto e a longo prazo (CRUZ et al., 2013).

2.6 Obtenção de plantas tolerantes ao frio

Através da técnica de manipulação genética, é possível gerar linhagens transgênicas de diversas espécies botânicas (WANI; GOSAL, 2011). Pesquisas envolvendo transgenia de plantas estão sendo desenvolvidas mundialmente por ser uma forma de melhorar características importantes das culturas, incluindo tolerância aos estresses bióticos e abióticos (ASHRAF et al., 2008). O processo de transgenia é uma estratégia biotecnológica bastante promissora que pode ser empregada na cultura do arroz. A transferência da tolerância ao frio para cultivares de arroz comercialmente viáveis, como é o caso das cultivares da subespécie *indica*, pode possibilitar o aumento na produção de grãos.

Para alcançar o grau de tolerância adequado a um determinado estresse na planta, muitas vezes, um único gene que codifica uma única proteína não é suficiente, havendo necessidade de transferência de vários genes (SANGHERA et al., 2011). Geralmente, a tolerância aos estresses abióticos envolve uma gama de fatores de transcrição e outros genes que codificam proteínas envolvidas em diversas rotas metabólicas (CUSHMAN; BOHNERT, 2000).

Pesquisadores constataram que os genes *CBF/DREB1* (*C-repeat binding factors/ dehydration-responsive element-binding protein 1*) fazem parte de um dos grupos mais importantes relacionados com respostas de aclimação ao frio. A superexpressão de *OsDREB1F*, em plantas de arroz e *Arabidopsis*, mostrou que este é um gene importante na tolerância ao frio na fase inicial do desenvolvimento (WANG et al., 2008). Outros genes introduzidos com sucesso em plantas de arroz e *Arabidopsis* foram *OsDREB1* e *AtDREB1*, respectivamente, os quais aumentaram os níveis de osmoprotetores, como a prolina e açúcares solúveis, aumentando a tolerância à baixa temperatura (ITO et al., 2006; SANGHERA et al., 2011). Estudos revelaram que a superexpressão de *OsCOIN* (*Oryza sativa cold-inducible*) em plantas de arroz também levaram a um aumento nos níveis de prolina (LIU et al., 2007). O gene *LeTERF2*, além de aumentar os níveis dos osmoprotetores, mostrou estar envolvido com a regulação dos níveis de clorofila e ERO's (TIAN et al., 2011).

Hu et al. (2008) superexpressaram o gene *SNAC2* em arroz e submeteram as plantas a um intenso estresse por frio (4-8 °C por 5 dias). Foi verificado que mais de 50% das plantas transgênicas se desenvolveram, enquanto que todas as plantas do tipo selvagem morreram. As membranas celulares das plantas transgênicas permaneceram íntegras, indicando que a proteína *SNAC2* favorece a estabilização de membranas, podendo ser utilizada em futuros programas de melhoramento da cultura (HU et al., 2008).

A superexpressão de *OsNAC5* levou ao acúmulo de osmoprotetores e redução de malondialdeído e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), tornando a planta de arroz menos suscetível aos danos oxidativos (SONG et al., 2011). Em outro estudo, a superexpressão do gene *OsRAN2* (*Oryza sativa*, *Ras-related nuclear protein 2*) foi importante para manter adequada a taxa de divisão celular da planta exposta ao frio (CHEN et al., 2011). Verificou-se que os genes *OsMYBS3* e *OsMYB2* também favoreceram à tolerância ao frio nas plantas de arroz transgênicas através da regulação de genes relacionados com a síntese de prolina, transportadores e atividade antioxidante (SU et al., 2010; YANG; DAI; ZHANG,2012).

Huang et al. (2009) constataram que as plantas de arroz transgênicas tolerantes ao frio apresentam maior atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e peroxidase, desencadeando mecanismos de respostas ao estresse oxidativo quando o gene *OsZFP245* (pertencente à família de proteínas *zinc finger*) é superexpresso. A superexpressão de *AtSAP*, outra integrante da família *zinc finger*, também aumenta a tolerância ao estresse em arroz, porém, atuando na manutenção da atividade fotossintética da planta (SAAD et al., 2012).

Muitos genes e mecanismos de defesa aos estresses estão sendo estudados. A descoberta de marcadores moleculares, os quais possibilitam identificar lócus controladores de características quantitativas (QTLs) no genoma dos organismos, possibilitam reconhecer mecanismos de defesa (JIANG et al., 2006). Alguns QTLs já foram identificados nos diferentes estádios de desenvolvimento do arroz, sendo alvos importantes nos programas de melhoramento da cultura. Na fase de germinação da semente de variedades derivadas de cruzamento entre duas cultivares da subespécie *japonica* detectaram-se três QTLs associados à baixa

temperatura (FUGINO et al., 2004). Um deles foi o *qLTG-3-1*, mapeado na extremidade distal do braço curto do cromossomo 3. Os outros dois QTLs adicionais identificados foram o *qLTG-3-2*, no cromossomo 3, e *qLTG-4* na extremidade distal do braço curto do cromossomo 4 (FUJINO et al., 2004). Ji et al. (2009) avaliaram QTLs de linhagens de arroz derivadas do cruzamento entre a subespécie *japonica* e a subespécie *indica*, resultando na identificação de seis QTLs localizados em diferentes cromossomos, envolvidos na capacidade de germinação em baixas temperaturas, confirmando que esta característica de resistência envolve vários genes.

Devido à alta complexidade molecular que envolve as respostas aos estresses abióticos nas plantas, os métodos de melhoramento tradicionais tiveram pouco sucesso (CUSHMANN; BOHNERT, 2000; SANGHERA et al., 2011). Atualmente, a biotecnologia e a bioinformática oferecem estratégias alternativas para a identificação de novos genes e compreensão de suas funções na aclimação aos estresses, facilitando o desenvolvimento de plantas modificadas geneticamente para obtenção, por exemplo, de tolerância ao frio. A utilização de genômica comparativa de organismos modelos e uso de técnicas como análise de expressão gênica por sequenciamento em grande escala (*deep sequencing*) são algumas alternativas viáveis atualmente (CUSHMANN; BOHNERT, 2000; GAO; CHAO; LIN, 2008).

2.7 RNAseq ou sequenciamento em grande escala (*deep sequencing*)

RNAseq é uma ferramenta utilizada para traçar um perfil transcricional através de sequenciamento em grande escala. Define-se transcriptoma, o conjunto completo de transcritos (mRNA, rRNA, tRNA e miRNA) de um dado organismo, órgão, tecido ou linhagem celular, o qual tem reflexo direto na expressão gênica. Compreender o transcriptoma é essencial para interpretar os elementos funcionais do genoma, pois possibilita revelar as mudanças nos níveis de expressão durante o desenvolvimento ou sob diferentes condições.

O RNAseq fornece uma medida bastante exata dos níveis de transcritos e suas isoformas. Nesta tecnologia, uma população de RNA (total ou fracionado) é convertida em uma biblioteca de fragmentos de cDNA com adaptadores ligados a uma ou em ambas as extremidades, como pode ser visualizado na Figura 5. Após, cada molécula (com ou sem amplificação) é sequenciada para se obter sequências curtas de uma ou ambas as extremidades. Após o sequenciamento, os resultados das leituras são alinhados com um genoma de referência ou com transcritos de referência para produzir um mapa da transcrição genômica que irá apresentar o nível de expressão de cada gene (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009).

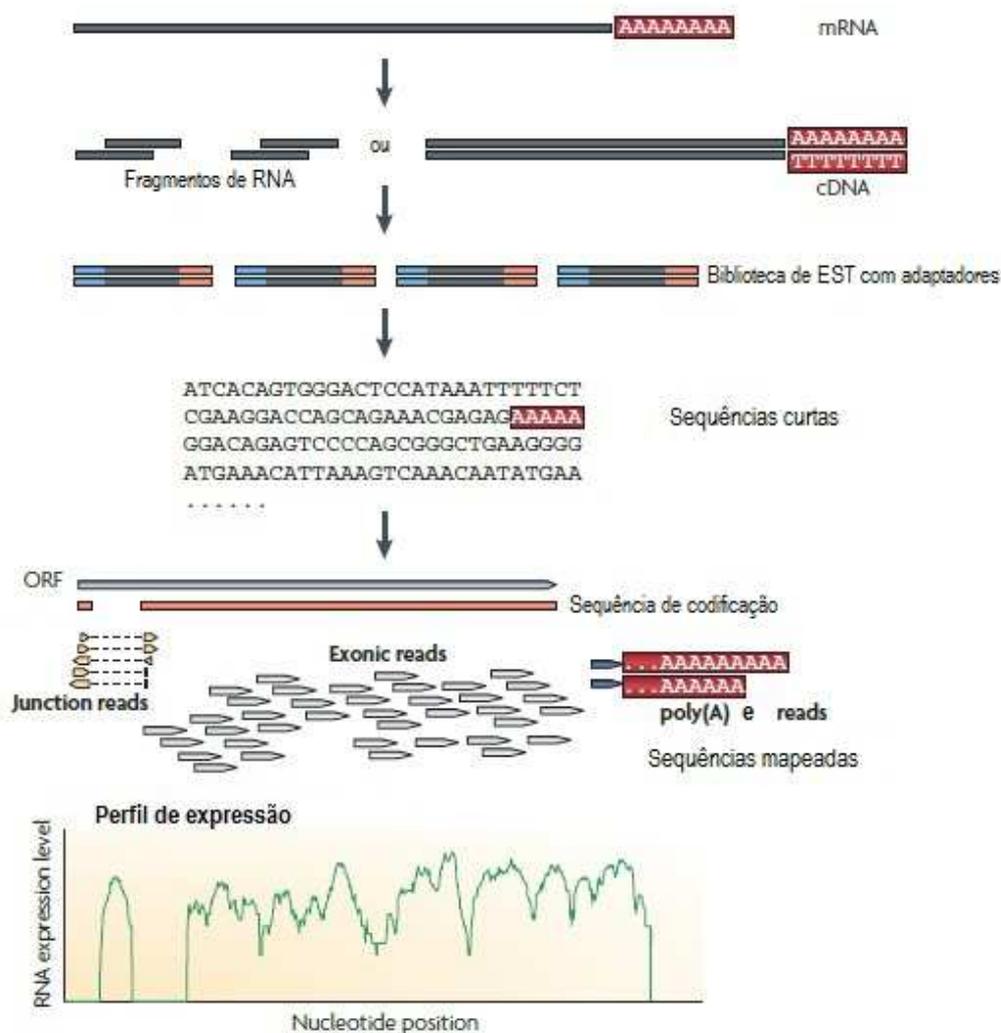


Figura 5 - Tecnologia do RNAseq. RNAs mensageiros são convertidos em uma biblioteca de fragmentos de cDNA. Adaptadores de sequenciamento (azul) são

adicionados a cada fragmento de cDNA e uma sequência curta é obtida a partir de cada um dos cDNA usando uma tecnologia de sequenciamento de alto rendimento. A sequência de leitura resultante é classificada em três tipos: *exonic reads*, *junction reads* e *poly(A) end-reads*. Estas leituras são usadas para gerar um perfil de expressão de cada gene, como mostrado no gráfico inferior da figura, onde uma ORF com um íntron é mostrado.

Fonte: Adaptado de WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009.

O uso da tecnologia do RNAseq possui muitas vantagens: pode revelar a localização exata dos limites de transcrição de um gene, pode dar informações sobre a conectividade entre vários éxons, é útil para estudar transcriptomas complexos, permite que todo o transcriptoma seja levantado em um alto rendimento e de forma quantitativa, muitas vezes possui custo muito menor que outros métodos como *tiling microarrays* ou *EST sequencing*, é útil para apresentar variações de sequência, como SNPs, nas regiões transcritas, apresenta níveis elevados de reprodutibilidade para as repetições técnicas e biológicas (CLOONAN et al., 2008; NAGALAKSHMI et al., 2008; MORIN et al., 2008; WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009).

O método ideal para transcriptômica deve ser capaz de identificar e quantificar todos os RNAs (pequenos ou grandes). Por isso, durante a construção das bibliotecas, as moléculas de RNAs maiores (mRNAs) são fragmentadas em pedaços menores para ser compatível com a maioria das tecnologias de sequenciamento. Os métodos de fragmentação comuns incluem fragmentação do RNA (hidrólise de RNA ou nebulização) e fragmentação de cDNA (tratamento com DNase I ou com ultrassom) (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009).

O RNAseq, por ser uma tecnologia de sequenciamento de alto rendimento ou de grande escala, necessita de análises de bioinformática para dar sentido à imensa quantidade de dados que são gerados. Portanto, há uma constante necessidade de desenvolvimento de métodos eficientes para armazenar, recuperar e processar grandes quantidades de dados. Isso é importante para reduzir erros durante as análises. Geralmente, quanto maior for o genoma, mais complexo será o transcriptoma e maior profundidade de sequenciamento é necessária para uma adequada cobertura (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009).

Como o RNAseq pode captar a dinâmica transcricional em diferentes tecidos ou condições sem normalizações sofisticadas de conjuntos de dados, muitos estudos estão aderindo a esta técnica. Por exemplo, Xu, Gao e Wang (2012) utilizaram este método para traçar o perfil do transcriptoma do arroz durante o desenvolvimento dos embriões, a fim de compreender os eventos moleculares associados à embriogênese da planta. Vários estudos envolvendo análise das respostas aos diferentes estresses ambientais em plantas estão utilizando esta ferramenta (CRUZ-JARAMILLO et al., 2014; VITULO et al., 2014; XIA et al., 2014). Além das espécies vegetais, esta técnica também foi aplicada em estudos com microorganismos (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*), animais e inclusive células humanas (NAGALAKSHMI et al., 2008; MORIN et al., 2008; WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009).

3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

A presente pesquisa caracterizou-se como um estudo do tipo experimental e quantitativo, onde foi realizada a identificação e caracterização de genes importantes para a tolerância ao frio na fase de germinação da cultura do arroz (*Oryza sativa* L.) da subespécie *indica*.

3.1 Colaboradores do trabalho

- Raul Antonio Sperotto, Doutor em Biologia Celular e Molecular, Laboratório de Biotecnologia – Centro Universitário UNIVATES, Lajeado – RS.

- Janette Palma Fett – Doutora em Fisiologia Vegetal e Biologia Molecular, Laboratório de Fisiologia Vegetal - UFRGS, Porto Alegre - RS.

- Janete Mariza Adamski, Mestre em Fisiologia Vegetal, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Botânica, Laboratório de Fisiologia Vegetal - UFRGS, Porto Alegre - RS.

- Felipe Klein Ricachenevsky, Doutor em Biologia Celular e Molecular, pós-doutorando do Laboratório de Fisiologia Vegetal – UFRGS, Porto Alegre - RS.

- Denise Cargnelutti, Doutora em Bioquímica Toxicológica, Departamento de

Agronomia - UFFS, Erechim - RS.

- Luiz Felipe Valter de Oliveira, Mestre em Genética e Biologia Molecular, Centro de Biotecnologia – UFRGS, Porto Alegre – RS.

- Renata Pereira da Cruz, Doutora em Fitotecnia, Departamento de Plantas de Lavoura - UFRGS, Porto Alegre - RS.

- Rogério Margis, Doutor em Biologia Molecular, Centro de Biotecnologia - UFRGS, Porto Alegre – RS.

- Édina Aparecida dos Reis Blasi, graduanda de Ciências Biológicas, bolsista de Iniciação Científica, Laboratório de Biotecnologia – Centro Universitário UNIVATES, Lajeado – RS.

3.2 Ambiente da pesquisa

Os locais de execução da pesquisa foram:

- Laboratório de Biotecnologia - Centro Universitário UNIVATES;
- Laboratório de Biologia Molecular - Centro Universitário UNIVATES;
- Laboratório de Fisiologia Vegetal - UFRGS;
- Laboratório de Anatomia Vegetal - UFRGS.
- Laboratório de Biotecnologia - IRGA

3.3 Procedimentos técnicos

3.3.1 Identificação de genótipos de arroz tolerantes e sensíveis ao frio

Foi previamente realizada, no Laboratório de Fisiologia Vegetal da UFRGS, em colaboração com o Instituto Rio-Grandense do Arroz (IRGA), a identificação de genótipos de arroz da subespécie *indica* tolerantes e sensíveis à baixa temperatura. Para tanto, sementes de 45 genótipos (44 genótipos *indica* e 1 genótipo *japonica*), oriundos do Banco de Germoplasma do IRGA, foram submetidas à germinação em uma câmara BOD à 13°C, no escuro, por 26 dias. Após, os genótipos foram classificados de acordo com a porcentagem de sementes com coleóptilo ≥ 5 mm, conforme método de Cruz e Milach (2004).

O genótipo tolerante selecionado foi o IRGA 959-1-2-2F-4-1-4-A, o qual apresentou aproximadamente 80% das sementes com coleóptilo ≥ 5 mm. O genótipo sensível selecionado foi o IRGA 959-1-2-2F-4-1-4-D-1-CA-1, com apenas 15% das sementes com coleóptilo ≥ 5 mm (ADAMSKI et al., submetido). Além da medida do coleóptilo, um dos critérios que fundamentaram a escolha destes genótipos foi o fato de apresentarem *background* genético bastante semelhante, por serem oriundos dos mesmos parentais (linhagens irmãs).

3.3.2 Germinação e coleta de amostras

As sementes dos dois genótipos contrastantes selecionados permaneceram em uma estufa por 5 dias a 50°C para quebra de dormência. Em seguida, as cascas foram retiradas e as sementes foram colocadas para germinação em placas de Petri na câmara BOD durante 7 dias, a uma temperatura de 13°C, no escuro. Após, três replicatas biológicas (cada uma contendo dez sementes em germinação) foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, permanecendo no ultrafreezer (-80°C) para posterior extração de RNA total.

3.3.3 Extração de RNA e sequenciamento em grande escala (*deep sequencing*)

A extração de RNA total das sementes germinadas a 13°C por 7 dias, dos dois genótipos selecionados (tolerante e sensível ao frio), foi realizada com o reagente Concert Plant RNA (Invitrogen). Após, foi realizado o tratamento com DNase I (Invitrogen) para eliminar todo DNA genômico contaminante que poderia estar presente. Os RNAs foram, então, enviados para a empresa Fasteris SA (Fasteris SA, Plan-les-Ouates, <http://www.fasteris.com/>), na Suíça, e submetidos ao sequenciamento em grande escala (*deep sequencing* ou RNAseq), com o intuito de sequenciar 50 pares de bases da extremidade 3' de todos os cDNAs. Este procedimento foi realizado com o sistema Illumina® HiSeq 2000. Foi gerada uma biblioteca de cDNA individual para cada um dos genótipos, preparada de acordo com o protocolo Illumina. Em síntese, o RNAseq foi realizado com os seguintes passos: purificação de mRNA, síntese de cDNA utilizando um primer oligo-dT, método *shotgun* para gerar inserções de aproximadamente 500 nt, ligações de adaptadores 3p e 5p, pré-amplificação, geração de colônias e sequenciamento individual Illumina de 50 pb.

3.3.4 Análises de bioinformática

O resultado do *deep sequencing* foi analisado com ferramentas de bioinformática para se avaliar a expressão gênica diferencial entre os genótipos tolerante e sensível ao frio, observando-se os genes com expressão aumentada e genes com expressão reduzida em cada um dos genótipos, com o objetivo de identificar os genes de arroz que podem estar envolvidos com a tolerância à baixa temperatura na fase de germinação. Estas análises de bioinformática foram realizadas pela empresa Vitatec – Consultoria e Desenvolvimento em Biotecnologia (<http://www.vitatec.com.br/>). Foram considerados como genes diferencialmente expressos aqueles que apresentaram diferença estatística utilizando-se *p-value* $<1.0 \times 10^{-12}$.

3.3.5 Categorização *Gene Ontology* (GO) para comparar os transcriptomas dos genótipos tolerante e sensível ao frio

A fim de comparar os transcriptomas dos genótipos tolerante e sensível ao frio, foram utilizados os termos GO para encontrar as categorias a que estas sequências pertencem. Para tanto, o proteoma do arroz foi obtido do site Rice Genome Annotation Project (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) e novas anotações foram feitas utilizando Blast2GO (<http://www.blast2go.com>). As análises dos resultados foram realizadas com o teste Fisher's Exact que pertence ao Blast2GO, utilizando os seguintes parâmetros: teste bilateral e remoção de IDs duplicadas ($p \leq 0.05$).

3.3.6 Seleção de genes

As análises de bioinformática, utilizando-se um *p-value* extremamente exigente ($<1.0 \times 10^{-12}$), identificaram as sequências diferencialmente expressas entre os dois genótipos contrastantes. A partir destas sequências, 110 genes, que poderiam estar envolvidos com a tolerância ao frio, foram selecionados considerando-se a expressão gênica diferencial entre os genótipos contrastantes e o possível mecanismo envolvido. Após foram classificados de acordo com sua categoria funcional. Dentre os genes apurados anteriormente, 11 genes potencialmente mais importantes envolvidos na tolerância à baixa temperatura foram selecionados novamente de acordo com sua expressão e função no metabolismo da planta, a fim de realizar a confirmação dos dados do RNAseq, através de sua expressão gênica analisada por RT-qPCR (PCR em Tempo Real).

3.3.7 Confirmação da expressão gênica por RT-qPCR

Para confirmar a qualidade dos resultados do sequenciamento, *primers* específicos para os genes mais promissores foram projetados e a expressão

diferencial destes genes foi confirmada por RT-qPCR. Estes *primers* foram confeccionados para amplificar entre 100 e 150 pares de bases na extremidade 3'-UTR e para que a temperatura de *melting* (T_m) fosse entre 58°C e 62°C.

A extração do RNA total de triplicatas de sementes de arroz germinadas a 28 °C por 2 dias (utilizada como condição controle) e germinadas a 13 °C por 7 dias, foi realizada com o reagente Concert Plant RNA (Invitrogen). O RNA extraído foi tratado com DNase I (Invitrogen) para remover qualquer DNA genômico contaminante. Posteriormente, a síntese da primeira fita de cDNA foi realizada com a enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen) usando 1 µg de RNA total. O cDNA sintetizado foi diluído 100x para ser utilizado nas reações de RT-qPCR. Os *primers* específicos para o gene a ser avaliado foram preparados numa concentração de 10 pmol/µL.

Os procedimentos de RT-qPCR foram realizados no aparelho StepOne Real-Time Cycler (Applied Biosystems), com placas de 48 poços. A reação consistiu em uma etapa inicial de desnaturação de 5 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 60°C e 30 seg a 72°C (captação dos dados de fluorescência). Após, foi realizada uma curva de dissociação que consistiu no aumento gradual da temperatura (0,3°C por segundo).

As reações de RT-qPCR foram realizadas em um volume final de 20 µL, constituído por 10 µL do cDNA diluído 100x, 4,25 µL de água Milli-Q, 2 µL de Tampão PCR 10x, 1,2 µL de MgCl₂ 50 mM, 0,1 µL de dNTP's 10 mM, 0,4 µL do par de *primers* 10 µM, 2,0 µL de SYBR Green (1:10.000) e 0,05 µL de Platinum Taq DNA polymerase (5 U/µL, Invitrogen).

Os níveis de expressão dos genes de interesse foram avaliados em relação ao gene controle Ubiquitina 5 (*OsUBQ5*), considerando-se a eficiência de amplificação de 90 a 95 % e os valores do Ct (*CycleThreshold*) de cada par de *primer*. Para tanto, a expressão gênica relativa foi calculada e avaliada de acordo com o método $2^{-\Delta CT}$ modificado (Expressão Relativa $\frac{\text{GENE TESTE}}{\text{GENE CONTROLE}} = \frac{(\text{PCR}_{\text{eff}} \text{ GC})^{\text{Ct}_{\text{GC}}}}{(\text{PCR}_{\text{eff}} \text{ GT})^{\text{Ct}_{\text{GT}}}}$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Cada amostra foi avaliada com quatro repetições técnicas.

3.3.8 Análises fisiológicas

Para elucidar os mecanismos fisiológicos que diferenciam o nível de tolerância ao frio entre os dois genótipos, foram realizadas as seguintes análises fisiológicas.

3.3.8.1 Localização histoquímica *in situ* de radical superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Cerca de 40 sementes de cada genótipo (tolerante e sensível ao frio) foram germinadas em uma câmara BOD por 14 dias a 13°C no escuro. Após, metade das sementes de cada genótipo foi marcada histoquimicamente com azul de nitrotetrazólio (*nitro blue tetrazolium* – NBT) que reage com o radical superóxido (O_2^-), resultando numa coloração azul. A outra metade das sementes foi marcada com diaminobenzidina (*diaminobenzidine* - DAB) que reage com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), resultando numa coloração marrom. Os procedimentos foram realizados de acordo com o método de Shi et al. (2010). Para a detecção do O_2^- , as sementes ficaram imersas em uma solução de 1 mg/mL de NBT em tampão fosfato 10 mM (pH 7,8) a temperatura ambiente, dentro de placas de Petri, sob forte iluminação por 3 horas, utilizando lâmpadas fluorescentes. Para a visualização de H_2O_2 , as sementes ficaram imersas em uma solução de 1 mg/mL de DAB em tampão fosfato 10 mM (pH 7,8) a temperatura ambiente, dentro de placas de Petri, sob forte iluminação por 8 horas, utilizando lâmpadas fluorescentes. Após, as sementes foram mantidas em etanol 70% para serem analisadas e fotografadas com o auxílio de uma câmera fotográfica acoplada a um estereomicroscópio.

3.3.8.2 Avaliação do acúmulo de prolina livre

O nível de prolina livre presente nos coleótilos das sementes dos genótipos

tolerante e sensível ao frio, germinadas por 14 dias a 13°C, foi quantificado de acordo com o método de Bates, Waldran, Teare (1973) adaptado por Shukla et al. (2012). Os coleóptilos de ambos os genótipos foram isolados e pulverizados em nitrogênio líquido. Em seguida, 0,25 g de amostra foram homogeneizados em 2 mL de ácido sulfossalicílico (3%) e centrifugado a 10.000 g por 30 minutos. Após, 1 mL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi adicionado 1 mL de ácido acético glacial e 1 mL de ninidrina (1,25 g de ninidrina + 30 mL de ácido acético glacial + 20 mL de ácido fosfórico 6 M). A mistura homogeneizada foi fervida em banho-maria a 100 °C por 30 minutos. Posteriormente, a reação foi resfriada no gelo e foi acrescentado 2 mL de tolueno, homogeneizando no vórtex por 30 segundos. A fase superior, contendo a prolina, foi medida no espectrofotômetro a 520 nm, usando tolueno como branco. O nível de prolina ($\mu\text{mol/g}$ peso fresco) foi quantificado usando L-prolina como padrão. Esta curva padrão foi preparada a partir de uma solução estoque de prolina (5 mM) em ácido sulfossalicílico para uma gama de concentrações entre 0,01 e 0,32 $\mu\text{mol/mL}$. A concentração de prolina livre de cada amostra foi calculada a partir da equação de regressão linear obtida da curva padrão. O procedimento para a construção da curva padrão foi o mesmo utilizado na determinação de prolina livre das amostras.

3.3.9 Sequenciamento de um gene que codifica a glutathione transferase 2

A fim de verificar se ocorrem SNPs no gene *OsGSTZ2*, que codifica a enzima glutathione transferase, foi realizado o sequenciamento dos genótipos contrastantes em relação ao frio da subespécie *indica*. Para tanto, primeiramente foi extraído DNA de amostras biológicas em triplicatas dos dois genótipos através do método de Dellaporta et al. (1983). Em seguida, foi realizada a purificação de DNA utilizando o GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit da GE Healthcare Life Science. Após, as amostras foram preparadas de acordo com as instruções da empresa Ludwig Biotec (<http://ludwigbiotec.com.br/>) que realizou o sequenciamento posteriormente.

3.3.10 Análises estatísticas

As análises estatísticas para a confirmação da significância dos dados obtidos no RT-qPCR foram realizadas empregando-se o *software* SPSS versão 21.0. A comparação das variáveis quantitativas entre os genótipos tolerante e sensível ao frio foi realizada com a aplicação do teste *t* de Student ($p \leq 0.05$).

4 RESULTADOS

4.1 *Deep sequencing* dos genótipos tolerante e sensível à baixa temperatura

Os genótipos de arroz IRGA 959-1-2-2F-4-1-4-A e IRGA 959-1-2-2F-4-1-4-D-1-CA-1 foram previamente caracterizados, respectivamente, como tolerante e sensível à baixa temperatura (ADAMSKI et al., submetido). Estes genótipos foram usados para a identificação dos mRNAs diferencialmente expressos durante a germinação de sementes sob baixa temperatura (13 °C) por 7 dias, utilizando o sistema Illumina. O *deep sequencing* (sequenciamento em grande escala ou RNAseq) gerou aproximadamente 20 milhões de leituras em cada biblioteca (genótipo tolerante e genótipo sensível). Destas, 25,81% (4.974.030 leituras) e 26,12% (6.033.254 leituras) foram mapeadas, respectivamente, em regiões genômicas.

Como esses genótipos de arroz são linhagens irmãs, a maioria das sequências apresentou número similar de leituras. De forma geral, houve uma clara relação linear nos níveis de expressão dos genes entre os dois genótipos de arroz ($R^2 = 0.9605$; Figura 6A). Por esse motivo, utilizou-se um *p-value* extremamente exigente ($<1.0 \times 10^{-12}$) para identificar os genes diferencialmente expressos entre os dois genótipos. Este critério de seleção identificou 1.361 sequências diferencialmente expressas (tabela suplementar enviada aos membros da banca), sendo que 758 sequências (56%) mostraram-se mais expressas no genótipo tolerante, e 603 sequências (44%) mostraram-se mais expressas no genótipo sensível (Figura 6B).

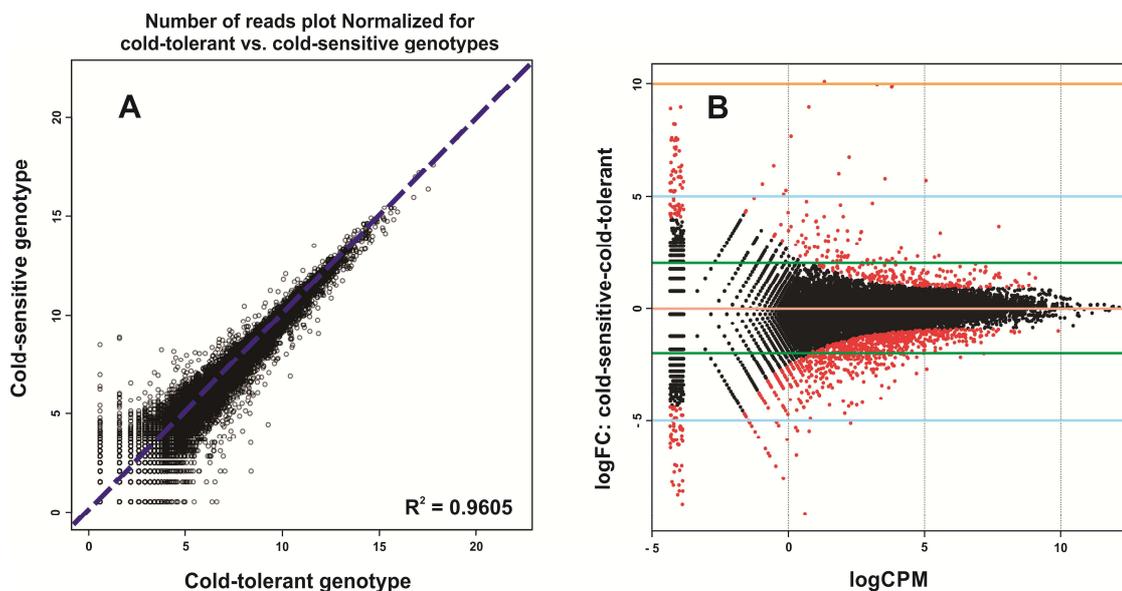


Figura 6 – Distribuição das leituras. A: Aproximadamente 20 milhões de leituras em cada biblioteca foram geradas, sendo que foi detectada uma clara relação linear nos níveis de expressão dos genes entre os dois genótipos de arroz ($R^2 = 0.9605$). B: Identificação de 1.361 sequências diferencialmente expressas (pontos vermelhos) entre os genótipos contrastantes utilizando-se $p\text{-value} < 1.0 \times 10^{-12}$.

4.2 Comparação entre os transcriptomas dos genótipos tolerante e sensível usando a categorização do *Gene Ontology*

Na comparação das sequências diferencialmente expressas entre os genótipos tolerante e sensível utilizando o *Gene Ontology*, foram encontradas um total de 76 categorias enriquecidas somando os dois genótipos. Destas 76 categorias, 22 encontram-se enriquecidas no genótipo tolerante ao frio e 54 enriquecidas no genótipo sensível (Figura 7). Entre os termos enriquecidos no genótipo tolerante estão: metabolismo de carboidratos, metabolismo de lipídios, transporte de íons e atividade antioxidante. Entre os vários termos enriquecidos no genótipo sensível, destacam-se processos envolvidos com resposta ao estímulo abiótico.

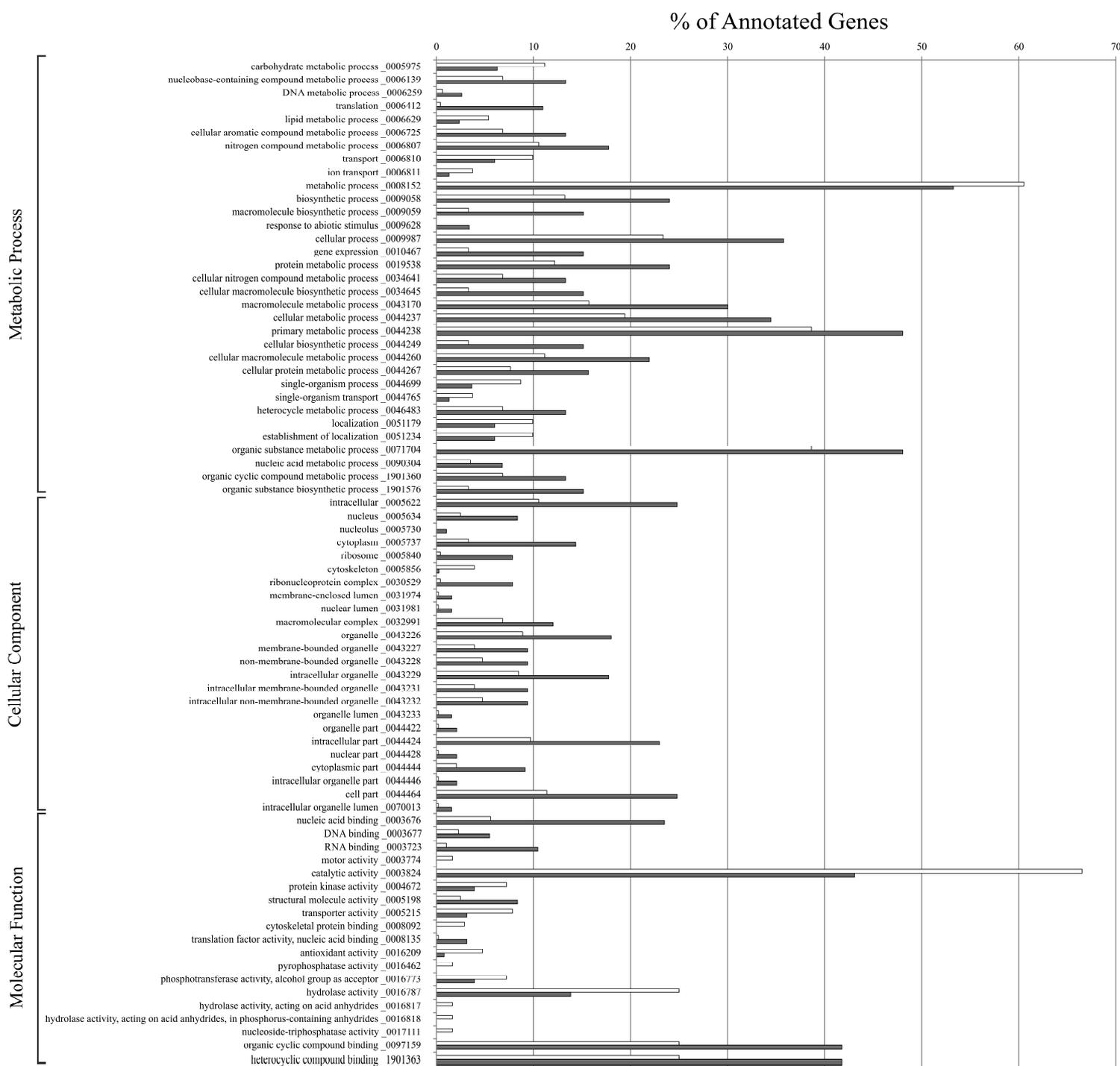


Figura 7 – Categorias enriquecidas encontradas nos genótipos tolerante e sensível ao frio usando o *Gene Ontology*. Colunas brancas e cinzas referem-se, respectivamente, ao genótipo tolerante e sensível ao frio.

4.3 Caracterização dos genes diferencialmente expressos

Através das análises de RNAseq foram identificadas 1.361 sequências diferencialmente expressas entre os genótipos tolerante e sensível a baixa temperatura na fase de germinação das sementes (tabela suplementar enviada aos membros da banca). Dentre estas sequências, foram selecionadas 110 que podem estar relacionadas com o mecanismos de tolerância ao frio. Estas sequências foram separadas de acordo com sua categoria funcional (Tabela 1).

Tabela 1. Seleção dos genes possivelmente envolvidos com a tolerância ao frio.

| Functional category | Description | Location | Normalized number of reads | | |
|--------------------------|---|-----------------------|----------------------------|--------------|----------------------------|
| | | | Tolerant | Sensitive | p-value |
| | Expressed protein (OsEXD) | LOC_Os07g20164 | 1 | 1,295 | 0 |
| Unknown | Expressed protein | LOC_Os04g52750 | 61 | 3,731 | 0 |
| | Expressed protein | LOC_Os11g09710 | 481 | 1 | 4.1 e ⁻¹⁵¹ |
| Cell division and growth | Growth regulator-related protein | LOC_Os04g47520 | 558 | 248 | 8.2 e ⁻³⁹ |
| | Phytosulfokine receptor precursor | LOC_Os02g06090 | 122 | 0 | 3.2 e ⁻³⁷ |
| | Cyclin (OsCYC) | LOC_Os01g59120 | 390 | 182 | 5.7 e⁻²⁵ |
| | Cyclin | LOC_Os06g51110 | 195 | 75 | 7.7 e ⁻¹⁷ |
| | Cyclin-dependent kinase B2-1 (OsCDKB2;1) | LOC_Os08g40170 | 430 | 223 | 5.3 e⁻²³ |
| Cell wall-related | WIP5 - Wound-induced protein precursor | LOC_Os11g37970 | 3,854 | 1,128 | 0 |
| | Glycine-rich cell wall structural protein 2 precursor | LOC_Os10g31660 | 379 | 13 | 2.4 e ⁻¹⁰⁶ |
| | Fasciclin-like arabinogalactan protein 8 precursor | LOC_Os08g23180 | 993 | 574 | 3.4 e ⁻⁴² |
| | Glycine-rich cell wall protein | LOC_Os10g31530 | 1,016 | 601 | 7.5 e ⁻⁴¹ |
| | CESA8 - cellulose synthase | LOC_Os07g10770 | 3,425 | 2,443 | 1.4 e ⁻⁸⁰ |
| | CESA6 - cellulose synthase | LOC_Os07g14850 | 1,593 | 981 | 7.0 e ⁻⁵⁸ |
| | CESA1 - cellulose synthase | LOC_Os05g08370 | 3,844 | 3,098 | 2.3 e ⁻⁵⁵ |
| | CSLE6 - cellulose synthase-like family E | LOC_Os09g30130 | 429 | 111 | 2.9 e ⁻⁵⁵ |

| | | | | | |
|-----------|---|-----------------------|--------------|--------------|-----------------------------|
| | CSLF6 - cellulose synthase-like family F | LOC_Os08g06380 | 471 | 136 | 3.0 e ⁻⁵⁵ |
| | CSLA1 - cellulose synthase-like family A; mannan synthase | LOC_Os02g09930 | 1,069 | 608 | 4.1 e ⁻⁴⁷ |
| | CSLE1 - cellulose synthase-like family E (OsCSLE1) | LOC_Os09g30120 | 354 | 100 | 3.4 e⁻⁴² |
| | Expansin precursor | LOC_Os10g40730 | 921 | 372 | 7.0 e ⁻⁷⁴ |
| | Os3bglu7 - beta-glucosidase, exo-beta-glucanase | LOC_Os03g49600 | 5,959 | 3,431 | 5.8 e ⁻²⁵⁶ |
| | Periplasmic beta-glucosidase precursor | LOC_Os03g53800 | 2,709 | 1,332 | 4.7 e ⁻¹⁶⁰ |
| | Glucan endo-1,3-beta-glucosidase precursor | LOC_Os11g47820 | 3,857 | 2,362 | 1.0 e ⁻¹⁴² |
| | Glycosylhydrolase | LOC_Os06g46284 | 1,728 | 915 | 2.1 e ⁻⁸⁸ |
| | Cellulase | LOC_Os10g22520 | 372 | 131 | 1.6 e ⁻³⁵ |
| | COBRA | LOC_Os05g32110 | 1,901 | 1,488 | 3.2 e ⁻³¹ |
| | Caffeoyl-CoA O-methyltransferase | LOC_Os08g38900 | 606 | 332 | 5.1 e ⁻²⁹ |
| | Aquaporin protein (OsAQU) | LOC_Os07g26690 | 2,523 | 1,072 | 8.7 e⁻¹⁸⁹ |
| | Boron transporter protein | LOC_Os12g37840 | 2,030 | 1,218 | 7.4 e ⁻⁷⁹ |
| | Sulfate transporter | LOC_Os03g09940 | 747 | 285 | 1.3 e ⁻⁶⁴ |
| | Sodium/calcium exchanger protein | LOC_Os01g11414 | 902 | 397 | 1.1 e ⁻⁶³ |
| | Metal transporter Nramp6 | LOC_Os07g15370 | 158 | 1 | 7.7 e ⁻⁴⁹ |
| | Amino acid transporter | LOC_Os02g09810 | 1,164 | 746 | 4.0 e ⁻³⁸ |
| | Transmembrane amino acid transporter protein | LOC_Os02g01100 | 511 | 246 | 3.6 e ⁻³¹ |
| Transport | Oligopeptide transporter | LOC_Os08g38400 | 165 | 52 | 1.9 e ⁻¹⁷ |
| | Potassium transporter | LOC_Os04g32920 | 1,171 | 754 | 8.2 e ⁻³⁸ |
| | Transporter family protein | LOC_Os07g01560 | 470 | 192 | 3.0 e ⁻³⁷ |
| | Peptide transporter PTR2 | LOC_Os06g15370 | 1,313 | 924 | 2.2 e ⁻³² |
| | Major facilitator superfamily domain-containing protein 5 | LOC_Os03g02380 | 776 | 472 | 3.7 e ⁻²⁹ |
| | MDR-like ABC transporter | LOC_Os01g50160 | 1,476 | 1,129 | 8.9 e ⁻²⁷ |
| | Citrate transporter protein | LOC_Os03g05390 | 1,889 | 1,632 | 5.6 e ⁻¹⁹ |
| | Chloride channel protein | LOC_Os08g20570 | 75 | 7 | 7.9 e ⁻¹⁷ |
| | OsHKT2;1 - Na ⁺ transporter | LOC_Os06g48810 | 104 | 21 | 6.4 e ⁻¹⁶ |
| | Desaturase/cytochrome b5 protein | LOC_Os09g16920 | 1,028 | 534 | 1.1 e ⁻⁵⁴ |
| | 3-ketoacyl-CoA synthase | LOC_Os05g49290 | 988 | 595 | 5.2 e ⁻³⁸ |
| | 3-ketoacyl-CoA synthase (OsKET) | LOC_Os11g37900 | 496 | - | 1.3 e⁻¹⁴ |
| | 3-ketoacyl-CoA thiolase | LOC_Os02g57260 | 6,692 | 6,543 | 2.0 e ⁻²⁶ |

| | | | | | |
|-------------------------------|---|-----------------------|--------------|------------|--|
| | Acyl-desaturase, chloroplast precursor | LOC_Os01g69080 | 649 | 1,412 | 1.4×10^{-37} |
| | Fatty acid desaturase | LOC_Os07g23410 | 217 | 53 | 3.9×10^{-29} |
| | Fatty acid hydroxylase | LOC_Os07g01150 | 630 | 372 | 1.4×10^{-25} |
| | WAX2 | LOC_Os09g25850 | 210 | 53 | 2.2×10^{-27} |
| | Peroxidase precursor | LOC_Os07g48020 | 2,253 | 588 | 2.2×10^{-290} |
| | Peroxidase precursor (<i>OsPRX</i>) | LOC_Os01g19020 | 1,160 | 205 | 1.1×10^{-195} |
| Detoxification | <i>OsAPx1</i> - Cytosolic Ascorbate Peroxidase | LOC_Os03g17690 | 8,885 | 6,839 | 5.9×10^{-157} |
| | <i>OsAPx2</i> - Cytosolic Ascorbate Peroxidase Metallothionein | LOC_Os07g49400 | 1,957 | 1,581 | 5.3×10^{-28} |
| | | LOC_Os12g38270 | 1,022 | 359 | 6.4×10^{-98} |
| | Glutathione S-transferase | LOC_Os01g27210 | 942 | 479 | 3.5×10^{-52} |
| | Monodehydroascorbate reductase | LOC_Os08g44340 | 1,260 | 999 | 1.1×10^{-19} |
| | Chaperone protein dnaJ | LOC_Os03g44620 | 7,204 | 13,328 | 6.5×10^{-208} |
| | Heat shock protein | LOC_Os09g30412 | 11,729 | 19,185 | 6.2×10^{-167} |
| Protein structure maintenance | Heat shock protein 101 | LOC_Os05g44340 | 328 | 822 | 5.9×10^{-31} |
| | Hsp20/alpha crystallin family protein | LOC_Os01g08860 | 26 | 320 | 8.2×10^{-53} |
| | Chaperone protein clpB 1 | LOC_Os03g31300 | 953 | 1,617 | 2.8×10^{-17} |
| | Early-responsive to dehydration protein-related | LOC_Os01g72210 | 664 | 1,428 | 6.9×10^{-37} |
| | F-box domain containing protein (<i>OsFBX221</i>) | LOC_Os07g09814 | 21 | 204 | 2.8×10^{-30} |
| | <i>OsFBX114</i> - F-box domain containing protein | LOC_Os04g02280 | 0 | 91 | 1.4×10^{-22} |
| | <i>OsFBX335</i> - F-box domain containing protein | LOC_Os09g32860 | 0 | 80 | 1.1×10^{-19} |
| | <i>OsFBDUF53</i> - F-box and DUF domain containing protein | LOC_Os11g37300 | 0 | 83 | 1.5×10^{-20} |
| Protein degradation | Ubiquitin family protein | LOC_Os06g46770 | 38,810 | 51,667 | 3.2×10^{-65} |
| | <i>OsFBL22</i> - F-box domain and LRR containing protein | LOC_Os05g35110 | 969 | 1,879 | 5.8×10^{-35} |
| | <i>OsFBL7</i> - F-box domain and LRR containing protein | LOC_Os02g10700 | 939 | 1,820 | 9.0×10^{-34} |
| | Proteasome-related | LOC_Os05g48340 | 1,254 | 2,177 | 8.0×10^{-26} |
| | Ubiquitin-conjugating enzyme | LOC_Os03g57790 | 1,135 | 1,947 | 6.8×10^{-22} |
| | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase domain containing protein | LOC_Os11g34270 | 83 | 263 | 2.5×10^{-15} |
| | Zinc finger/CCCH transcription factor | LOC_Os01g09620 | 259 | 907 | 3.5×10^{-60} |
| Transcription factor | Zinc finger A20 and AN1 domain-containing stress-associated protein | LOC_Os06g41010 | 1,633 | 3,068 | 9.2×10^{-51} |

| | | | | | |
|-----------------------------|---|-----------------------|--------------|--------------|--|
| | Zinc finger, ZZ type domain containing protein | LOC_Os09g33740 | 128 | 0 | 2.7×10^{-39} |
| | LSD1 zinc finger domain containing protein | LOC_Os08g06280 | 587 | 277 | 5.0×10^{-37} |
| | <i>OsWRKY30</i> | LOC_Os08g38990 | 235 | 703 | 7.4×10^{-37} |
| | MYB family transcription factor | LOC_Os01g12860 | 339 | 121 | 1.2×10^{-31} |
| | bZIP transcription factor family protein | LOC_Os02g14910 | 182 | 34 | 3.0×10^{-29} |
| | E2F family transcription factor protein | LOC_Os02g50630 | 166 | 40 | 9.9×10^{-23} |
| | 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase protein | LOC_Os02g53180 | 281 | 34 | 6.5×10^{-57} |
| | Ethylene-insensitive protein | LOC_Os03g49400 | 514 | 1,270 | 2.4×10^{-46} |
| | Ethylene-responsive transcription factor | LOC_Os02g51670 | 319 | 189 | 6.0×10^{-13} |
| | <i>Os/IAA13</i> - Auxin-responsive Aux/IAA gene family member (<i>OsAUX</i>) | LOC_Os03g53150 | 677 | 277 | 3.5×10^{-53} |
| | <i>Os/IAA31</i> - Auxin-responsive Aux/IAA gene family member | LOC_Os12g40900 | 445 | 215 | 3.5×10^{-27} |
| Hormone signaling | Auxin efflux carrier component | LOC_Os09g38130 | 188 | 49 | 3.0×10^{-24} |
| | Auxin response factor | LOC_Os01g70270 | 1,312 | 2,584 | 1.0×10^{-50} |
| | Auxin-responsive protein | LOC_Os01g48850 | 463 | 257 | 1.3×10^{-21} |
| | Gibberellin 20 oxidase 1 | LOC_Os03g63970 | 204 | 72 | 1.9×10^{-19} |
| | Cytokinin-O-glucosyltransferase 3 | LOC_Os04g44240 | 620 | 451 | 8.1×10^{-14} |
| | <i>OsCML1</i> - Calmodulin-related calcium sensor protein | LOC_Os01g59530 | 617 | 326 | 1.1×10^{-31} |
| | Calcium/calmodulin-depedent protein kinase | LOC_Os05g26820 | 460 | 210 | 9.6×10^{-31} |
| Ca ²⁺ -signaling | IQ calmodulin-binding motif domain containing protein | LOC_Os05g03190 | 658 | 379 | 2.6×10^{-28} |
| | <i>OsCam1-1</i> – Calmodulin | LOC_Os03g20370 | 906 | 658 | 4.3×10^{-20} |
| | <i>OsCML7</i> - Calmodulin-related calcium sensor protein | LOC_Os08g02420 | 282 | 158 | 5.9×10^{-13} |
| Others | Small hydrophilic plant seed protein | LOC_Os05g28210 | 198 | 2,389 | 0 |
| | Small hydrophilic plant seed protein | LOC_Os01g06630 | 6 | 761 | 4.2×10^{-186} |
| | Cysteine synthase | LOC_Os03g53650 | 2,188 | 1,028 | 9.3×10^{-140} |
| | Sucrose synthase | LOC_Os03g28330 | 11,360 | 10,770 | 2.7×10^{-59} |
| | Dehydrin(<i>OsDHM</i>) | LOC_Os11g26570 | 1,795 | 5,557 | 1.5×10^{-309} |
| | Late embryogenesis abundant group 1 | LOC_Os04g49980 | 984 | 3,721 | 1.6×10^{-273} |
| | Late embryogenesis abundant protein, group 3 (<i>OsLEA</i>) | LOC_Os01g50910 | 791 | 2,733 | 1.7×10^{-178} |
| | Phytochrome A | LOC_Os03g51030 | 1,475 | 3,383 | 9.8×10^{-104} |

| | | | | |
|---|----------------|-------|-------|----------------------|
| S-adenosyl-L-methionine decarboxylase leader peptide | LOC_Os02g39795 | 4,468 | 6,562 | 7.5 e ⁻²⁷ |
| S-adenosylmethionine synthetase | LOC_Os01g18860 | 1,094 | 1,957 | 1.5 e ⁻²⁶ |
| <i>HVA22</i> | LOC_Os08g36440 | 102 | 392 | 4.0 e ⁻²⁹ |
| Spermidine synthase | LOC_Os06g33710 | 364 | 791 | 4.7 e ⁻²¹ |

Lista das sequências diferencialmente expressas identificadas pelo RNAseq nas sementes de arroz dos genótipos tolerante e sensível ao frio germinadas por 7 dias a 13°C, selecionadas de acordo com sua expressão e função no metabolismo da planta. As sequências em negrito foram confirmadas por RT-qPCR.

Nas análises do *deep sequencing* foram detectadas várias sequências que codificam proteínas com função desconhecida (tabela suplementar enviada aos membros da banca). Dentre estas, as mais diferencialmente expressas entre o genótipo tolerante e sensível foram selecionadas (Tabela 1). Mesmo que nenhum destes genes tenha sido classificado funcionalmente, será importante avaliar se estas sequências estão de fato relacionadas com a tolerância ao frio na fase de germinação das sementes, já que houve uma diferença expressiva entre os dois genótipos

Entre os genes selecionados, destacam-se os relacionados com processos como divisão celular e crescimento (genes relacionados com ciclinas), espessura da parede celular (genes que codificam celulose sintases), transporte de água (aquaporina), metabolismo lipídico, detoxificação e sinalização por Ca²⁺. Todos estes processos apresentaram níveis de expressão mais elevados no genótipo tolerante ao frio. Diversos fatores de transcrição também foram detectados, tais como famílias *zinc finger*, WRKY, MYB, bZIP e E2F. No entanto, verificou-se que alguns destes fatores de transcrição foram mais expressos no genótipo tolerante e outros mais expressos no genótipo sensível ao frio. Genes envolvidos com manutenção de estrutura proteica, como as HSPs (*Heat shock protein*) e chaperonas, degradação proteica e respostas gerais a estresses abióticos (deidrina e LEA), apresentaram níveis mais elevados de expressão no genótipo sensível ao frio e também foram selecionados para confirmação por RT-qPCR.

4.4 Confirmação dos padrões de expressão do RNAseq utilizando RT-qPCR

Para validar os resultados encontrados no RNAseq e confirmar a expressão diferencial dos genes potencialmente envolvidos na tolerância à baixa temperatura por RT-qPCR, foram projetados *primers* específicos para os genes *OsEXD* (*expressed protein*); *OsCYC* (*cyclin*); *OsCDKB2;1* (*Cyclin-dependent kinase B2-1*); *OsCSLE1* (*cellulose synthase-like family E*); *OsAQU* (*aquaporin protein*); *OsKET* (*3-ketoacyl-CoA synthase*); *OsPRX* (*peroxidase precursor*); *OsFBX221* (*F-box domain containing protein*); *OsAUX* (*OsIAA13 - Auxin-responsive Aux/IAA gene family member*); *OsDHN* (*dehydrin*); *OsLEA* (*late embryogenesis abundant protein, group 3*). Os *primers* específicos para cada um dos genes (além do gene controle *OsUBQ5 - Ubiquitin 5*) estão listados na tabela 2.

Tabela 2 – Genes selecionados para a confirmação da expressão gênica utilizando RT-qPCR com seus respectivos *primers* específicos.

| Gene | Forward primer 5' → 3' | Reverse primer 5' → 3' |
|------------------|------------------------|--------------------------|
| <i>OsEXD</i> | GTTCTCCTTGTGGGTTTTGC | AGGTCAGGGAGAGCCTGTTT |
| <i>OsCYC</i> | AATGGAAGGCGAGTCTGACA | CCAATCCTGGCCATTAGAA |
| <i>OsCDKB2;1</i> | TGATGTTCCACCACCAAGGAA | CAGCATCCAGGAAACAGACA |
| <i>OsCSLE1</i> | TGCCAATTTATGAGGCAATG | GCATCAAATCCCATTTTAGGG |
| <i>OsAQU</i> | GAAGGCGTTGATGAAGCAAT | ACACACACGACAAGCAGGAG |
| <i>OsKET</i> | GGCTCGGTTGTTTGACTTGT | TGTTTACAGGTTGCCTGACG |
| <i>OsPRX</i> | AAGGGGGAGATCAGGAAGAA | ATGGATGTGTGAAAGCCAAA |
| <i>OsFBX221</i> | TTCGCTTGCTGAGGCTACTT | ACCGTCGGAATACAAACAGG |
| <i>OsAUX</i> | GAATGGTGTTCTTGCAAGTGTG | CACCAATCCAGCTACACACAA |
| <i>OsDHN</i> | GCATGCTTCAATGTGTTGCT | AAAAGGCAGGCAGGTACAAA |
| <i>OsLEA</i> | CATGTGTCGTCTTTGGCACT | CCATGGAACCAGAAACATGA |
| <i>OsUBQ5</i> | AACCAGCTGAGGCCCAAGA | ACGATTGATTTAACCAGTCCATGA |

As diferenças nos níveis de expressão encontradas no RNAseq foram confirmadas para os onze genes testados, conforme pode ser visualizado na Figura 8. Considerando-se a eficiência de amplificação de cada par de primer os valores de 90 a 95 %, a maioria dos genes testados (*OsCYC*, *OsCDKB2;1*, *OsCSLE1*, *OsAQU*,

OsKET, *OsPRX* e *OsAUX*) apresentaram maior nível de expressão no genótipo tolerante após 7 dias de tratamento no frio. Destes, apenas um gene (*OsAQU*) teve maior expressão gênica no genótipo tolerante durante a germinação em condições normais (2 dias a 28 °C). Dos onze genes testados, apenas quatro (*OsEXD*, *OsFBX221*, *OsDHN* e *OsLEA*) apresentaram níveis mais elevados de expressão no genótipo sensível após 7 dias de frio, sendo que a expressão de dois deles (*OsEXD* e *OsFBX221*) não foram detectados no genótipo tolerante.

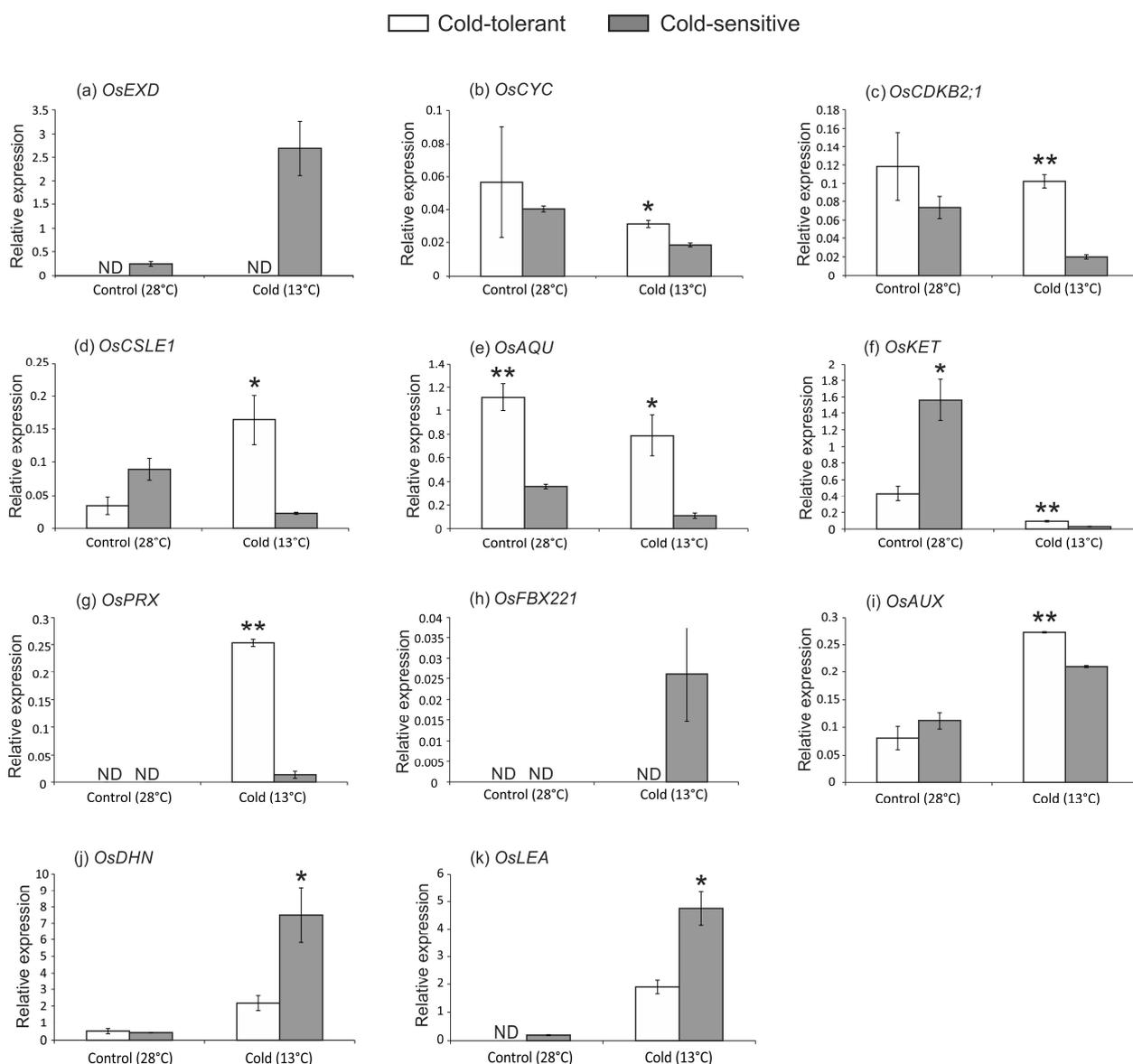


Figura 8 – Confirmação do RNAseq por RT-qPCR. Os níveis de expressão dos onze genes selecionados do RNAseq podem ser comparados entre as sementes dos genótipos tolerante e sensível ao frio germinadas a 28 °C por 2 dias (controle) e a 13 °C por 7 dias, considerando-se: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

4.5 Localização histoquímica *in situ* de radical superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

O sequenciamento em grande escala revelou diversas sequências relacionadas à capacidade antioxidante com maior expressão no genótipo tolerante ao frio, incluindo peroxidase, ascorbate peroxidase, metalotioneína, glutathione S-transferase e monodeidroascorbato redutase. Na avaliação da expressão gênica por RT-qPCR, o gene envolvido com peroxidase (*OsPRX*) também apresentou um nível de expressão significativamente maior no genótipo tolerante ao frio. Diante destes resultados, foi realizada a localização histoquímica *in situ* de O_2^- e H_2O_2 para comparar a presença destes produtos no coleótilo das sementes de ambos os genótipos germinados em condições de baixa temperatura, sendo que a presença de O_2^- fica marcada com a coloração azul e o H_2O_2 com a coloração marrom.

No experimento de localização histoquímica *in situ* de O_2^- não houve diferença entre os coleótilos das sementes dos genótipos tolerante e sensível, como pode ser visualizado na Figura 9. Quanto à localização histoquímica *in situ* de H_2O_2 pela coloração com diaminobenzidina (DAB), os coleótilos das sementes do genótipo sensível apresentaram níveis mais elevados de H_2O_2 , como pode ser visto na Figura 10.

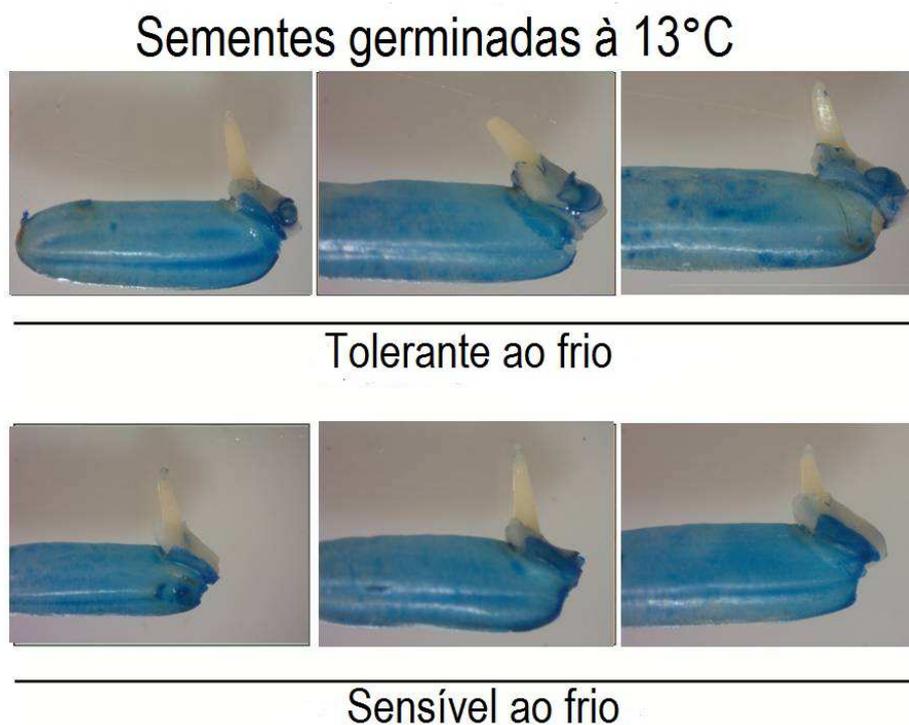


Figura 9 – Localização histoquímica *in situ* de radical superóxido (O_2^-). A localização de O_2^- nos coleóptilos é indicada pela coloração azul.

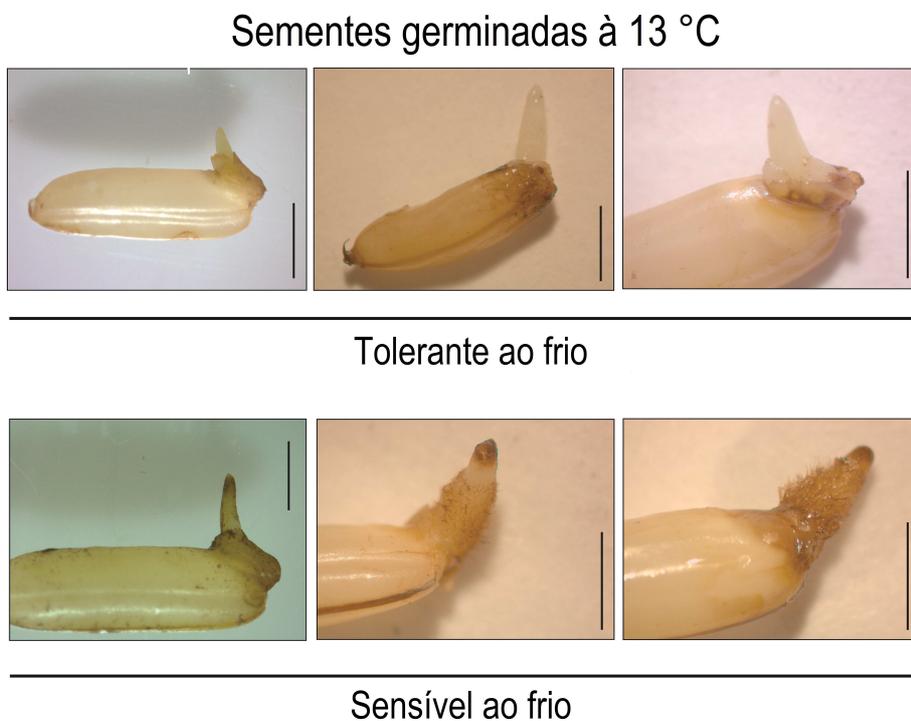


Figura 10 – Localização histoquímica *in situ* de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A localização de H_2O_2 nos coleóptilos é indicada pela coloração marrom.

4.6 Acúmulo de prolina livre nos coleótilos das sementes germinadas no frio

A concentração de prolina livre presente nos coleótilos das sementes dos genótipos tolerante e sensível, germinadas no frio, foi obtida em $\mu\text{mol/g}$. Conforme pode ser visualizado na Figura 11, não houve diferença significativa no acúmulo de prolina entre os genótipos tolerante e sensível ao frio.

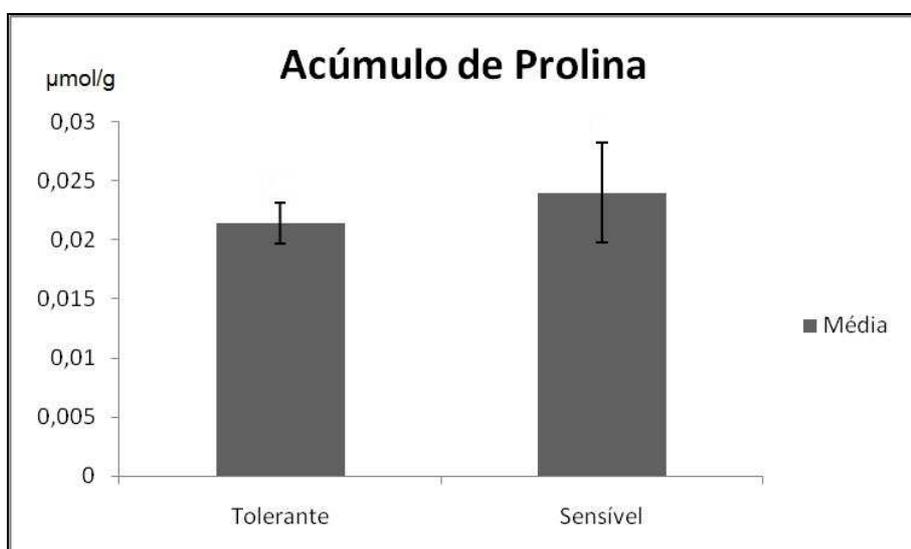


Figura 11 – Acúmulo de prolina livre nos coleótilos das sementes dos genótipos tolerante e sensível ao frio, germinadas a $13\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 14 dias.

5 DISCUSSÃO

5.1 Bibliotecas dos genótipos tolerante e sensível à baixa temperatura

Através da técnica de RNAseq foi possível sequenciar os transcritos expressos nas sementes dos genótipos tolerante e sensível ao frio germinadas sob condição de baixa temperatura. A maioria das sequências apresentou número semelhante de leituras, o que já era esperado por se tratarem de linhagens irmãs. Por causa desta semelhança, preferiu-se utilizar um *p-value* extremamente rigoroso ($<1.0 \times 10^{-12}$) como critério de identificação dos genes diferencialmente expressos, ao invés do *fold-change*. Porque, caso levássemos em conta o *fold-change*, poucas sequências seriam consideradas diferencialmente expressas. Atualmente, sabe-se que mesmo pequenas alterações na expressão de um gene podem ter significância biológica. De acordo com McCarthy e Smyth (2009), considerando-se os termos estatísticos, um gene é diferencialmente expresso se o seu nível de expressão muda sistematicamente, em dois tratamentos, independente de quão pequena a diferença pode ser. Além disso, cortes utilizando *fold-change*, muitas vezes, não levam em conta a variabilidade ou a garantia da reprodutibilidade, por isso a utilização de testes que levam em conta a significância estatística são bastante utilizados (McCarthy; Smyth, 2009). No entanto, Dalman et al. (2012) afirmam que a análise de expressão gênica pode fornecer mais de uma resposta, dependendo da estatística ou do *fold-change* de corte escolhido, implicando na interpretação dos dados. Seguindo estas restrições, houve a detecção de 1.361 sequências

diferencialmente expressas entre sementes do genótipo tolerante e sensível ao frio, germinadas a 13 °C por 7 dias.

5.2 Comparação dos transcriptomas tolerante e sensível utilizando a categorização do *Gene Ontology* (GO)

A comparação dos transcriptomas dos genótipos tolerante e sensível ao frio utilizando os termos *Gene Ontology* (GO) possibilitou encontrar categorias funcionais enriquecidas em cada um dos genótipos. Entre os termos diferencialmente enriquecidos identificados no genótipo tolerante observou-se: metabolismo de carboidratos e de lipídios, transporte de íons e atividade antioxidante. Estes termos estão relacionados a processos induzidos pela baixa temperatura, como aumento da síntese de celulose, aumento na instauração de ácidos graxos de membrana, osmorregulação e ativação de enzimas antioxidantes de defesa, respectivamente (MAHAJAN; TUTEJA, 2005; KARGIOTIDOU et al., 2008; LIU et al., 2012; ZHANG et al., 2012). Desta forma, há possibilidade destes mecanismos serem relacionados com a tolerância à baixa temperatura observada no genótipo tolerante. Observou-se que grande parte dos termos enriquecidos encontrados no genótipo sensível ao frio estão relacionados a respostas a estresses abióticos gerais (Figura 7). Isso pode ser um indicativo de que o genótipo sensível tenta responder aos danos provocados pela baixa temperatura, enquanto que o genótipo tolerante evita a ocorrência de danos por outros mecanismos de proteção.

5.3 Caracterização dos genes diferencialmente expressos

A partir das 1.361 sequências diferencialmente expressas detectadas pelo RNAseq, foram selecionadas 110 sequências que possivelmente estão relacionadas com as respostas à baixa temperatura nos genótipos tolerante e sensível ao frio (Tabela 1).

Analisando as sequências diferencialmente expressas, foram observadas

diversas que codificam proteínas com função desconhecida. Destas, as mais diferencialmente expressas foram selecionadas na Tabela 1, pois elas podem estar relacionadas à tolerância ao frio nas sementes em germinação. Por isso, uma destas sequências (*OsEXD*) foi selecionada para a realização da confirmação por RT-qPCR, como apresentado na Figura 8.

As baixas temperaturas podem prejudicar a germinação das sementes de arroz, provocando atraso no desenvolvimento da planta. A manutenção da divisão celular, mesmo sob baixa temperatura, parece ser uma estratégia eficiente utilizada pelas plantas de arroz tolerantes. Os genótipos de arroz utilizados nos experimentos do presente trabalho apresentaram diferentes comprimentos de coleótilo quando germinados sob baixa temperatura, sendo verificados coleótilos mais curtos no genótipo sensível ao frio (ADAMSKI et al., 2014). Como pode ser visto na Tabela 1, as sequências relacionadas com a divisão e crescimento celular foram detectadas com níveis de expressão mais elevados no genótipo tolerante ao frio. Uma dessas sequências codifica o receptor de phytosulfokine localizado na membrana, que atua na ligação de phytosulfokine (PSK), um fator de crescimento pentapeptídico que promove alta proliferação celular nas plantas (YANG et al. 2000). PSK controla o comprimento do hipocótilo (porção do eixo embrionário que origina a raiz) e a expansão das células em *Arabidopsis thaliana* (STÜHRWOHLDT et al., 2011), provavelmente atuando em conjunto com hormônios brassinosteroides, promotores de crescimento que regulam processos fisiológicos nas plantas, tais como divisão e alongamento celular (CHEON et al., 2013; HATMANN et al., 2013). No entanto, a proliferação celular nas plantas é controlada principalmente por uma família de quinase dependente de ciclina (CDKs), cuja atividade está diretamente regulada por ligação e ativação de ciclinas (LA et al., 2006). Como visto na Tabela 1, foram encontradas sequências que codificam ciclinas e quinases-dependente de ciclina com maior expressão no genótipo tolerante ao frio. De acordo com Mahajan, Tuteja (2005), redução na atividade de quinase dependente de ciclina resulta em baixa taxa de divisão celular e inibição do crescimento sob condições de déficit hídrico em plantas de arroz, sendo que já se sabe que o estresse por déficit hídrico e baixa temperatura compartilham várias respostas moleculares, entre elas, desidratação celular e desequilíbrio osmótico. Ma et al. (2009) superexpressaram o fator de

transcrição *OsMYB3R-2* em arroz, resultando em um aumento na tolerância ao estresse causado por baixa temperatura, através da alteração de genes relacionados com o ciclo celular, incluindo o gene que codifica a ciclina *OsCycB1;1*, o que sugere que um dos mecanismos de tolerância ao frio em arroz pode ser mediado através da regulação do ciclo celular. Endo et al. (2012) mostraram que *OsCDKB2;1*, o mesmo gene identificado no nosso trabalho, está envolvido em respostas a danos no DNA e na mitose em arroz, impedindo o atraso mitótico e auxiliando na progressão do ciclo celular em resposta aos danos no DNA. Chen et al. (2011), superexpressaram o gene *OsRAN2*, que é essencial para a mitose e pode promover a exportação de tubulina intranuclear no final da mitose, e verificaram que as plantas de arroz transgênicas que mantêm a divisão celular sob condições de frio aumentam a sua tolerância (até 80% de sobrevivência em comparação aos 14% das plantas selvagens). A superexpressão de *OsRAN1* em plantas transgênicas agiu como um regulador da via de sinalização do frio em arroz, mantendo também o índice mitótico e a progressão do ciclo celular em condições de estresse (XU; CAI, 2014). Em outro estudo, Qi et al. (2012) verificaram que o QTL GL3.1, através de um processo mediado por uma fosfatase que afeta a fosforilação da ciclina-T1;3 durante a progressão do ciclo celular, acelera a divisão celular, resultando assim em grãos mais longos e com maior rendimento (Qi et al., 2012). Testes de silenciamento da ciclina-T1;3 em arroz resultou em grãos mais curtos, indicando que a ciclina de fato atua na regulação do ciclo celular (Qi et al., 2012).

O crescimento das células deve-se a um aumento no volume celular, que é obtido pelas plantas por um aumento na extensibilidade da parede celular. Isso é possível por meio do potencial osmótico das células, que se manifesta pela pressão hídrica e pela absorção de água. Três dos principais solutos envolvidos na regulação osmótica são K^+ , Cl^- e sacarose (STÜHRWOHLDT et al., 2011). Uma das sequências mais expressas detectadas no genótipo tolerante ao frio (*Expansin precursor*) codifica uma proteína expansina, que facilita o afrouxamento ou extensibilidade da parede celular por meio de um mecanismo não-enzimático, levando à expansão celular (SAMPEDRO; COSGROVE, 2005). Baixos níveis de expressão de expansinas já foram relacionados à sensibilidade à baixa temperatura em plantas de algodão (ZHENG et al., 2012). Resultados desta pesquisa sugerem

que o aumento da manutenção do equilíbrio osmótico, afrouxamento da parede celular, biossíntese de componentes da parede celular e homeostase do citoesqueleto auxiliam na tolerância à baixa temperatura durante o desenvolvimento das plantas (ZHENG et al., 2012). O mesmo foi observado por Abuqamar et al. (2013) em plantas de *Arabidopsis thaliana* sob condições de estresse abiótico (alta salinidade e baixa temperatura).

O acúmulo de sacarose e também de açúcares simples, que ocorrem com a aclimação ao frio, contribuem para a estabilização da membrana através da proteção de proteínas intracelulares (MAHAJAN; TUTEJA, 2005). Várias novas sequências que codificam β -glucosidases e glicosil-hidrolases apresentaram níveis de expressão mais elevados no genótipo tolerante ao frio, sugerindo que os processos de síntese de sacarose e hidrólise de polissacarídeos para gerar açúcares simples, como a glicose, estão mais funcionais neste genótipo. Foi demonstrado que plantas de arroz transgênicas que acumulam maiores concentrações de oligo e polissacarídeos que as plantas não-transgênicas, exibem reforçada tolerância à baixa temperatura (KAWAKAMI; SATO; YOSHIDA, 2008).

Altos níveis de expressão de um gene que codifica aquaporina também foram detectados no genótipo tolerante ao frio, o que sugere que o processo de transporte e/ou absorção de água é mais eficiente neste genótipo (Tabela 1), uma vez que os principais facilitadores do movimento de água através das membranas celulares das plantas incluem proteínas do tipo canal, chamadas de aquaporinas (PANDEY et al., 2013). A germinação das sementes é completamente dependente da absorção adequada de água, a fim de restaurar a atividade metabólica da semente. O atraso na germinação percebido no genótipo sensível ao frio pode estar relacionado a um processo ineficiente de absorção de água. Como o frio provoca rigidez das membranas plasmáticas, o que acaba levando a uma desidratação celular, um transporte eficiente de água é fundamental para manter a viabilidade da célula. No estudo de KUWAGATA et al. (2012) constatou-se que as aquaporinas tiveram papel significativo no movimento da água no interior dos brotos das plantas de arroz avaliadas sob estresse (baixa umidade do ar e baixa temperatura). Os resultados sugeriram que a capacidade da planta em absorver a água é um fator fundamental para o crescimento e produtividade durante períodos de baixa temperatura

(KUWAGATA et al., 2012). Aquaporinas já têm sido sugeridas como responsáveis pela aclimação (AHAMED et al., 2012) e pela tolerância ao frio em plantas de arroz (MATSUMOTO et al., 2009), provavelmente pela manutenção da homeostase de água (MAUREL et al. 2002).

O genótipo tolerante ao frio também apresentou níveis elevados de expressão de vários transportadores, tais como de potássio, cloro, boro, sulfato, sódio, cálcio, aminoácidos, peptídeos e citrato, como pode ser visualizado na Tabela 1. De modo geral, os mecanismos de transporte do genótipo tolerante ao frio parecem ser mais ativos e eficientes quando comparados com o genótipo sensível ao frio, mantendo o equilíbrio osmótico das células, e, dessa forma, contribuindo com a homeostase de íons mesmo sob condições estressantes. Sabe-se que as baixas temperaturas ativam canais iônicos (MAHAJAN; TUTEJA, 2005) e que a superexpressão de transportadores de íons pode resultar em um aumento na tolerância a estresses abióticos, como foi visto com *AtHKT1;1* (um transportador de sódio) que melhorou a tolerância a alta salinidade em plantas de arroz (PLETT et al., 2010). Em outro estudo, íons cálcio agiram como sinalizadores importantes nas respostas ao estresse por baixa temperatura em arroz (KOMATSU et al., 2007).

Outro mecanismo para tornar as plantas de arroz tolerantes à baixa temperatura é o remodelamento da parede celular, como demonstrado por Gothandam et al. (2010), que superexpressaram um gene que codifica uma proteína relacionada com a parede celular (*OsPRP3*) e verificaram um aumento significativo na tolerância ao frio, comparando-se com as plantas selvagens. Análises por microscopia revelaram que as paredes celulares das plantas transgênicas apresentavam-se mais íntegras que as paredes celulares das plantas selvagens. Diversas celulose sintases e sequências que codificam proteínas relacionadas à síntese de lignina foram identificadas em nosso estudo, sendo mais expressas no genótipo tolerante ao frio. Liu et al. (2012) encontraram uma correlação positiva entre os níveis de expressão de genes de celulose sintase e a tolerância ao estresse abiótico em plantas de arroz. Em outro estudo, a alta expressão do gene *OsCESA9*, que também codifica uma celulose sintase, desempenhou papel importante na síntese de parede celular e crescimento da planta de arroz em condições de estresse (WANG et al., 2012). Segundo Somerville (2006), a síntese de celulose é

catalisada por diversos tipos de celulose sintases que utilizam UDP-glicose como substrato. Até hoje, 11 genes CESA (*OsCESA1-11*) foram identificados no genoma do arroz. Em nosso trabalho, diversos genes CESA (CESA1, CESA6, CESA8) foram detectados mais expressos no genótipo tolerante ao frio. Genes do grupo celulose sintase-like (CSL) apresentam alta similaridade com as sequências CESA. Ambas apresentam a função de controlar a síntese da parede celular em plantas superiores (WANG et al., 2010). Existem diversas famílias de CSL, inclusive algumas identificadas no nosso trabalho (CSLE1, CSLE6, CSLA1, CSLF6). Wang et al. (2010) avaliaram diversos tecidos de arroz e constataram que todos os tecidos apresentam ao menos um gene da família CSL altamente expresso, sugerindo que toda família CSL é essencial para a biossíntese da parede celular. Em outro estudo, verificou-se que o gene *OsCSLF6* medeia a biossíntese de *mixed-linkage glucan* (MLG), um polissacarídeo estrutural da parede celular (VEJA-AS'NCHEZ et al., 2012). A proteína COBRA, que pode estar envolvida com a deposição de celulose na parede celular, também foi detectada em nosso trabalho. Li et al. (2003), averiguaram que o gene *BC1* (*Brittle Culm 1*) de arroz, que codifica uma proteína do tipo COBRA, controla diversos mecanismos importantes de biossíntese de parede celular, como a deposição de celulose e direcionamento da expansão celular. Este mesmo padrão de expressão foi encontrado para o gene *BC6* (*Brittle Culm 6*). Porém, neste caso a deposição de celulose era especificamente na parede celular secundária (KOTAKE et al. 2011). Recentemente, Li et al. (2013) verificaram que a diminuição por RNAi na expressão de um gene que codifica cafeoil-CoA O-metil transferase leva à redução da produção de lignina na palha do milho. Um novo gene que codifica cafeoil-CoA O-metil transferase foi identificado em nosso trabalho, sendo mais expresso no genótipo tolerante ao frio. Há indicativos que outra nova sequência identificada em nosso trabalho (*WIP5 - Wound-induced protein 5*) também está envolvida com o reforço da parede celular, como descrito anteriormente por Yen et al. (2001) que estudaram um gene que codifica a proteína WI12. No estudo, análises histoquímicas revelaram que a proteína WI12 (da mesma família da proteína *WIP5*) acumula-se preferencialmente na parede celular, reforçando a sua composição e estrutura após a exposição da planta a estresses ambientais, garantindo assim o seu desenvolvimento sob condições estressantes (YEN et al., 2001). Todos estes dados sugerem que o genótipo tolerante ao frio pode manter a integridade da parede

celular em condições de baixa temperatura de forma mais eficiente que o genótipo sensível.

Danos na membrana celular, como lise das células, são os principais efeitos causados pela baixa temperatura (UEMURA; STEPONKUS, 1997; MAHAJAN; TUTEJA, 2005). Os lipídios de membrana podem ser compostos por dois tipos de ácidos graxos: saturado e insaturado. Os lipídios contendo altas proporções de ácido graxo saturado solidificam a uma temperatura mais elevada do que os lipídios que contêm altas proporções de ácido graxo insaturado. Desta forma, a porção relativa de ácidos graxos insaturados presentes na membrana influencia fortemente a sua fluidez (STEPONKUS; UEMURA; WEBB, 1993; IBA, 2002; MAHAJAN; TUTEJA, 2005). Várias sequências que codificam ácido graxo dessaturases, conhecidos por participarem da aclimatação ao frio por meio de modificações na estrutura dos ácidos graxos de membrana (KARGIOTIDOU et al., 2008), foram detectadas com maior expressão no genótipo tolerante ao frio (Tabela 1 e tabela suplementar enviada aos membros da banca), sugerindo que as sementes em germinação deste genótipo apresentam níveis mais elevados de ácidos graxos insaturados quando submetidos à baixa temperatura. Em plantas tolerantes ao frio, a quantidade de ácidos graxos saturados normalmente é menor que 20% (IBA, 2002). Kargiotidou et al. (2008) mostraram que aumentando a expressão de ácido graxo dessaturase delta 12 (FAD2) ou de outras isoformas de dessaturases, aumenta a capacidade de aclimatação de plantas de algodoeiro submetidas a condições de baixa temperatura. Em *Arabidopsis thaliana*, o gene *FAD8*, que codifica uma ácido graxo dessaturase, também contribuiu para a tolerância a baixa temperatura por alteração na composição de lipídios (GIBSON et al., 1994). Outros dois genes relacionados ao metabolismo lipídico que apresentaram diferentes níveis de expressão entre os dois genótipos testados foram 3-cetoacil-CoA sintase e *WAX2*, ambos envolvidos com biossíntese de cera. Recentemente, três diferentes grupos de estudo verificaram que a tolerância à seca no arroz pode ser induzida pelo acúmulo de cera nas membranas plasmáticas (ISLAM et al., 2009; ZHOU et al. 2013; ZHU; XIONG, 2013). Quanto ao frio, Amid et al. (2012) demonstraram que a sensibilidade a esse estresse em *Arabidopsis thaliana* pode estar relacionada com deficiência cuticular. A camada de cutícula é composta por ácidos graxos hidroxilados incorporados com ceras. Todd

et al. (1999) verificaram que a alta expressão de *KCS1*, um gene que codifica uma ácido graxo 3-cetoacil-CoA sintase, contribui para a biossíntese de cera. Desta forma, aparentemente, a biossíntese de cera também pode ser estimulada por baixa temperatura no arroz, e os nossos resultados sugerem que o genótipo tolerante ao frio sintetiza mais cera que o genótipo sensível em condições de baixa temperatura.

Diversas sequências relacionadas com a capacidade antioxidante foram detectadas como sendo mais expressas no genótipo tolerante ao frio, incluindo peroxidases, ascorbato peroxidase (APX), metalotioneína, glutathione S-transferase e monodeidroascorbato redutase. Diversos estudos têm relacionado a atividade de enzimas antioxidantes com a resposta ao frio (BONNECARRÉRE et al., 2011; ZHANG et al., 2012). Guo et al. (2006) salientam que a tolerância ao frio ou a outros estresses, como a seca, está relacionado com o aumento da capacidade antioxidante durante a condição de estresse. Sato et al. (2011) superexpressaram o gene *OsAPXa*, que possui atividade de ascorbato peroxidase, obtendo plantas de arroz transgênicas tolerantes ao frio. Esta peroxidase promoveu diminuição nos níveis de H_2O_2 e de peroxidação lipídica (SATO et al., 2011). Usando os mesmos genótipos do nosso estudo, Adamski et al. (submetido) mostraram que o genótipo tolerante ao frio apresenta maior atividade de ascorbato peroxidase em sementes germinadas a 13 °C por 14 dias. Metalotioneínas (MTs) pertencem a uma família de proteínas de baixo peso molecular, ricas em cisteína, capazes de se ligar a íons de metais pesados e também de eliminar espécies reativas de oxigênio (ERO's) (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002; KUMAR et al., 2012; ZHANG et al., 2014). Vários estudos têm demonstrado que metalotioneínas atuam na resposta ao estresse abiótico (JIN et al., 2006; GAUTAM et al., 2012). Kumar et al. (2012) mostraram que a expressão ectópica de *OsMT1e-P* (metalotioneína de arroz) confere tolerância a múltiplos estresses abióticos em plantas de tabaco, através de eliminação de ERO's. Em concordância com estas descobertas, no nosso trabalho também foi detectada maior expressão de um gene que codifica uma cisteína sintase no genótipo tolerante ao frio (Tabela 1).

As glutathione transferases (GSTZs) são enzimas multifuncionais que podem ser responsáveis pela tolerância a vários estresses (baixa temperatura, alta salinidade, seca) através da detoxicação de compostos xenobióticos e de ERO's

(TAKEAWA et al., 2002; KIM; ANDAYA; TAI, 2011). A superexpressão do gene *OsGSTZ2* favoreceu a germinação e o crescimento das plântulas de arroz em baixas temperaturas, sugerindo que o catabolismo da tirosina desempenha função importante para a tolerância a este estresse abiótico, já que as GSTZs podem participar do metabolismo da tirosina catalisando a isomerização de maleilacetoacetato para fumarilacetoacetato (TAKESAWA et al., 2002). Em outro estudo, a superexpressão do gene glutationa-S-transferase (*OsGSTL2*) de arroz em *Arabidopsis* levou à tolerância a metais pesados e outros tipos de estresses abióticos, incluindo baixa temperatura (KUMAR et al. 2013). O sequenciamento de várias linhagens das subespécies *japonica* e *indica*, por Kim e colaboradores (2011), revelou dois SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) no gene *OsGSTZ2*, que resultam em diferenças de aminoácidos. Na posição 295, foi verificada uma troca A>G, resultando na substituição de uma isoleucina por uma valina. Na posição 551, foi verificada uma troca A>T, resultando na substituição de uma glutamina por uma isoleucina. A substituição por valina causou uma significativa redução da atividade da enzima GSTZ2, levando à sensibilidade a baixa temperatura nas plântulas de arroz, enquanto que o resíduo de isoleucina não promoveu nenhuma alteração (KIM; ANDAYA;TAI, 2011). Baseando-se no estudo de Kim e colaboradores (2011), realizamos o sequenciamento das duas linhagens contrastantes da subespécie *indica* selecionadas no nosso trabalho para verificar se ocorrem os dois SNPs no gene *OsGSTZ2*, o que poderia estar influenciando a tolerância à baixa temperatura. Os dois genótipos apresentam a mesma sequência de nucleotídeos encontrada por Kim e colaboradores (2011) na cultivar sensível ao frio. Portanto, a tolerância ao frio encontrada no genótipo do nosso estudo não pode ser relacionada com uma alta atividade enzimática de GSTZ2.

Conforme informado anteriormente, uma nova sequência que codifica uma monodeidroascorbato redutase foi encontrada como sendo mais expressa no genótipo tolerante ao frio. Esta enzima tem sido apontada como importante para a tolerância de plantas cultivadas a estresses abióticos (DO et al., 2014). A superexpressão de *AeMDHAR*, que codifica uma monodeidroascorbato redutase na planta de mangue *Acanthus ebracteatus*, conferiu tolerância à alta salinidade em arroz durante as fases de germinação e vegetativa, através da minimização dos

efeitos deletérios por eliminação de EROs (SULTANA et al., 2012). Portanto, há indícios de que esta classe de enzima antioxidante pode ser utilizada para gerar plantas de arroz tolerantes a estresses.

Devido a detecção de várias peroxidases com maior expressão no genótipo tolerante ao frio, foram realizadas análises fisiológicas de detecção histoquímica *in situ* de H_2O_2 com diaminobenzidina (DAB), para verificar se de fato o genótipo tolerante ao frio apresenta níveis mais baixos de H_2O_2 . Conforme visto na Figura 10, os coleótilos das sementes do genótipo tolerante apresentam níveis mais baixos de marcação de H_2O_2 quando germinadas a 13 °C por 14 dias, sugerindo que as peroxidases estão mais ativas neste genótipo em condição de baixa temperatura. Também foi realizada a detecção *in situ* de O_2^- com o reagente *nitro blue tetrazolium* (NBT). Conforme pode ser visualizado na Figura 9, os coleótilos de ambos os genótipos não apresentaram pontos azulados, indicando que não existe diferença nos níveis de O_2^- nos genótipos tolerante e sensível ao frio.

Várias novas sequências de famílias de fatores de transcrição (FT) foram detectadas em nossas análises de expressão gênica diferencial, tais como proteínas *zinc finger*, WRKY, MYB, bZIP e E2F. Observa-se que algumas dessas sequências são mais expressas no genótipo tolerante e outras são mais expressas no genótipo sensível ao frio (Tabela 1), o que não permite a sua vinculação direta com o mecanismo de tolerância à baixa temperatura. Conforme Cruz et al. (2013), uma série de FT têm sido relacionados às respostas ao frio, sendo que vários deles, quando superexpressos, levam à tolerância ao frio em plantas de arroz. De qualquer forma, FT são excelentes alvos para manipular rotas complexas, e uma lista de novos FT com possível envolvimento na resposta a baixas temperaturas na subespécie *indica* é fornecido aqui, embora mais estudos sejam necessários para elucidar suas funções e sua participação na resposta ao frio.

Os hormônios vegetais são pequenas moléculas que regulam o crescimento e o desenvolvimento. Através de modificações em sua síntese e distribuição, as plantas são capazes de coordenar e promover a sua sobrevivência sob condições de estresse ambiental (COLEBROOK et al., 2014). Detectamos diversas sequências que codificam proteínas relacionadas à sinalização mediada por hormônios vegetais

(Tabela 1). Algumas destas sequências podem estar relacionadas com respostas ao estresse por baixa temperatura em ambos os genótipos e outras podem estar relacionadas com a tolerância do genótipo IRGA 959-1-2-2F-4-1-4-A. Zhang et al. (2012) e Lu et al. (2014) sugeriram que ocorre uma estreita interação entre a sinalização mediada por auxina e a resposta ao estresse por baixa temperatura em plantas de arroz. Jain e Khurana (2009) constataram que a auxina pode alterar a expressão de vários genes responsivos ao estresse e, recentemente, Xu e Cai (2014) verificaram que o gene *OsRAN1*, essencial para a tolerância ao frio nas linhagens de arroz testadas, foi regulado por uma via de sinalização mediada por auxina. A sinalização mediada por etileno também já foi relacionada à tolerância ao frio em mudas de arroz, através da superexpressão do fator de resposta TERF2 (TIAN et al. 2011). Além disso, os níveis do hormônio giberelina estão positivamente correlacionados com o crescimento das plantas sob condições de estresse, incluindo o estresse por baixa temperatura (COLEBROOK et al., 2014). Diante do exposto, nossos resultados sugerem que a interferência hormonal regula a resposta das sementes germinadas sob baixa temperatura, provavelmente com o gradiente de auxina intracelular desempenhando um papel central (RAHMAN, 2013).

As proteínas citoplasmáticas de sinalização de Ca^{2+} detectam perturbações celulares e retransmitem estas informações para outras moléculas, servindo como um importante componente da sinalização sob baixa temperatura e outros estresses abióticos (Zhang et al., 2013; HUDA et al., 2014). Conforme pode ser visualizado na Tabela 1, foram detectados vários genes relacionados com sinalização de Ca^{2+} mais expressos no genótipo tolerante, sendo a maioria referente à calmodulina (CAM), evidenciando processos de sinalização de Ca^{2+} mais ativos neste genótipo. De acordo com Chinpongpanich et al. (2012), as proteínas relacionadas com CAM podem desempenhar a função de sensores na regulação de respostas a estresses abióticos (incluindo baixas temperaturas) mediadas por Ca^{2+} . No estudo de Huda et al. (2014), verificou-se que a expressão do gene *ACA6* de arroz foi induzida pelo frio. Quando foi superexpresso em plantas de tabaco, conferiu tolerância à baixa temperatura, através da regulação de enzimas antioxidantes mediadas pela interação com diferentes decodificadores de sinal de Ca^{+2} , incluindo proteínas como calmodulin-like proteins, calcium/calmodulin dependent protein kinases (CDPKs) e

receptor-like protein kinases (RLKs). O gene que codifica a proteína quinase 13 dependente de Ca^{2+} (*OsCDPK13*) desempenha função importante na transdução de sinal em baixa temperatura, uma vez que variedades de arroz tolerantes ao frio exibiram maior expressão de *OsCDPK13* que variedades sensíveis ao frio. Esta proteína acumula-se em resposta ao frio e a sua superexpressão tornou-se um alvo importante para o desenvolvimento de plantas de arroz tolerantes ao estresse (ABBASI et al., 2004; KOMATSU et al., 2007).

Foi observado que diversos genes apresentam maior expressão no genótipo sensível ao frio, tais como genes que codificam proteínas de choque térmico (HSPs), *early responsive to dehydration*, proteínas relacionadas a ubiquitinação/proteassomo, desidrinas, proteínas *late embryogenesis abundant* (LEA), S-adenosil-L-metionina descarboxilase, S-adenosilmetionina sintetase e espermidina sintetase (Tabela 1). Isso é um indicativo de que o genótipo sensível ao frio também apresenta respostas de defesa frente ao estresse, como uma tentativa de superar os danos impostos pela condição de baixa temperatura. Foi comprovado que a desnaturação de proteínas ocorre em altos níveis em plantas sensíveis à baixa temperatura, resultando em dano celular (GUY; HASKELL; LI, 1998). A ativação das HSPs depende da temperatura em que cada espécie cresce normalmente. As HSPs são caracterizadas por se ligarem a proteínas estruturalmente instáveis, desempenhando importantes funções fisiológicas como chaperonas moleculares, que vão além das funções de dobramento de proteínas, pois auxiliam também na resposta aos estresses abióticos em plantas, especialmente sob temperaturas extremas (IBA, 2002; CHAUHAN et al., 2011). Kim e Nam (2010) mostraram que o gene *ERD10* de *Arabidopsis thaliana* pode desempenhar papel de proteção sob vários estresses ambientais, incluindo o frio, e também na germinação e desenvolvimento das sementes, atuando como proteínas do tipo chaperonas (KOVACS et al., 2008). O acúmulo de vários agentes crioprotetores, incluindo as poliaminas que protegem as proteínas intracelulares, é possível através da indução de genes que codificam chaperonas moleculares (MAHAJAN; TUTEJA, 2005). Três novos genes, que tiveram maior expressão no genótipo sensível ao frio, os quais codificam S-adenosil-metionina-sintetase, S-adenosil-L metionina descarboxilase (SAMDC) e espermidina sintetase, podem estar

relacionados com biossíntese de poliaminas. Hasegawa et al. (200) também associaram outros genes que codificam estas proteínas com a biossíntese de poliaminas. SAMDC foi considerada uma enzima chave durante o estresse abiótico no arroz (BASU et al., 2014). De acordo com Pillai e Akiyama (2004), SAMDC pode ser utilizado como um marcador molecular para a identificação de tolerância a baixa temperatura no arroz. A superexpressão de SAMDC leva à tolerância ao frio também em outras plantas, como por exemplo em plantas de tabaco (WI; KIM; PARK, 2006).

O sistema ubiquitinação/proteassomo é responsável pela remoção de peptídeos defeituosos e por agir como regulador celular de curta duração, controlando diversos processos. Desta forma, possibilita às células responderem rapidamente aos sinais intracelulares e às mudanças nas condições ambientais através de modificações em reguladores-chave (YATES; SADANANDOM, 2013). Lourenço et al. (2013) verificaram que o gene de arroz *OsHOS1*, que faz parte do sistema de ubiquitinação, está relacionado à modulação de outros genes, como *OsICE1*, em resposta a condição de baixa temperatura. Várias sequências relacionadas com a degradação de proteínas via ubiquitinação/proteassomo foram detectadas (Tabela 1), sugerindo que a alta atividade de degradação via ubiquitinação ocorre no genótipo sensível ao frio, provavelmente evidenciando o rápido *turnover* proteico que ocorre em decorrência do estresse causado pela baixa temperatura.

Yan et al. (2011) mostraram que a superexpressão de um gene que codifica uma proteína que contém um domínio F-box (*OsMAIF1*) leva à redução da tolerância ao estresse abiótico em plantas de arroz. Em outro estudo, a superexpressão do gene *OsKMD2*, também integrante da família de proteínas que contém domínio F-box, acarretou diminuição da atividade da citocinina, que é um hormônio que regula processos como divisão celular, metabolismo e respostas à fatores abióticos como frio e alta salinidade (KIM; KIEBER; SCHALLER, 2013). Em concordância com estes resultados, no nosso estudo foram detectadas diversas novas sequências da família F-box mais expressas no genótipo sensível, sugerindo que estas proteínas podem desempenhar papéis negativos na resposta ao estresse abiótico.

Plantas sob condições de frio e de outros estresses induzem a síntese de

deidrinas e LEAs, sendo que muitos estudos mostraram que esses genes estão relacionados à resposta ao estresse abiótico e à tolerância (HANIN et al., 2011; DUAN; CAI, 2012; WANG et al., 2014). As deidrinas podem atuar na estabilização de proteínas e estruturas de membranas (KOAG et al., 2003; LEE et al., 2005). A expressão do gene *OsDhn1*, pertencente à família das deidrinas, foi fortemente induzida por baixa temperatura em plantas de arroz, sendo que os resultados indicaram que *OsDhn1* é alvo da clássica via de sinalização CBF/DREB1 (LEE et al., 2005). Os mesmos pesquisadores deste estudo sugeriram que a característica de sensibilidade observada em algumas espécies vegetais, mesmo expressando deidrinas, é devido à ausência de outras vias de sinalização de frio e/ou de outros genes responsivos ao frio (LEE et al., 2005). Aqui, uma nova sequência que codifica deidrina é fornecido. Quanto às proteínas LEA, análises funcionais revelaram que algumas delas podem atuar na tolerância a múltiplos estresses abióticos. Os genes *OsLEA4* e *OsLEA5*, quando superexpressos em arroz, melhoram a tolerância à alta salinidade, ao estresse osmótico, à baixa temperatura, ao calor e à radiação UV (HE et al., 2012; HU et al., 2012).

De modo geral, analisando-se a literatura constatou-se que algumas sequências gênicas do nosso trabalho já foram caracterizadas por outros pesquisadores. Porém, diversas novas sequências com potencial biotecnológico de marcador molecular de tolerância ao frio em arroz da subespécie *indica* é fornecido, conforme pode ser visualizado na tabela 3.

Tabela 3 - Sequências com potencial biotecnológico de marcador molecular de tolerância ao frio em arroz da subespécie *indica*.

| Categoria funcional | Sequência gênica | Lócus | Ver legenda |
|-------------------------------------|------------------------------------|----------------|--------------------|
| Proteínas com funções desconhecidas | Expressed protein (<i>OsEXD</i>) | LOC_Os07g20164 | * |
| | Expressed protein | LOC_Os04g52750 | * |
| | Expressed protein | LOC_Os11g09710 | * |
| Crescimento e divisão celular | Phytosulfokine receptor precursor | LOC_Os02g06090 | * |
| | Cyclin (<i>OsCYC</i>) | LOC_Os01g59120 | * |

| | | | |
|---------------------------------|--|----------------|--|
| | Cyclin | LOC_Os06g51110 | * |
| | Cyclin-dependent kinase B2-1 (<i>OsCDKB2;1</i>) | LOC_Os08g40170 | ** Endo et al., 2012 |
| Relacionado à parede celular | WIP5 - Wound-induced protein precursor | LOC_Os11g37970 | * |
| | CSLA1 - cellulose synthase-like family A; mannan synthase | LOC_Os02g09930 | * |
| | CSLE1 - cellulose synthase-like family E (<i>OsCSLE1</i>) | LOC_Os09g30120 | ** Wang et al., 2010 |
| | CSLE6 - cellulose synthase-like family E | LOC_Os09g30130 | ** Wang et al., 2010 |
| | CSLF6 - cellulose synthase-like family F | LOC_Os08g06380 | ** Wang et al., 2010; Vega- Sánchez et al., 2012 |
| | CESA8 - cellulose synthase | LOC_Os07g10770 | ** Wang et al., 2010 |
| | CESA6 - cellulose synthase | LOC_Os07g14850 | ** Wang et al., 2010 |
| | CESA1 - cellulose synthase | LOC_Os05g08370 | ** Wang et al., 2010 |
| | Expansin precursor | LOC_Os10g40730 | * |
| | Os3bglu7 - beta-glucosidase, exo-beta- glucanase | LOC_Os03g49600 | * |
| | Periplasmic beta-glucosidase precursor | LOC_Os03g53800 | * |
| | Glycosylhydrolase | LOC_Os06g46284 | * |
| | COBRA | LOC_Os05g32110 | * |
| | Caffeoyl-CoA O-methyltransferase | LOC_Os08g38900 | * |
| Transporte | Aquaporin protein (<i>OsAQU</i>) | LOC_Os07g26690 | * |
| | Boron transporter protein | LOC_Os12g37840 | * |
| | Sulfate transporter | LOC_Os03g09940 | * |
| | Sodium/calcium exchanger protein | LOC_Os01g11414 | * |
| | Amino acid transporter | LOC_Os02g09810 | * |
| | Transmembrane amino acid transporter protein | LOC_Os02g01100 | * |
| | Oligopeptide transporter | LOC_Os08g38400 | * |
| | Potassium transporter | LOC_Os04g32920 | * |
| | Peptide transporter PTR2 | LOC_Os06g15370 | * |
| Citrate transporter protein | LOC_Os03g05390 | * | |
| Metabolismo lipídico | 3-ketoacyl-CoA synthase | LOC_Os05g49290 | * |
| | 3-ketoacyl-CoA synthase (<i>OsKET</i>) | LOC_Os11g37900 | * |
| | 3-ketoacyl-CoA thiolase | LOC_Os02g57260 | * |

| | | | |
|----------------------------------|---|----------------|--------------------|
| | Fatty acid desaturase | LOC_Os07g23410 | * |
| | Fatty acid hydroxylase | LOC_Os07g01150 | * |
| | WAX2 | LOC_Os09g25850 | * |
| | Peroxidase precursor | LOC_Os07g48020 | * |
| | Peroxidase precursor (<i>OsPRX</i>) | LOC_Os01g19020 | * |
| Detoxicação | <i>OsAPx1</i> - Cytosolic Ascorbate Peroxidase | LOC_Os03g17690 | * |
| | <i>OsAPx2</i> - Cytosolic Ascorbate Peroxidase | LOC_Os07g49400 | * |
| | Monodehydro ascorbate reductase | LOC_Os08g44340 | * |
| | Metallothionein | LOC_Os12g38270 | ** |
| | | | Kumar et al., 2012 |
| | Chaperone protein dnaJ | LOC_Os03g44620 | * |
| | Heat shock protein | LOC_Os09g30412 | * |
| Manutenção da estrutura proteica | Heat shock protein 101 | LOC_Os05g44340 | * |
| | Hsp20/alpha crystallin family protein | LOC_Os01g08860 | * |
| | Chaperone protein clpB 1 | LOC_Os03g31300 | * |
| | Early-responsive to dehydration protein-related | LOC_Os01g72210 | * |
| | | | |
| | F-box domain containing protein (<i>OsFBX221</i>) | LOC_Os07g09814 | * |
| | <i>OsFBX114</i> - F-box domain containing protein | LOC_Os04g02280 | * |
| | <i>OsFBX335</i> - F-box domain containing protein | LOC_Os09g32860 | * |
| Degradação proteica | <i>OsFBDUF53</i> - F-box and DUF domain containing protein | LOC_Os11g37300 | * |
| | Ubiquitin family protein | LOC_Os06g46770 | * |
| | <i>OsFBL22</i> - F-box domain and LRR containing protein | LOC_Os05g35110 | * |
| | <i>OsFBL7</i> - F-box domain and LRR containing protein | LOC_Os02g10700 | * |
| | Ubiquitin-conjugating enzyme | LOC_Os03g57790 | * |
| | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase domain containing protein | LOC_Os11g34270 | * |
| | Zinc finger/CCCH transcription factor | LOC_Os01g09620 | * |
| Transcription factor | Zinc finger A20 and AN1 domain-containing stress-associated protein | LOC_Os06g41010 | * |
| | Zinc finger, ZZ type domain containing protein | LOC_Os09g33740 | * |
| | LSD1 zinc finger domain containing protein | LOC_Os08g06280 | * |
| | | | |

| | | | |
|--|---|----------------|-----------------------------------|
| | <i>OsWRKY30</i> | LOC_Os08g38990 | * |
| | MYB family transcription factor | LOC_Os01g12860 | * |
| | bZIP transcription factor family protein | LOC_Os02g14910 | * |
| | E2F family transcription factor protein | LOC_Os02g50630 | * |
| | 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase protein | LOC_Os02g53180 | * |
| | Ethylene-insensitive protein | LOC_Os03g49400 | * |
| | Ethylene-responsive transcription factor | LOC_Os02g51670 | * |
| | <i>OsIAA13</i> - Auxin-responsive Aux/IAA gene family member (<i>OsAUX</i>) | LOC_Os03g53150 | * |
| Hormone signaling | <i>OsIAA31</i> - Auxin-responsive Aux/IAA gene family member | LOC_Os12g40900 | * |
| | Auxin efflux carrier component | LOC_Os09g38130 | * |
| | Auxin response factor | LOC_Os01g70270 | * |
| | Auxin-responsive protein | LOC_Os01g48850 | * |
| | Gibberellin 20 oxidase 1 | LOC_Os03g63970 | * |
| | <i>OsCML1</i> - Calmodulin-related calcium sensor protein | LOC_Os01g59530 | ** Chinpongpanich et al., 2012 |
| | Calcium/calmodulin-depedent protein kinase | LOC_Os05g26820 | * |
| Sinalização de Ca ²⁺ | IQ calmodulin-binding motif domain containing protein | LOC_Os05g03190 | * |
| | <i>OsCam1-1</i> – Calmodulin | LOC_Os03g20370 | ** Chinpongpanich et al., 2012 |
| | <i>OsCML7</i> - Calmodulin-related calcium sensor protein | LOC_Os08g02420 | ** Chinpongpanich et al., 2012 |
| Proteção de estruturas de membrana e/ou respostas gerais a estresses | Dehydrin(<i>OsDHM</i>) | LOC_Os11g26570 | * |
| | Late embryogenesis abundant group 1 | LOC_Os04g49980 | * |
| | Late embryogenesis abundant protein, group 3 (<i>OsLEA</i>) | LOC_Os01g50910 | * |
| | S-adenosyl-L-methionine decarboxylase leader peptide | LOC_Os02g39795 | * |
| Biossíntese de poliaminas | S-adenosylmethionine synthetase | LOC_Os01g18860 | * |
| | Spermidine synthase | LOC_Os06g33710 | * |

***Novas sequências identificadas.**

**** Sequências já caracterizadas pela literatura.**

5.4 Confirmação das sequências do RNAseq através de RT-qPCR

Para validar os resultados do RNAseq e confirmar a expressão diferencial dos genes identificados, *OsEXD* (expressed protein); *OsCYC* (cyclin); *OsCDKB2;1* (Cyclin-dependent kinase B2-1); *OsCSLE1* (cellulose synthase-like family E); *OsAQU* (aquaporin protein); *OsKET* (3-ketoacyl-CoA synthase); *OsPRX* (peroxidase precursor); *OsFBX221* (F-box domain containing protein); *OsAUX* (*OsIAA13* - Auxin-responsive Aux/IAA gene family member); *OsDHN* (dehydrin); *OsLEA* (late embryogenesis abundant protein, group 3), todos listados na Tabela 2, foram avaliados em ambos os genótipos, por RT-qPCR, utilizando-se o gene *OsUBQ5* (Ubiquitina 5) como controle. Como pode ser visto na Figura 8, foram confirmadas as diferenças nos níveis de expressão encontrados pela técnica de RNAseq para os onze genes testados.

A maioria dos genes testados (*OsCYC*, *OsCDKB2;1*, *OsCSLE1*, *OsAQU*, *OsKET*, *OsPRX* e *OsAUX*) mostraram maior expressão no genótipo tolerante ao frio após 7 dias de germinação a 13 °C. Destes, apenas um (*OsAQU*) é também expresso em nível mais elevado no genótipo tolerante ao frio em condições normais de crescimento (condição controle - 2 dias a 28 °C), o que pode estar representando um mecanismo de tolerância constitutivo, como sugerido anteriormente por Zhang et al. (2012). Dos onze genes testados, apenas quatro (*OsEXD*, *OsFBX221*, *OsDHN* e *OsLEA*) apresentaram maior nível de expressão no genótipo sensível ao frio após 7 dias de germinação a 13 °C, sendo que a expressão gênica de dois destes genes (*OsEXD* e *OsFBX221*) não foi detectada no genótipo tolerante ao frio, indicando ser exclusivo do genótipo sensível.

5.5 Comparação do acúmulo de prolina livre entre os genótipos tolerante e sensível ao frio

O acúmulo de prolina nas plantas pode aumentar mediante exposição das plantas à seca, alta salinidade, metais pesados e, inclusive, ao frio (ÁBRAHÁM et al., 2010). A concentração deste aminoácido varia entre as espécies vegetais e

depende do nível do estresse a que elas foram expostas (DELAUNEY; VERMA, 1993). A prolina pode exercer um importante papel de aclimatação na tolerância das plantas ao estresse devido à sua propriedade osmoprotetora. Os osmoprotetores agem no ajuste osmótico, na desintoxicação de espécies reativas de oxigênio e na estabilização da estrutura quaternária das proteínas (ÁBRAHÁM et al., 2010; KUMAR et al., 2013b). A determinação dos níveis de prolina tem sido apontada como um ensaio útil para monitorar o estado fisiológico e avaliar a tolerância ao estresse das plantas superiores (ÁBRAHÁM et al., 2010).

O envolvimento da prolina na tolerância ao frio em algumas linhagens de arroz foi verificado por diversos estudos. Zhang et al. (2011), superexpressaram o gene *OVP1* em arroz e as submeteram ao frio (4 °C), juntamente com plantas selvagens. A superexpressão deste gene propiciou uma maior tolerância ao frio nas plantas transgênicas devido a um maior acúmulo de prolina, que agiu na proteção das membranas celulares e diminuição do teor de malondialdeído (ZHANG et al., 2011). Em outro estudo com plantas de arroz, foi verificado que a superexpressão do gene *ZFP182*, que codifica uma proteína contendo um domínio dedo-de-zinco, promove o acúmulo de osmólitos, principalmente a prolina, evitando a desidratação celular causada pela pressão osmótica, mantendo, desta forma, a integridade das membranas (HUANG et al., 2012). Neste mesmo estudo, constatou-se que o gene *ZFP182* também está relacionado com a ativação de outros genes, principalmente *OsP5CS*, que codifica a pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS), enzima que limita a biossíntese de prolina em plantas (HUANG et al., 2012).

Com base na literatura descrita, foi realizada a comparação do acúmulo de prolina nos coleótilos das sementes dos genótipos tolerante e sensível ao frio, germinadas a 13 °C por 14 dias. Conforme apresentado na Figura 11, não houve diferença no acúmulo de prolina entre os genótipos contrastantes. Este resultado é um indicativo de que a característica de tolerância ao frio do genótipo IRGA 959-1-2-2F-4-1-4-A não está relacionado com o acúmulo de prolina, mas com outros mecanismos de resposta e proteção.

6 CONCLUSÃO

A comparação entre perfis transcricionais contrastantes (genótipos ou diferentes condições fisiológicas) pode ajudar na identificação dos genes responsáveis pela manifestação do fenótipo diferencial e revelar aspectos biológicos importantes. O presente estudo revelou que os níveis contrastantes de tolerância ao frio apresentados pelos dois genótipos de arroz da subespécie *indica* provavelmente podem estar relacionados com alterações moleculares e fisiológicas em resposta à condição de baixa temperatura. As sequências reveladas pelo RNAseq mostraram que vários genes são expressos diferencialmente entre os dois genótipos, mesmo sendo linhagens irmãs, e que alguns destes genes estão provavelmente envolvidos na tolerância ao estresse pelo frio durante a germinação.

O genótipo tolerante ao frio parece apresentar diversos processos mais ativos do que o genótipo sensível ao frio, tais como: taxas de divisão celular e crescimento, integridade e extensibilidade da parede celular, absorção de água e capacidade de transporte de membrana, síntese de sacarose, geração de açúcares simples, insaturação de ácidos graxos, biossíntese de cera, atividade antioxidante e sinalização mediada por hormônios e Ca^{+2} , levando à aclimação e tolerância ao frio. Por outro lado, o genótipo sensível ao frio responde à baixa temperatura aumentando a síntese de proteínas de choque térmico (HSPs) e deidrinhas, juntamente com uma maior taxa de degradação proteica via ubiquitinação/proteassomo e biossíntese de poliaminas.

Sabe-se que os níveis de expressão dos mRNAs podem ser diferentes dos níveis proteicos. Porém, eles fornecem pontos de partida para outras análises mais

aprofundadas. Desta forma, nossos resultados revelaram genes importantes para o processo de germinação sob condições de estresse por baixa temperatura, que podem ser úteis em futuras abordagens biotecnológicas visando a tolerância ao frio em arroz.

7 CONTINUIDADE DO TRABALHO

Os genes identificados neste trabalho permitiram a obtenção de informações importantes sobre os processos de aclimação e tolerância ao frio no arroz durante a fase de germinação. Entre as perspectivas que podemos citar como continuidade deste trabalho estão:

- Inativação dos genes *OsFBX221* (envolvido em degradação proteica), além da utilização de mutantes, para confirmar o papel deste gene na sensibilidade ao frio das plantas do genótipo IRGA 959-1-2-2F-4-1-4-D-1-CA-1.

- Modulação de genes relacionados com o metabolismo lipídico, síntese de celulose e síntese de ciclinas no genótipo sensível ao frio para atestar que a insaturação de ácidos graxos de membrana, reforço da parede celular e divisão e extensibilidade celular auxiliam na tolerância a baixa temperatura.

- Caracterização dos fatores de transcrição e proteínas desconhecidas encontradas nas análises do sequenciamento em grande escala.

- Detecção e caracterização de proteínas que são ativadas em resposta à mudança de temperatura e realização de comparações quantitativas entre os genótipos de arroz contrastantes através da técnica de MudPIT (*Multidimensional Protein Identification Technology*).

REFERÊNCIAS

ABBASI, F.; ONODERA, H.; TOKI, S.; TANAKA, H.; KOMATSU, S. *OsCDPK13*, a calcium-dependent protein kinase gene from rice, is induced by cold and gibberellin in rice leaf sheath. **Plant Mol Biol**, v. 55, p. 541-552, 2004.

ÁBRAHÁM, E.; HOURTON-CABASSA, C.; ERDEI, L.; SZABADOS, L. Methods for Determination of Proline in Plants. **Plant Stress Tolerance**, v. 639, p. 317-331, 2010.

ABUGAMAR, S.; AJEB, S.; SHAM, A.; ENAN, M. R.; IRATNI, R. A mutation in the expansin-like A2 gene enhances resistance to necrotrophic fungi and hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. **Mol Plant Pathol**, v. 14, p. 813-827, 2013.

ADAMSKI, J. M.; CARGNELUTTI, D.; SPEROTTO, R. A.; TERRA, T. F.; SOROKA, V. D.; ROSA, L. M. G. et al. Identification and physiological characterization of two sister lines of indica rice (*Oryza sativa* L.) with contrasting levels of cold tolerance. **Submetido para Rice**.

AGHAEE, A.; MORADI, F.; ZARE-MAIVAN, H.; ZARINKAMAR, F.; IRANDOOST, H. P.; SHARIFI, P. Physiological responses of two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes to chilling stress at seedling stage. **Afr J Biotechnol**, v. 10, p. 7617–7621, 2011.

AGEITEC. Agência **Embrapa de Informação Tecnológica**. 2013. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 08 ago. 2013.

AHAMED, A.; MURAI-HATANO, M.; ISHIKAWA-SAKURAI, J.; HAYASHI, H.; KAWAMURA, Y.; UEMURA, M. Cold stress-induced acclimation in rice is mediated by root-specific aquaporins. **Plant Cell Physiol**, v. 53, p. 1445-1456, 2012.

AMID, A.; LYTOVCHENKO, A.; FERNIE, A. R.; WARREN, G.; THORBY, G. J. The sensitive to freezing mutation of *Arabidopsis thaliana* is a cold-sensitive allele of homomeric acetyl-CoA carboxylase that results in cold-induced cuticle deficiencies. **J Exp Bot**, v. 63, n. 14, p. 5289-5299, 2012.

ANDAYA, V. C.; MACKILL, D. J. Mapping of QTLs associated with cold tolerance during the vegetative stage in rice. **J Exp Bot**, v. 54, p. 2579–2585, 2003.

ASHRAF, M.; ATHAR, H. R.; HARRIS, P. J. C.; KWON, T. R. Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. **Adv Agron**, v. 97, p. 45-110, 2008.

BAKER, S. S.; WILHELM, K. S.; THOMASHOW, M. F. The 5'-region of *Arabidopsis thaliana* cor15a has cis-acting elements that confer cold, drought and ABA-regulated gene expression. **Plant Mol Biol**, v. 24, p. 701-713, 1994.

BASU, S.; ROYCHOUDHURY, A.; SENGUPTA, D. Deciphering the Role of various cis-acting regulatory elements in controlling SamDC gene expression in Rice. **Plant Signal Behav**, v. 9, e28391, 2014.

BATES, L. S.; WALDRAN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water studies. **Plant Soil**, v. 39, p. 205-208, 1973.

BATISTA, B. L.; SOUZA, J. M. O.; SOUZA, S. S. de; BARBOSA, F. Speciation of arsenic in rice and estimation of daily intake of different arsenic species by Brazilians through rice consumption. **J Hazard Mater**, v. 191, p. 342–348, 2011.

BETHKE, P. C.; SCHUURINK, R.; JONES, R. L. Hormonal signaling in cereal aleurone. **J Exp Bot**, v. 48, p. 1337–1356, 1997.

BEWLEY, J. D. Seed germination and dormancy. **Plant Cell**, v. 9, p. 1055–1066, 1997.

BONNECARRÈRE, V.; BORSANI, O.; DÍAZ, P.; CAPDEVIELLE, F.; BLANCO, P.; MONZA, J. Response to photooxidative stress induced by cold in *japonica* rice is genotype dependent. **Plant Sci**, v. 180, p. 726-732, 2011.

BRASIL. Lei n. 10.711 de 5 de agosto de 2003. Dispõe sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudanças e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/2003/l10.711.htm>. Acesso em: 6 nov. 2013.

CHAUHAN, H.; KHURANA, N.; AGARWAL, P.; KHURANA, P. Heat shock factors in rice (*Oryza sativa* L.): genome-wide expression analysis during reproductive development and abiotic stress. **Mol Genet Genomics**, v. 286, p. 171-187, 2011.

CHEN, N. A.; XU, Y.; WANG, X.; DU, C.; DU, J.; YUAN, M. et al. OsRAN2, essential for mitosis, enhances cold tolerance in rice by promoting export of intranuclear tubulin and maintaining cell division under cold stress. **Plant Cell Environ**, v. 34, p. 52–64, 2011.

CHEON, J.; FUJIOKA, S.; DILKES, B. P.; CHOE, S. Brassinosteroids regulate plant growth through distinct signaling pathways in *Selaginella* and *Arabidopsis*. **Plos One**, v. 8, n. 12, p. e81938/1-9, 2013.

CHINPONGPANICH, A.; LIMRUENGROJ, K.; PHEAN-O-PAS, S.; LIMPASENI, T.; BUABOOCHA, T. Expression analysis of calmodulin and calmodulin-like genes from rice, *Oryza sativa* L. **BMC Res Notes**, v. 5, n. 625, 2012.

CLOONAN, N.; FORREST, A. R. R.; KOLLE, G.; GARDINER, B. B. A.; FAULKNER, G. J.; BROWN, M. et al. Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing. **Nature Methods**, v. 5, p. 613–619, 2008.

COBBETT, C. S.; GOLSBROUGH, P. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. **Ann Rev Plant Physiol Mol Biol**, v. 53, p. 159–182, 2002.

COLEBROOK, E. H.; THOMAS, S. G.; PHILIPS, A. L.; HEDDEN, P. The role of gibberellin signaling in plant responses to abiotic stress. **J Exp Bot**, v. 217, p. 67-75, 2014.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. 2013. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 03 out. 2013.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. 2014. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 07 ago. 2014.

CRUZ, R. P.; MILACH, S. C. K. Melhoramento genético para tolerância ao frio em arroz irrigado. **Ciência Rural**, v.30, n. 5, p. 909-917, 2000.

CRUZ, R. P. da; MILACH, S. C. K. Cold tolerance at the germination stage of rice: methods of evaluation and characterization of genotypes. **Sci Agric**, v. 61, n. 1, p. 1-8, 2004.

CRUZ, R. P. da; SPEROTTO, R. A.; CARGNELUTTI, D.; ADAMSKI, J. M.; TERRA, T. de F.; FETT, J. P. Avoiding damage and achieving cold tolerance in rice plants. **Food Energy Secur**, v. 2, n. 2, p. 96-119, 2013.

CRUZ-JARAMILLO, J. L.; RUIZ-MEDRANO, R.; ROJAS-MORALES, L.; LÓPEZ-BUENFIL, J. A.; MORALE-GALVÁN, O.; CHAVARÍN-PALACIO, C. et al. Characterization of a proposed dichorhavirus associated with the citrus leprosis disease and analysis of the host response. **Viruses**, v. 6, p. 2602-2622, 2014.

CUSHMAN, J. C.; BOHNERT, H. J. Genomic approaches to plant stress tolerance. **Plant Biol**, v. 3, p. 117-124, 2000.

DAI, K.; VERGARA, B. S.; VISPERAS, R. M. Amelioration of cold injury in rice (*Oryza sativa* L.): improving root oxidizing activity by plant growth regulators. **Philipp J Crop Sci**, v. 15, p. 49–54, 1990.

DALAN, M. R.; DEETER, A.; NIMISHAKAVI, G.; DUAN, Z. H. (2012) Fold change and p-value cutoffs significantly alter microarray interpretations. **BMC Bioinformatics**, v. 13, (Suppl. 2):S11, 2012.

DELAUNEY, A. J.; VERMA, D. P. S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. **Plant J**, v. 4, p. 215–223, 1993.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant DNA minipreparation: version II. **Plant Mol Biol Reporter**, v. 1, p. 19-21, 1983.

DIAZ, J. P.; WU, T. M.; DIAZ, R. P.; LARA, S. R.; HONG, C. Y.; CASARETTO, J. A. Organ and stress-specific expression of the ASR genes in rice. **Plant Cell Rep**, 2013.

DIAZ-VIVANCOS, P.; BARBA-ESPÍN, G.; HERNÁNDEZ, J. A. Elucidating hormonal/ROS networks during seed germination: insights and perspectives. **Plant Cell Rep**, v. 10, p. 1491-502, 2013.

DO, H.; KIM, I. S.; SHIN, S. Y.; KIM, J. J.; MOK, J. E.; PARK, H. et al. Purification, characterization and preliminary X-ray crystallographic studies of monodehydroascorbate reductase from *Oryza sativa* L. *japonica*. **Acta Crystallogr F Struct Biol Commun**, v. 1, n. 70, p. 1244-1248, 2014.

DUAN, J.; CAI, W. *OsLEA3-2*, an abiotic stress induced gene of rice plays a key role in salt and drought tolerance. **PLoS ONE**, v. 7, e45117, 2012.

EPAND, R.M.; SHAI, Y.; SEGREST, J.P.; ANANTHARAMAIAH, G. M. Mechanisms for the modulation of membrane bilayer properties by amphipathic helical peptides. **Biopolymers**, v. 37, p. 319-338, 1995.

ENDO, M.; NAKAYAMA, S.; UMEDA-HARA, C.; OHTSUKI, N.; SAIKA, H.; UMEDA, M. et al. CDKB2 is involved in mitosis and DNA damage response in rice. **Plant J**, v. 69, p. 967-977, 2012.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em: 16 set. 2013.

FOOTITT, S.; DOUTERELO-SOLER, I.; CLAY, H.; FINCH-SAVAGE, W. Dormancy cycling in Arabidopsis seeds is controlled by seasonally distinct hormone signaling pathways. **Proc Natl Acad Sci**, v. 108, p. 20236–20241, 2011.

FUGINO, K.; SEKIGUCHI, H.; SATO, T.; KIUCHI, H.; NONOUE, Y.; TAKEUCHI, Y. et al. Mapping of quantitative trait loci controlling low-temperature germinability in rice. **Theor Appl Genet**, v. 108, p. 794-799, 2004.

GAO, J. P.; CHAO, D. Y.; LIN, H. X. Toward understanding molecular mechanisms of abiotic stress responses in rice. **Rice**, v. 1, p. 36–51, 2008.

GAUTAM, N.; VERMA, P. K.; VERMA, S.; TRIPATHI, R. D.; TRIVEDI, P. K.; ADHIKARI, B. et al. Genome-wide identification of rice class I metallothionein gene: tissue expression patterns and induction in response to heavy metal stress. **Funct Integr Genomics**, v. 12, n. 4, p. 635-647, 2012.

- GIBSON, S.; ARONDEL, V.; IBA, K.; SOMERVILLE, C. Cloning of a temperature-regulated gene encoding a chloroplast Omega-3 desaturase from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol**, v. 106, p. 1615–1621, 1994.
- GLASZMANN, J. C.; KAW, R. N.; KHUSH, G. S. Genetic divergence among cold tolerant rices (*Oryza sativa* L.). **Euphytica**, v. 45, p. 95-104, 1990.
- GONZALEZ, R. M.; IUSEM, N. D. Twenty years of research on *Asr* (ABA-stress-ripening) genes and proteins. **Planta**, v. 239, p. 941–949, 2014.
- GOTHANDAM, K. M.; NALINI, E.; KARTHIKEYAN, S.; SHIN, J. S. *OsPRP3*, a flower specific proline-rich protein of rice, determines extracellular matrix structure of floral organs and its overexpression confers cold-tolerance. **Plant Mol Biol**, v. 72, p. 125-135, 2010.
- GUO, W. J.; HO, T. H. D. An abscisic acid-induced protein, HVA22, inhibits gibberellin-mediated programmed cell death in cereal aleurone cells. **Plant Physiol**, v. 147, p. 1710-1722, 2008.
- GUO, Z.; OU, W.; LU, S.; ZHONG, Q. Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. **Plant Physiol Bioch**, v. 44, p. 828–836, 2006.
- GUY, C.; HASKELL, D.; LI, Q. B. Association of proteins with the stress 70 molecular chaperones at low temperature evidence for the existence of cold labile proteins in spinach. **Cryobiology**, v. 36, p. 301–314, 1998.
- HANIN, M.; BRINI, F.; EBEL, C.; TODA, Y.; TAKEDA, S. MASMOUDI, K. Plant dehydrins and stress tolerance: versatile proteins for complex mechanisms. **Plant Signal Behav**, v. 6, p. 1503-1509, 2011.
- HANNAH, M. A.; HEYER, A. G.; HINCHA, D. K. A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol**, v. 137, n. 2, p. 179-196, 2005.
- HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A.; ZHU, J. K.; BOHNERT, H. J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, v. 51, p. 463-499, 2000.
- HATMANN, J.; STÜHRWOHLDT, N.; DAHLKE, R. I.; SAUTER, M. Phytosulfokine control of growth occurs in the epidermis, is likely to be non-cell autonomous and is dependent on brassinosteroids. **Plant J**, v. 73, p. 579-590, 2013.
- HE, D.; HAN, C.; YAO, J.; SHEN, S.; YANG, P. Constructing the metabolic and regulatory pathways in germinating rice seeds through proteomic approach. **Proteomics**, v. 11, p. 2693–2713, 2011.
- HE, D.; YANG, P. Proteomics of Rice seed germination. **Front Plant Sci**, v. 4, 246, 2013.

HE, S.; TAN, L.; HU, Z.; CHEN, G.; WANG, G.; HU, T. Molecular characterization and functional analysis by heterologous expression in *E. coli* under diverse abiotic stresses for *OsLEA5*, the atypical hydrophobic LEA protein from *Oryza sativa* L. **Mol Genet Genomics**, v. 287, n. 1, p. 39-54, 2012.

HOWELL, K. A.; CHENG, K.; MURCHA, M. W.; JENKIN, L. E.; MILLAR, A. H.; WHELAN, J. Oxygen initiation of respiration and mitochondrial biogenesis in rice. **J Biol Chem**, v. 282, p. 15619–15631, 2007.

HOWELL, K. A.; NARSAI, R.; CARROLL, A.; IVANOVA, A.; LOHSE, M.; USADEL, B. et al. Mapping metabolic and transcript temporal witches during germination in rice high- lights specific transcription factors and the role of RNA instability in the germination process. **Plant Physiol**, v. 149, p. 961–980, 2009.

HU, H.; YOU, J.; FANG, Y.; ZHU, X.; QI, Z.; XIONG, L. Characterization of transcription factor gene *SNAC2* conferring cold and salt tolerance in rice. **Plant Mol Biol**, v. 67, p. 169–181, 2008.

HU, T.; ZENG, H.; HE, S.; WU, Y.; WANG, G.; HUANG, X. Molecular analysis of *OsLEA4* and its contributions to improve *E. coli* viability. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 166, n. 1, p. 222-233, 2012.

HUANG, J.; SUN, S. J.; XU, D. Q.; YANG, X.; BAO, Y. M.; WANG, Z. F. et al. Increased tolerance of rice to cold, drought and oxidative stresses mediated by the overexpression of a gene that encodes the zinc finger protein ZFP245. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 389, p. 556–561, 2009.

HUANG, J.; SUN, S.; XU, D.; LAN, H.; SUN, H.; WANG, Z. et al. A TFIIIA-type zinc finger protein confers multiple abiotic stress tolerances in transgenic rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Mol Biol**, v. 80, p. 337–350, 2012.

HUDA, K. M. K.; BANU, S. A.; YADAV, S.; SAHOO, R. K.; TUTEJA, R.; TUTEJA, N. Salinity and drought tolerant *OsACA6* enhances cold tolerance in transgenic tobacco by interacting with stress-inducible proteins. **Plant Physiol Biochem**, v. 82, p. 229-238, 2014.

HUNDERTMARK, M.; BUITINK, J.; LEPRINCE, O.; HINCHA, D. K. Reduction of seed-specific dehydrins reduces seed longevity in *Arabidopsis thaliana*. **Seed Sci Res**, v. 21, p. 165–173, 2011.

IBA, K. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. **Annu Rev Plant Biol**, v. 53, p. 225-245, 2002.

IRRI. **International Rice Research Institute**. 2013. Disponível em: < <http://beta.irri.org/>>. Acesso em: 18 set. 2013.

ISLAM, M. A.; DU, H.; NING, J.; YE, H. Y.; XIONG, L. Z. Characterization of *Glossy1*-homologous genes in rice involved in leaf wax accumulation and drought resistance. *Plant Mol Biol*, v. 70, p. 443-456, 2009.

ITO, N.; HAYASE, H.; SATAKE, T.; NISHIYAMA, I. Male sterility caused by cooling treatment at the meiotic stage in rice plants. III. Male abnormalities at anthesis. **Proc Crop Sci Soc Japan**, v. 39, n. 1, p. 60-70, 1970.

ITO, Y.; KATSURA, K.; MARUYAMA, K.; TAJI, T.; KOBAYASHI, M.; SEKI, M. et al. Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. **Plant Cell Physiol**, v. 47, p. 141–153, 2006.

JAIN, M.; KHURANA, J. P. Transcript profiling reveals diverse roles of auxin-responsive genes during reproductive development and abiotic stress in rice. **FEBS J**, v. 276, p. 3148–3162, 2009.

JI, S. L.; JIANG, L.; WANG, Y. H.; ZHANG, W. W.; LIU, X.; LIU, S. J.; CHEN, L. M.; ZHAI, H. Q.; WAN, J. M. Quantitative trait loci mapping and stability for low temperature germination ability of rice. **Plant Breeding**, v. 128, p. 387-392, 2009.

JIANG, L.; LIU, S. J.; HOU, M. Y.; TANG, J. Y.; CHEN, L. M.; ZHAI, H. Q.; WAN, J. M. Analysis of QTLs for seed low temperature germinability and anoxia germinability in rice (*Oryza sativa* L.). **Field Crops Res**, v. 98, p. 68-75, 2006.

JIN, S.; CHENG, Y.; GUAN, Q.; LIU, D.; TAKANO, T.; LIU, S. A metallothionein-like protein of rice (rgMT) functions in *E. coli* and its gene expression is induced by abiotic stresses. **Biotechnol Lett**, v. 28, n. 21, p. 1749-1753, 2006.

KARGIOTIDOU, A.; DELI, D.; GALANOPOLOU, D.; TSAFTARIS, A.; FARMAKI, T. Low temperature and light regulate delta 12 fatty acid desaturases (FAD2) at a transcriptional level in cotton (*Gossypium hirsutum*). **J Exp Bot**, v. 59, p. 2043-2056, 2008.

KAWAKAMI, A.; SATO, Y.; YOSHIDA, M. Genetic engineering of rice capable of synthesizing fructans and enhancing chilling tolerance. **J Exp Bot**, v. 59, n. 4, p. 793–802, 2008.

KOAG, M. C.; FENTON, R. D.; WILKENS, S.; CLOSE, T. J. The binding of maize DHN1 to lipid vesicles. Gain of structure and lipid specificity. **Plant Physiol.**, v. 131, p. 309–316, 2003.

KOMATSU, S.; YANG, G.; KHAN, M.; ONODERA, H.; TOKI, S.; YAMAGUCHI, M. Over-expression of calcium-dependent protein kinase 13 and calreticulin interacting protein 1 confers cold tolerance on rice plants. **Mol Genet Genomics**, v. 277, p. 713-723, 2007.

KONRAD, Z.; BAR-ZVI, D. Synergism between the chaperone-like activity of the stress regulated ASR1 protein and the osmolyte glycine-betaine. **Planta**, v. 227, p. 1213-1219, 2008.

KOTAKA, S.; ABE, N. The varietal difference of germinability at low-temperature in rice varieties and the testing method for the percentage establishment of seedlings. **J Agr Sci**, Tokyo, v. 43, p. 165-168, 1988.

KOTAKE, T.; AOYAMA, T.; HIRANO, K.; SATO, A.; KANEKO, Y.; TSUMURAYA, Y. et al. Rice *Brittle culm 6* encodes a dominant-negative form of CesA protein that perturbs cellulose synthesis in secondary cell walls. **J Exp Bot**, v. 62, n. 6, p. 2053–2062, 2011.

KOVACS, D.; KALMAR, E.; TOROK, Z.; TOMPA, P. Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two disordered stress-related plant proteins. **Plant Physiol**, v. 147, p. 381-390, 2008.

KIM, H. J.; KIEBER, J. J.; SCHALLER, E. The rice F-box protein KISS ME DEADLY2 functions as a negative regulator of cytokinin signalling. **Signal Behav**, v.8, n.12, e26434, 2013.

KIM, S. I.; ANDAYA, V. C.; TAI, T. H. Cold sensitivity in rice (*Oryza sativa* L.) is strongly correlated with a naturally occurring I99V mutation in the multifunctional glutathione transferase isoenzyme GSTZ2. **Biophys J**, v. 435, p. 373-380, 2011.

KIM, S. Y.; NAM, K.H. Physiological roles of *ERD10* in abiotic stresses and seed germination of Arabidopsis. *Plant Cell Rep*, v. 29, p. 203-209, 2010.

KUBO, T.; EGUCHI, M.; YOSHIMURA, A. A new gene for F1 pollen sterility in *japonica/indica* cross of rice. **Rice Genet Newsl**, v.17, p.63-64, 2000.

KUMAR, G.; KUSHWAHA, H. R.; PANJABI-SABHARWAL, V.; KUMARI, S.; JOSHI, R.; KARAN, R. et al. Clustered metallothionein genes are co-regulated in rice and ectopic expression of *OsMT1e-P* confers multiple abiotic stress tolerance in tobacco via ROS scavenging. **BMC Plant Biol**, v. 12, n. 107, 2012.

KUMAR, S.; ASIF, M. H.; CHAKRABARTY, D.; TRIPATHI, R. D.; DUBEY, R. S.; TRIVEDI, P.K. Expression of a rice Lambda class of glutathione S-transferase, *OsGSTL2*, in Arabidopsis provides tolerance to heavy metal and other abiotic stresses. **J Hazard Mater**, 248-249: 228-237, 2013a.

KUMAR, K.; KUMAR, M.; KIM, S. R.; RYU, H.; CHO, Y. G. Insights into genomics of salt stress response in rice. **Rice**, v. 6, n. 27, 2013b.

KUWAGATA, T.; ISHIKAWA-SAKURAI, J.; HAYASHI, H.; NAGASUGA, K.; FUKUSHI, K.; AHAMED, A. et al. Influence of low air humidity and low root temperature on water uptake, growth and aquaporin expression in rice plants. **Plant Cell Physiol**, v. 53, n. 8, p. 1418–1431, 2012.

LA, H.; LI, J.; JI, Z.; CHENG, Y.; LI, X.; JIANG, S.; VENKATESH, P. N.; RAMACHANDRAN, S. Genome-wide analysis of cyclin family in rice (*Oryza sativa* L.). **Mol Genet Genomics**, v. 275, p. 374-386, 2006.

LEE, S. C.; LEE, M. Y.; KIM, S. J.; JUN, S. H.; AN, G.; KIM, S. R. Characterization of an abiotic stress-inducible dehydrin gene, *OsDhn1*, in rice (*Oryza sativa* L.). **Mol Cells**, v. 19, n. 2, p. 212-218, 2005.

LI, Y.; QIAN, Q.; ZHOU, Y.; PANG, X.; LI, J. BRITTLE CULM1, which encodes a COBRA-like protein, affects the mechanical properties of rice plants. **Plant Cell**, v. 15, p. 2020–2031, 2003.

LI, X.; CHEN, W.; ZHAO, Y.; XIANG, Y.; JIANG, H.; ZHU, S. et al. Downregulation of caffeoyl-CoA O-methyltransferase (CCoAOMT) by RNA interference leads to reduced lignin production in maize straw. **Genet Mol Biol**, v. 36, p. 540-546, 2013.

LIU, C. W.; HSU, Y. K.; CHENG, Y. H.; YEN, H. C.; WU, Y. P.; WANG, C. S. et al. Proteomic analysis of salt-responsive ubiquitin-related proteins in rice roots. **Rapid Commun Mass Sp**, v. 26, p. 1649-1660, 2012.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and $2^{-\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LIU, K.; WANG, L.; XU, Y.; CHEN, N.; MA, Q.; LI, F. et al. Overexpression of *OsCOIN*, a putative cold inducible zinc finger protein, increased tolerance to chilling, salt and drought, and enhanced proline level in rice. **Planta**, v. 226, p. 1007–1016, 2007.

LOPES, S. I.G.; CARMONA, P. S.; LOPES, M. C. B.; CRUZ, R. P.; FUNCK, G. R. D.; ROSSO, A. F. et al. Contribuição das cultivares lançadas pelo IRGA para a lavoura orizícola do Rio Grande do Sul. **Boletim Técnico**, n. 6, 2008.

LOURENÇO, T.; SAPETA, H.; FIGUEIREDO, D. D.; RODRIGUES, M. Isolation and characterization of rice (*Oryza sativa* L.) E3-ubiquitin ligase *OsHOS1* gene in the modulation of cold stress response. **Plant Mol Biol**, v. 83, p. 351–363, 2013.

LU, G.; WU, F. Q.; WU, W.; WANG, H. J.; ZHENG, X. M.; CHEN, X. et al. Rice LTG1 is involved in adaptive growth and fitness under low ambient temperature. **Plant J**, v. 78, n. 3., p. 468-480, 2014.

MA, Q.; DAI, X.; XU, Y.; GUO, J.; LIU, Y.; CHEN, N. et al. Enhanced tolerance to chilling stress in *OsMYB3R-2* transgenic rice is mediated by alteration in cell cycle and ectopic expression of stress genes. **Plant Physiol**, v. 150, p. 244–256, 2009.

MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: an overview. **Arch Biochem Biophys**, v. 444, p. 139-158, 2005.

MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. Testing significance relative to a fold-change threshold is a TREAT. **Bioinformatics**, v. 25, p. 765-771, 2009.

MACKILL, D. J.; COFFMAN, W. R.; GARRITY, D. P. Garrity. **Rainfed lowland rice improvement**. Manila: International. RiceResearch Institute, 1996. 242 p.

MACKILL, D.; LEI, X. Genetic variation for traits related to temperate adaptation of rice cultivars. **Crop Sci**, v. 37, p. 1340–1346, 1997.

MAGNESCHI, L.; PERATA, P. Rice germination and seedling growth in the absence of oxygen. **Ann Bot-London**, v. 103, p. 181–196, 2009.

MATSUMOTO, T.; LIAN, H. L.; SU, W. A.; TANAKA, D.; LIU, C. W.; IWASAKI, I. et al. Role of the aquaporin PIP1 subfamily in the chilling tolerance of rice. **Plant Cell Physiol**, v. 50, p. 216-229, 2009.

MAUREL, C.; JAVOT, H.; LAUVERGEAT, V.; GERBEAU, P.; TOURNAIRE, C.; SANTONI, V. et al. Molecular physiology of aquaporins in plants. **Int Rev Cytol**, v. 215, p. 105–148, 2002.

MEULLENET, J. F.; GRIFFIN, V. K.; CARSON, K.; DAVIS, G.; DAVIS, S.; GROSS, J. et al. Rice external preference mapping for Asian consumers living in the United States. **J Sens Stud**, v. 16, p. 73–94, 2007.

MIURA, K.; LIN, Y.; YANO, M.; NAGAMINE, T. Mapping quantitative trait loci controlling seed longevity in rice (*Oryza sativa* L.). **Theor Appl Genet**, v. 104, p. 981–986, 2002.

MORIN, R.; BAINBRIDGE, M.; FEJES, A.; HIRST, M.; KRZYWINSKI, M.; PUGH, T. et al. Profiling the HeLa S3 transcriptome using randomly primed cDNA and massively parallel short-read sequencing. **Biotechniques**, v. 45, p. 81–94, 2008.

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

NAKASHIMA, K.; ITO, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses, **Plant Physiol**, v. 149, n. 1, p. 88-95, 2009.

NAKASHIMA, K.; TAKASAKI, H.; MIZOI, J.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. **Biochim Biophys Acta**, v. 1819, p. 97–103, 2012.

NURUZZAMAN, M.; MANIMEKALAI, R.; SHARONI, A. M.; SATOH, K.; KONDOH, H.; OOKA, H. et al. Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. **Gene**, v. 465, p. 30–44, 2010.

OHNISHI, T.; SUGAHARA, S.; YAMADA, T.; KIKUCHI, K.; YOSHIBA, Y.; HIRANO, H. Y. *OsNAC6*, a member of the NAC gene family, is induced by various stresses in rice. **Genes Genet Syst**, v. 80, p. 135–139, 2005.

OLSEN, A. N.; ERNST, H. A.; LEGGIO, L. L.; SKRIVER, K. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. **Plant Sci**, v. 10, n. 2, 2005.

PANDEY, B.; SHARMA, P.; PANDEY, D. M.; SHARMA, I.; CHATRATH, R. Identification of new aquaporin genes and single nucleotide polymorphism in bread wheat. **Evol Bioinform**, v. 9, p. 437–452, 2013.

PILLAI, M. A.; AKIYAMA, T. Differential expression of an S-adenosyl-L-methioninedecarboxylase gene involved in polyamine biosynthesis under lowtemperature stress in *japonica* and *indica* rice genotypes. **Mol Genet Genomics**, v. 271, p. 141-149, 2004.

PLETT, D.; SAFWAT, G.; GILLIHAM, M.; SKRUMSAGERMOLLER, I.; ROY, S.; SHIRLEY, N. et al. Improved salinity tolerance of rice through cell type-specific expression of *AtHKT1;1*. **Plos One**, v. 5, e12571, 2010.

QI, P.; LIN, Y. S.; SONG, X. J.; SHEN, J. B.; HUANG, W.; SHAN, J. X. et al. The novel quantitative trait locus *GL3.1* controls rice grain size and yield by regulating *Cyclin-T1;3*. **Cell Res**, v. 22, p. 1666-1680, 2012.

RABBANI, M.; MARUYAMA, K.; ABE, H.; KHAN, M.; KATSURA, K.; ITO, Y. et al. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. **Plant Physiol**, v. 133, p. 1755-1767, 2003.

RAHMAN, A. Auxin: a regulator of cold stress response. **Physiol Plant**, v. 147, p. 28-35, 2013.

RAYMOND, P.; AL-ANI, A.; PRADET, A. ATP production by respiration and fermentation, and energy-charge during aerobiosis and anaerobiosis in 12 fatty and starchy germinating seeds. **Plant Physiol**, v. 79, p. 879–884, 1985.

SAAD, B. R.; FABRE, D.; MIEULET, D.; MEYNARD, D.; DINGKUHN, M.; AL-DOSS, A. et al. Expression of the *Aeluropus littoralis* AISAP gene in rice confers broad tolerance to abiotic stresses through maintenance of photosynthesis. **Plant Cell Environ**, v. 35, p. 626–643, 2012.

SAMPEDRO, J.; COSGROVE, D. J. The expansin superfamily. **Genome Biol**, v. 6, n. 242, 2005.

SANGHERA, G. S.; WANI, S. H.; HUSSAIN, W.; SINGH, N. B. Engineering cold stress tolerance in crop plants. **Curr Genomics**, v.12, p. 30–43, 2011.

SATO, Y.; MASUTA, Y.; SAITO, K.; MURAYAMA, S.; OZAWA, K. Enhanced chilling tolerance at the booting stage in rice by transgenic overexpression of the ascorbate peroxidase gene, *OsAPXa*. **Plant Cell Rep**, v. 30, p. 399-406, 2011.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nat Protoc**, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.

SHEN, Q.; CHEN, C. N.; BRANDS, A.; PAN, S. M.; HO, T. H. D. The stress- and abscisic acid-induced barley gene *HVA22*: developmental regulation and homologues in diverse organisms. **Plant Mol Biol**, v. 45, p. 327-340, 2001.

SHI, J.; FU, X. Z.; PENG, T.; HUANG, X.S.; FAN, Q. J.; LIU, J.H. Spermine pretreatment confers dehydration tolerance of citrus in vitro plants via modulation of antioxidative capacity and stomatal response. **Tree Physiol**, v. 30, p. 914-922, 2010.

SHINADA, H.; IWATA, N.; SATO, T.; FUGINO, K. Genetical and morphological characterization of cold tolerance at fertilization stage in rice. **Breeding Sci**, v. 63, p. 197-204, 2013.

SHINGAKI-WELLS, R. N.; HUANG, S.; TAYLOR, N. L.; CARROLL, A. J.; ZHOU, W. X.; MILLAR, A. H. Differential molecular responses of rice and wheat coleoptiles to anoxia reveal novel metabolic adaptations in amino acid metabolism for tissue tolerance. **Plant Physiol**, v. 156, p. 1706–1724, 2011.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **J Exp Bot**, v. 58, p. 221-227, 2007.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SEKI, M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. **Curr Opin Plant Biol**, v. 6, p. 410-417, 2003.

SHUKLA, N.; AWASTHI, R. P.; RAWAT, L.; KUMAR, J. Biochemical and physiological responses of rice (*Oryza sativa* L.) as influenced by *Trichoderma harzianum* under drought stress. **Plant Physiol Biochem**, v. 54, p. 78-88, 2012.

SINGH, K. B.; FOLEY, R. C.; OÑATE-SÁNCHEZ, L. Transcription factors in plant defense and stress responses. **Curr Opin Plant Biol**, v. 5, p. 430-436, 2002.

SOMERVILLE, C. Cellulose synthesis in higher plants. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 22, p. 53–78, 2006.

SONG, S. Y.; CHEN, Y.; CHEN, J.; DAI, X. Y.; ZHANG, W. H. Physiological mechanisms underlying *OsNAC5*-dependent tolerance of rice plants to abiotic stress. **Planta**, v. 234, p. 331-345, 2011.

STEINMETZ, S.; FAGUNDES, P. R. R.; MARIOT, C. H. P.; WREGGE, M. S.; MATZENAUER, R.; MALU, J. R. T. et al. **Zoneamento agroclimático do arroz irrigado por épocas de semeadura no Estado do Rio Grande do Sul**. Embrapa Clima Temperado, 2007. 37p.

STEPONKUS, P. L.; UEMURA, M.; WEBB, M. S. A contrast of the cryostability of the plasma membrane of winter rye and spring oat-two species that widely differ in their freezing tolerance and plasma membrane lipid composition. In: STEPONKUS, P. L. **Adv Low-Temperature**. London: Jai Press, v. 2, p. 211-312, 1993.

STRAUSS, G.; HAUSER, H. Stabilization of lipid bilayer vesicles by sucrose during freezing. **Proc Natl Acad Sci, USA**, v. 83, p. 2422-2426, 1986.

STÜHRWOHLDT, N.; DAHLKE, R. I.; STEFFENS, B.; JOHNSON, A.; SAUTER, M. Phytosulfokine- α controls hypocotyl length and cell expansion in *Arabidopsis thaliana* through phytosulfokinereceptor 1. **Plos One**, v.6, e21054, 2011.

SU, C. F.; WANG, Y. C.; HSIEH, T. H.; LU, C. A.; TSENG, T. H.; YU, S. M. A novel MYBS3-dependent pathway confers cold tolerance in rice. **Plant Physiol**, v. 153, p. 145–158, 2010.

SUN, H.; HUANG, X.; XU, X.; LAN, H.; HUANG, J.; ZHANG, H. S. ENAC1, a NAC transcription factor, is an early and transient response regulator induced by abiotic stress in rice (*Oryza sativa* L.). **Mol Biotechnol**, v. 52, n. 2, p. 101-110, 2012.

SULTANA, S.; KHEW, C. Y.; MORSHED, M. M.; NAMASIVAYAM, P.; NAPIS, S.; HO, C. L. Overexpression of monodehydroascorbate reductase from a mangrove plant (*AeMDHAR*) confers salt tolerance on rice. **J Plant Physiol**, v. 169, p. 311-318, 2012.

TAKASAKI, H.; MARUYAMA, K.; KIDOKORO, S.; ITO, Y.; FUJITA, Y.; SHINOZAKI, K. et al. The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor *OsNAC5* regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice. **Mol Genet Genomics**, v. 284, p. 173–183, 2010.

TAKESAWA, T.; ITO, M.; KANZAKI, H.; KAMEYA, N.; NAKAMURA, I. Overexpression of γ -glutathione S-transferase in transgenic rice enhances germination and growth at low temperature. **Mol Breeding**, v. 9, p. 93–101, 2002.

THEOCHARIS, A.; CLEMENT, C.; BARKA, E. A. Physiological and molecular changes in plants at low temperatures. **Planta**, v. 235, p. 1091–1105, 2012.

TIAN, Y.; ZHANG, H.; PAN, X.; CHEN, X.; ZHANG, Z.; LU, X. et al. Overexpression of ethylene response factor TERF2 confers cold tolerance in rice seedlings. **Transgenic Res**, v. 20, p. 857–866, 2011.

TODD, J.; POST-BEITTENMILLER, D.; JAWORK, J. G. KCS1 encodes a fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase affecting wax biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. **Plant J**, v. 17, n. 2, p. 119–130, 1999.

TURNER, F. T.; CHEN, C. C.; MCCAULEY, G. N. Morphological development of rice seedlings in water at controlled oxygen levels. **Agron J**, v. 73, p. 566–570, 1981.

UEMURA, M.; STEPONKUS, P.L. Effect of cold acclimation on membrane lipid composition and freeze induced membrane destabilization. **Plant Cold Hardiness**, p. 171–79, 1997.

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

VEGA-SA'NCHEZ, M. E.; VERHERTBRUGGEN, Y.; CHRISTENSEN, U.; CHEN, X.; SHARMA, V.; VARANASI, P.; JOBLING, S. et al. Loss of Cellulose Synthase-Like F6 function affects mixed-linkage glucan deposition, cell wall mechanical properties, and defense responses in vegetative tissues of rice. **Plant Physiol**, v. 159, p. 56–69, 2012.

VITULO, N.; FORCATO, C.; CARPINELLI, E. C.; TELATIN, A.; CAMPAGNA, D.; D'ANGELO, M. et al. A deep survey of alternative splicing in grape reveals changes in the splicing machinery related to tissue, stress condition and genotype. **BMC Plant Biol.**, v. 14, n. 99, 2014.

VOGEL, J. T.; ZARKA, D. G.; VAN-ANBUSKIRK, H. A.; FOWLER, S. G.; HOMASHOW, M. F. Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis*. **Plant J**, v. 41, p. 195–211, 2005.

WANG, D.; YUAN, S.; YIN, L.; ZHAO, J.; GUO, B.; LAN, J. et al. A missense mutation in the transmembrane domain of CESA9 affects cell wall biosynthesis and plant growth in rice. **Plant Science**, v. 196, p. 117–124, 2012.

WANG, L.; GUO, K.; LI, Y.; TU, Y.; HU, H.; WANG, B. et al. Expression profiling and integrative analysis of the CESA/CSL superfamily in rice. **BMC Plant Biol**, v. 10, n. 282, 2010.

WANG, Q.; GUAN, Y.; WU, Y.; CHEN, H.; CHEN, F.; CHU, C. Overexpression of a rice OsDREB1F gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both *Arabidopsis* and rice. **Plant Mol Biol**, v. 67, p. 589–602, 2008.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Rev Genet**, v. 10, p. 57–63, 2009.

WANG, Y.; XU, H.; ZHU, H.; TAO, Y.; ZHANG, G.; ZHANG, L. et al. Classification and expression diversification of wheat dehydrin genes. **Plant Sci**, v. 214, p. 113–120, 2014.

WANI, S. H.; GOSAL, S. S. Introduction of OsglyII gene into *indica* rice through particle bombardment for increased salinity tolerance. **Biol Plant**, 2011.

WI, S. J.; KIM, W. T.; PARK, K. Y. Overexpression of carnation S-adenosylmethioninedecarboxylase gene generates a broad-spectrum tolerance to abiotic stresses in transgenic tobacco plants. **Plant Cell Rep**, v. 25, p. 1111–1121, 2006.

WU, H. M.; HUANG, L. Y.; PAN, Y. J.; PENG, J.; FU, B. Y. Function of gene *OsASIE1* in response to abiotic stress in rice. **Acta Agron Sinica**, v. 37, n. 10, p. 1771–1778, 2011.

- XIA, J.; ZENG, C.; CHEN, Z.; ZHANG, K.; CHEN, X.; ZHOU, Y. et al. Endogenous small-noncoding RNAs and their roles in chilling response and stress acclimation in Cassava. **BMC Genomics**, v. 15, n. 634, 2014.
- XIE, X.; SHINOMURA, T.; INAGAKI, N.; KIYOTA, S.; TAKANO, M. Phytochrome-mediated inhibition of coleoptile growth in rice: age-dependency and action spectra. **Photochem. Photobiol**, v. 83, p. 131-138, 2007.
- 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, e30646, 2012.
- XU, P.; CAI, W. *RAN1* is involved in plant cold resistance and development in rice (*Oryza sativa*). **J Exp Bot**, v. 65, n. 12, p. 3277–3287, 2014.
- XU, Z. Y.; ZHANG, X.; SCHLAPPI, M.; XU, Z. Q. Cold-inducible expression of AZI1 and its function in improvement of freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* and *Saccharomyces cerevisiae*. **J Plant Physiol**, v. 168, p. 1576-1587, 2011.
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Rev Plant Biol**, v. 57, p. 781-803, 2006.
- YAN, Y. S.; CHEN, X. Y.; YANG, K.; SUN, Z. X.; FU, Y. P.; ZHANG, Y. M. et al. Overexpression of an F-box protein gene reduces abiotic stress tolerance and promotes root growth in rice. **Mol Plant**, v. 4, p. 190-197, 2011.
- YANG, A.; DAI, X.; ZHANG, W. H. A R2R3-type MYB gene, *OsMYB2*, is involved in salt, cold, and dehydration tolerance in rice. **J Exp Bot**, v. 63, p. 2541-2556, 2012.
- YANG, H.; MATSUBAYASHI, Y.; HANAI, H.; SAKAGAMI, Y. Phytosulfokine- α , a peptide growth factor found in higher plants: its structure, functions, precursor and receptors. **Plant Cell Physiol**, v. 41, p. 825-830, 2000.
- YANG, J. C.; LI, M.; XIE, X. Z.; HAN, G. L.; SUI, N.; WANG, B. S. Deficiency of phytochrome B alleviates chilling-induced photoinhibition in rice. **Am J Bot**, v. 100, n. 9, p. 1860–1870, 2013.
- YANG, P.; LI, X.; WANG, X.; CHEN, H.; CHEN, F.; SHEN, S. Proteomic analysis of rice (*Oryza sativa*) seeds during germination. **Proteomics**, v. 7, p. 3358–3368, 2007.
- YATES, G.; SADANANDOM, A. Ubiquitination in plant nutrient utilization. **Plant Science**, v. 4, p. 1-5, 2013.
- YE, H.; DU, H.; TANG, N.; LI, X.; XIONG, L. Identification and expression profiling analysis of TIFY family genes involved in stress and phytohormone responses in rice. **Plant Mol Biol**, v. 71, p. 291-305, 2009.

YE, N.; GUOHUI, Z.; LIU, Y.; ZHANG, A.; LI, Y.; LIU, R. et al. Ascorbic acid and reactive oxygen species are involved in the inhibition of seed germination by abscisic acid in rice seeds. **J Exp Bot**, v. 63, n. 5, p. 1809–1822, 2011.

YE, N.; ZHU, G.; LIU, Y.; ZHANG, A.; LI, Y.; LIU, R. et al. Ascorbic acid and reactive oxygen species are involved in the inhibition of seed germination by abscisic acid in rice seeds. **J Exp Bot**, v. 63, n. 5, p. 1809–1822, 2012.

YEN, S. K.; CHUNG, M. C.; CHEN, P. C.; YEN, H. E. Environmental and developmental regulation of the wound-induced cell wall protein W112 in the halophyte ice plant. **Plant Physiol**, v. 127, p. 517-528, 2001.

YOKOTANI, N.; SATO, Y.; TANABE, S.; CHUJO, T.; SHIMIZU, T.; OKADA, K. et al. *OsWRKY76* is a rice transcriptional repressor playing opposite roles in blast disease resistance and cold stress tolerance. **J Exp Bot**, 2013.

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

ZHANG, J.; LI, J.; WANG, X.; CHEN, J. *OVP1*, a Vacuolar H₂O₂-translocating inorganic pyrophosphatase (V-PPase), overexpression improved rice cold tolerance. **Plant Plant Physiol Biochem**, v. 49, p. 33-38, 2011.

ZHANG, M.; TAKANO, T.; LIU, S.; ZHANG, X. Abiotic stress response in yeast and metal-binding ability of a type 2 metallothionein-like protein (PutMT2) from *Puccinellia tenuiflora*. **Mol Biol Rep**, v. 41, n. 9, p. 5839-5849, 2014.

ZHANG, T.; ZHAO, X.; WANG, W.; PAN, Y.; HUANG, L.; LIU, X. et al. Comparative transcriptome profiling of chilling stress responsiveness in two contrasting rice genotypes. **Plos One**, v. 7, e43274, 2012.

ZHANG, Q.; JIANG, N.; WANG, G. L.; HONG, Y.; WANG, Z. Advances in understanding cold sensing and the cold-responsive network in rice. **Adv Crop Sci Tech**, v. 1, n. 1, 2013.

ZHANG, Z. H.; SU, L.; LI, W.; CHEN, W.; ZHU, Y. G. A major QTL conferring cold tolerance at the early seedling stage using recombinant inbred lines of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Sci**, v. 168, p. 527–534, 2005.

ZHENG, M.; WANG, Y.; LIU, K.; SHU, H.; ZHOU, Z. Protein expression changes during cotton fiber elongation in response to low temperature stress. **J Plant Physiol**, v. 169, p. 399-409, 2012.

ZHOU, L.; NI, E.; YANG, J.; ZHOU, H.; LIANG, H.; LI, J. et al. Rice *OsGL1-6* is involved in leaf cuticular wax accumulation and drought resistance. **Plos One**, v. 8, e65139, 2013.

ZHOU, Z.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S.; BLANCHARD, C. Composition and functional properties of rice. **Int J Food Sci Technol**, v. 37, p. 849-868, 2002.

ZHU, X.; XIONG, L. Putative megaenzyme DWA1 plays essential roles in drought resistance by regulating stress-induced wax deposition in rice. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.**, v. 110, p. 17790-17795, 2013.