

ABORDAGENS GENÔMICAS PARA TOLERÂNCIA A SECA EM CEREAIS

Newton Portilho Carneiro¹

O mundo está passando por grandes incertezas econômicas que têm se intensificando com o decorrer do tempo. O aumento das relações comerciais entre os países e a interdependência entre eles faz com que problemas em alguns locais reflitam fortemente em outras regiões, gerando uma cascata de problemas econômicos. Além do crescimento populacional, milhões de pessoas no mundo passaram a comprar sua comida em vez de plantá-la e um grande número de países tem aumentado a renda média da população desviando as necessidades e anseios.

A estabilização entre a oferta e a demanda por alimentos no mundo passa necessariamente por um aumento na produtividade e/ou na área agricultável. A área agrícola mundial hoje é de cerca de 1,4 bilhões de hectares, sendo que, cada vez mais, se restringe o aumento da produção via incorporação de novas áreas agrícolas. Uma grande incerteza está se delineando para o futuro com os possíveis cenários relacionados às mudanças climáticas decorrentes do fenômeno chamado de aquecimento global. Nas próximas décadas, existem previsões de que as mudanças de clima podem ser tão intensas, a ponto de mudar a geografia da produção agrícola mundial. Isto deverá causar uma migração de plantas para regiões que hoje não são de sua ocorrência em busca de condições climáticas melhores. Áreas que atualmente são grandes produtoras de grãos podem não estar mais aptas ao plantio antes do final do século.

Além do deslocamento de commodities para áreas marginais, a disponibilidade de água no planeta já está entre as principais preocupações das diversas lideranças mundiais. Existe hoje uma grande competição (e a tendência é de aumentar exponencialmente) dos centros urbanos com os grandes sistemas de irrigação. Há previsões de que, no máximo em 25 anos, a água será um produto raro. A escassez, o uso inadequado, a poluição, a contaminação e o desperdício do recurso "água", são temas chave nas agendas de debates de diversas instituições públicas ou privadas. Dessa forma, estudos que sirvam de base para um futuro desenvolvimento de variedades mais tolerantes ao estresse de seca não só tem importância para áreas com limitação agrícola devido à falta de água, mas também como fator de produção a ser economizado em sistemas irrigados.

Estudos relacionados à tolerância à seca serão então cada vez mais estratégicos, já que esse é o estresse abiótico mais complexo e de maior efeito sobre as culturas e o principal fator que deve limitar a produção mundial de alimentos nos próximos anos (Pennisi, 2008). Neste cenário, torna-

¹ Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. E-mail: newtonc@cpnms.embrapa.br

se imperativo um maior conhecimento dos fatores biológicos e climáticos relacionados à tolerância ao déficit hídrico, de forma a garantir que no futuro, a agricultura possa contar com genótipos cada vez mais adaptados aos estresses hídricos.

O melhoramento de plantas tem tido grande êxito em aumentar o potencial produtivo das culturas no último século, e deve se preparar para enfrentar os novos desafios decorrentes das alterações climáticas globais previstas para as próximas décadas (Borlaug e Doswell, 2005). Em países tropicais como o Brasil, a seleção somente em ambientes de alta produtividade pode não ser a maneira mais eficaz de identificar genótipos capazes de obter melhores produtividades em condições de múltiplos estresses (seca, baixo uso de insumos, toxidez subsuperficial de Al, etc), como ocorre em várias áreas de produção. Essa variabilidade genética é mais facilmente identificada em ensaios envolvendo grande número de genótipos cultivados em sítios manejados de forma a propiciar níveis adequados de estresse nas fases fenológicas apropriadas de cada uma das diferentes culturas. Entretanto, cada estação de cultivo possui condições próprias de precipitação, incluindo períodos de restrição hídrica em alguma fase do desenvolvimento da cultura. Sob essa ótica, cultivares de alta estabilidade de produção quando avaliados em múltiplos locais e anos, podem conter genes favoráveis para tolerância a estresse hídrico, devendo também ser incluídos num programa de identificação e desenvolvimento de materiais tolerantes à seca (Byrne et al., 1995).

No Brasil, estima-se que cerca de 20% da área plantada com cereais (arroz, trigo, milho e sorgo), equivalendo a aproximadamente 8,5 milhões de hectares, é afetada pela seca, resultando em uma perda na produção desses cereais de mais de 23,7 milhões de toneladas (em anos e locais específicos, pode-se chegar à perda total da produção). Estudos de efeitos do estresse hídrico nas diferentes fases fenológicas desses cereais indicam que os estádios de pré-florescimento, florescimento e enchimento de grãos são os mais sensíveis ao estresse hídrico, e que reduções na produção de grãos e no número de grãos por planta pode ser superior a 50% quando a seca coincide com esses estádios (Durães et al., 2004).

A implantação de sítios específicos para imposição do estresse de seca é uma das principais limitações aos trabalhos de fenotipagem para tolerância ao déficit hídrico. Esses sítios devem passar por completa caracterização química, física e das propriedades hídricas do solo, de forma a permitir que as condições de estresse hídrico impostas possam ser reproduzidas ao longo dos ciclos de cultivo das diferentes espécies, e nas fases fenológicas desejadas. Para isto devem ser determinadas características como: a) necessidade hídrica ou evapotranspiração máxima ou potencial (Allen et al., 1998); b) coeficientes de cultura (Albuquerque & Guimarães, 2004); c) controle da água de irrigação e do estresse hídrico diário (Albuquerque & Andrade, 2001); d) monitoramento da umidade do solo por tensiômetros; e) caracterização do estresse hídrico a partir de medições de temperatura do dossel por

termometria infravermelha e da redução de produção entre ambientes com e sem estresse de seca.

Outro tema importante de ser abordado em qualquer projeto que vise estudar o estresse hídrico em uma dada cultura é a definição da fase fenológica e da intensidade com que a mesma será submetida ao estresse. Cada espécie vegetal possui um limite máximo de estresse hídrico, que deve ser experimentalmente estabelecido para que as plantas se recuperem e mantenham um potencial de produção economicamente viável. Isto significa que a submissão da cultura ao estresse acima desse limite ultrapassa as suas condições biológicas de sustentar uma produção econômica.

A biotecnologia é uma ferramenta tecnológica robusta, capaz de impactar o conhecimento e a geração de produtos e processos relacionados ao setor agrícola. O avanço contínuo das técnicas de biologia molecular, aliado à disponibilidade massiva de sequências genômicas estruturais e funcionais, têm viabilizado o surgimento de novas metodologias para geração e análise de dados em genotipagem e expressão gênica a uma velocidade, precisão e escala sem precedentes. Em função da complexidade e da quantidade de dados gerados, muitas vezes o processamento e a análise dos mesmos não é trivial, sendo importante a interação entre grupos e Unidades de pesquisa com diferentes experiências.

O principal propósito da genômica funcional é o de alocar os genes contidos em um determinado genoma dentro de uma perspectiva funcional. Isto significa localizar qual proteína é produzida por cada gene, e qual o seu papel no funcionamento do organismo como um todo (Livesey & Hunt, 2002). Outro aspecto importante da genômica funcional é identificar onde e sob quais condições os genes são expressos. Considerando que a expressão de um gene está condicionada a fatores transcricionais e pós-transcricionais que dependem do grau de desenvolvimento e diferenciação celular, bem como da resposta a estímulos externos (Alberts et al., 1994), tais processos são mediados por programas de expressão gênica diferencial. Nesse sentido, estudos de expressão gênica associados com estratégias de bioinformática, podem permitir a identificação de genes envolvidos nas respostas diferenciadas entre genótipos submetidos a diferentes tipos de estresses.

Na área de tolerância à seca, uma infinidade de estudos tem relatado a identificação de QTLs e de genes controlando diferentes respostas ao déficit hídrico em plantas (Tuberosa & Salvi, 2006; Collins et al., 2008; Bhatnagar-Mathur et al., 2008), indicando que plataformas genômicas, de sequenciamento e de bioinformática têm contribuído para o conhecimento das bases genéticas e fisiológicas desta característica. Por outro lado, os exemplos de sucesso na geração de cultivares tolerantes à seca por meio da seleção assistida ou de transgenia são ainda relativamente limitados, indicando a necessidade de esforços multidisciplinares nessa área. Para isto é fundamental uma abordagem que envolva aspectos tais como: caracterização detalhada de parâmetros

fenotípicos utilizando sítios de seleção apropriados; uma correta escolha dos genótipos a serem avaliados; uma compreensão ampla dos mecanismos genético-fisiológicos que controlam essa característica e ainda, o uso de modelos estatísticos e de simulação adequados para maximizar a utilização da informação gerada nas diferentes espécies.

De posse de uma estrutura consolidada de fenotipagem e de genótipos contrastantes para características efetivamente associadas com tolerância à seca, o uso de técnicas biotecnológicas que possibilitem uma ampla varredura genômica posicional e funcional deve então aumentar a chance de que os fatores genéticos identificados contribuam com o aumento da produção de grãos sob limitação hídrica. Para um problema complexo como os estudos relacionados à tolerância à seca em plantas, o uso de uma abordagem multidisciplinar tem sido então peça fundamental nos projetos mais modernos voltados para esse tema.

Em trabalhos recentes na Embrapa foi verificada correlação de QTLs de sorgo e milho para a característica stay green. Em sorgo foram identificados marcadores significativamente associados com stay green nos dois anos de avaliação, que estão localizados dentro do intervalo de confiança de dois QTLs da mesma característica, Stg2 e Stg3, mapeados nos cromossomos 3 e 2 de sorgo, respectivamente, por Harris et al. (2007). Como resultado das atividades de mapeamento em milho, o marcador bnl91904 foi associado com as características stay green e produção relativa (com/sem estresse) de forma consistente nos dois anos de avaliação fenotípica. Observação importante foi que esse marcador está localizado entre os bins 3.03 e 3.05 de milho, região sintênica à posição do QTL de stay green, Stg2, em sorgo. Tais resultados sugerem que o retardamento na senescência foliar pode também ser um mecanismo de tolerância à seca em milho e que o mapeamento comparativo é uma estratégia importante no estudo da tolerância à seca entre gramíneas. Ainda como parte dos resultados obtidos em milho, marcadores localizados nos bins 1.06 e 1.07 foram associados com a produção relativa em ambos os anos e com a produção sob déficit hídrico em 2006. Nessa região, em trabalhos conduzidos por outros grupos de pesquisa, foram detectados QTLs explicando proporções significativas da produção de grãos sob estresse hídrico (Tuberosa et al., 2002) e QTLs de tolerância à seca estáveis em vários ambientes (Vargas et al., 2006). Outros resultados obtidos nas atividades de mapeamento em milho permitiram identificar marcadores nos cromossomos 4 e 8 associados com características de tolerância à seca no ano de 2006. Essas regiões haviam sido previamente identificadas em outros estudos de mapeamento de QTLs para tolerância à seca em milho (Vargas et al., 2006).

Diversas técnicas para a análise da expressão diferencial de genes são disponíveis, tais como Northern blot (Alwine et al., 1977), differential display (Liang & Pardee, 1992) e dot blot (Lennon & Lebrach, 1991). Entretanto, essas estratégias não são adequadas quando um grande número de produtos de expressão deve ser analisado simultaneamente. Desta forma, a hibridização

subtrativa de cDNAs permite a identificação e o isolamento de seqüências de transcritos diferencialmente expressos em duas condições (Hara et al., 1991). Os métodos de subtração de cDNAs geralmente envolvem a hibridização de uma população (tester) com outra população de cDNA (driver) em excesso, sendo eliminadas as seqüências em comum entre as duas populações. Entretanto, esse método não se mostrou eficiente para a detecção de mRNAs de baixa expressão.

Os projetos de sequenciamento completo dos genomas e de seqüências expressas (ESTs) de diferentes organismos têm cada vez mais impulsionado o desenvolvimento de métodos para o estudo da expressão gênica envolvendo todo o genoma simultaneamente, como os microarranjos de DNA (Watson et al., 1998; Duggan et al., 1999; Graves, 1999). Essa tecnologia utiliza substratos sólidos (chips) para a imobilização de um grande número de seqüências gênicas, as quais têm sua expressão monitorada e quantificada por meio de experimentos de hibridização, possibilitando a varredura massal do genoma, a uma velocidade, precisão e escala sem precedentes (Lemieux et al., 1998). Assim, os microarranjos de DNA aumentaram substancialmente a sensibilidade e a quantidade de dados de expressão gerados entre diferentes genótipos, tecidos ou tratamentos. Embora a confecção dos chips seja uma limitação técnica, atualmente várias empresas comercializam chips de DNA para diferentes espécies, como a Affymetrix (<http://www.affymetrix.com>). No caso do milho, chips de DNA estão disponíveis no Maize Gene Discovery Project, e serão utilizados como estratégia de identificação de genes diferencialmente expressos sob estresse de seca.

Novas tecnologias de piro-sequenciamento de DNA têm sido utilizadas no sequenciamento de transcritos, revelando grandes quantidades de genes diferencialmente expressos e de polimorfismos do tipo SNP, o que viabiliza a ancoragem dos mesmos nos genomas e em mapas genéticos. Barbazuk et al. (2007) utilizaram o 454 no sequenciamento do transcriptoma de meristema apical entre as linhagens de milho B73 e Mo17. Dentre os mais de 280.000 ESTs sequenciados foram identificados em torno de 7.000 SNPs, dos quais mais de 4.900 foram validados dentro dos genes de milho, demonstrando uma elevada eficiência para identificar SNPs em genes. Recentemente, o sequenciamento com a plataforma SOLiD (Applied Biosystems) utilizando bibliotecas de cDNA curtos, quantitativos e aleatórios, ligados a adaptadores específicos tem se destacado como uma excelente estratégia para realizar uma varredura extensiva e quantitativa de genes expressos (Coolnan et al., 2008). Além de uma sensibilidade superior aos ensaios de microarranjos, é possível avaliar splicing alternativo e elementos repetitivos, mas, por outro lado, é necessária a existência de um genoma completamente sequenciado e de seqüências de cDNAs completos, que serão as estruturas para a alocação das etiquetas expressas sequenciadas.

Uma resposta específica ao déficit hídrico representa a combinação de eventos moleculares prévios que foram ativados pela percepção do sinal de

estresse. Por exemplo, mudanças no volume celular em plantas submetidas ao déficit hídrico podem ativar canais na membrana celular, causar alterações na conformação e justaposição de proteínas responsáveis pela percepção do estresse ou causar alterações na continuidade do sistema "parede celular – plasmalema", conseqüentemente, acionando outras sinalizações moleculares que, então, ativam outros genes, em resposta ao déficit hídrico (Hare et al., 1996; Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1996, 1997; Yamaguchi-Shinozaki et al., 2002). Quando a água é perdida pela célula, processos regulatórios que ajustam o metabolismo celular para a nova condição são iniciados. Simultaneamente, o crescimento é inibido e alterações no desenvolvimento resultam em outras mudanças na expressão gênica. Genes que funcionam durante mudanças no metabolismo, regulação, sinalização e reconhecimento do estresse são também induzidos. Entretanto, poucos desses genes têm sido identificados e documentados. Genes induzidos pelo déficit hídrico promovem tolerância celular à desidratação, funções de proteção no citoplasma, alterações do potencial osmótico da célula para aumentar absorção de água, controle da acumulação de íons e regulação gênica (Bray, 1993, 1997, 2002).

Muitos dos genes induzidos pelo déficit hídrico são tidos como protetores das estruturas celulares dos efeitos da perda de água (Bray, 1997; Shen et al., 1997). Entretanto, a expressão de um gene não garante que o produto desse gene específico melhore a habilidade da planta de sobreviver ao estresse (Nepomuceno et al., 2001). A expressão de alguns genes pode ter resultado de injúria ou dano ocorrido durante o estresse. Outros genes podem ser induzidos, mas sua expressão não apresenta nenhum efeito na tolerância ao déficit hídrico. Entretanto, alguns genes são necessários para a tolerância ao déficit e a acumulação de seus produtos pode ser uma resposta de adaptação ao período de estresse (Bray, 1993, 1997, 2002). Diversos trabalhos tem sugerido o envolvimento de proteínas LEA (Late embryogenesis abundant) (Bohnert et al., 1995; Zhu et al., 1997), proteínas de choque térmico (HSP-Heat Shock Proteins), osmólitos como prolina, glicina-betaina, manitol e inositol (Shen et al., 1997; Hare and Cress, 1997), proteínas de transporte (aquaporin - channel proteins) (Maurel et al., 1993; Yamada et al., 1995), ácido abscísico (Bray, 1993; Ingram & Bartels, 1996) e açúcares, como trehalose e sacarose (Goddijn et al., 1997; Boyer, 1996; Muller et al, 1995; Crowe et al., 1993), nas respostas expressas por plantas ao déficit hídrico, e que podem estar relacionadas com uma maior ou menor tolerância ao estresse.

Um importante avanço no conhecimento de genes reguladores e regulados no estresse hídrico foi a identificação de um elemento cis-atuante denominado DRE (Dehydration Responsive Element) em *Arabidopsis thaliana* (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 1994; Liu et al., 1998). Esse elemento tem uma seqüência de 5 pares de bases (CCGAC), denominada de C-repeat (Baker et al., 1994), e está presente em uma ou múltiplas cópias na região promotora de muitos genes de plantas, relacionados com resposta a desidratação

(Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 1994). O fator de transcrição DREB1 (Dehydration Responsive element Binding Protein) especificamente interage com esse elemento DRE, e induz a expressão de genes envolvidos na resposta ao estresse em *Arabidopsis thaliana* (Kasuga et al., 2004). Um número considerável de genes tem sido descrito como induzidos em resposta à desidratação (Tomashow, 1994). Seki et al. (2001) identificaram doze genes estresse-induzidos como genes alvo de DREB1, enquanto Fowler & Tomashow (2002) descreveram 41 genes alvos de DREBs. A função de alguns produtos desses genes parece estar relacionada a mecanismos de manutenção das estruturas e funções celulares básicas durante déficit hídrico, baixas temperaturas e alta salinidade (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1996).

A expressão diferencial de genes envolvidos nos mecanismos de defesa contra a desidratação celular tem papel chave na maior ou menor tolerância ao déficit hídrico. A compreensão de como a expressão individual de genes contribui na resposta final em termos celulares, fisiológicos e agrônômicos tem possibilitado o desenvolvimento de estratégias para o desenvolvimento de plantas mais tolerantes ao déficit hídrico (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1996; Tomashow, 1994). Entretanto, não se sabe na prática o quanto cada uma dessas respostas está contribuindo para uma maior ou menor tolerância ao déficit hídrico em plantas. Essa contribuição pode ser pequena ou grande, individual ou como parte de um complexo maior de inter-relações. Na realidade, o que deve ocorrer é uma interação entre todas essas respostas (Hare & Cress, 1997; Nepomuceno et al., 2001) ou pelo menos uma parte delas, tendo como resultado final uma maior tolerância à seca.

Recentemente a Embrapa realizou experimentos de microarranjos com o objetivo de identificar genes diferencialmente expressos na raiz de uma linhagem de milho mais tolerante ao estresse de seca. Essa linhagem apresenta a característica de apresentar o intervalo de florescimento reduzido mesmo na presença do estresse trazendo produtividade relativa mais alta do que as outras linhagens. Foi utilizado uma lamina de oligos de 46,128 oligonucleotídeos de 70pb representando genes expressos de milho (www.maizearray.org). Os dados gerados por esse experimento concentraram-se em genes relacionados principalmente com transporte e resposta a estímulos. Os dados de genes diferencialmente expressos confirmado por Realtime serão integrados com mapeamento e banco de dados para avaliar o efeito do gene na tolerância ao estresse.

Considerações finais

Tolerância a seca é uma característica quantitativa controlada por muitos genes, com baixa herdabilidade e alta interação entre genótipo e ambiente. O melhoramento de espécies vegetais visando tolerância à seca é ainda mais complicado devido a outros fatores abióticos como temperatura, irradiação e toxicidade e/ou deficiência de nutrientes. As características de certos solos podem afetar o balanço de diferentes estresses abióticos. Para o uso de

seleção assistida por marcadores é necessário as regiões de tolerância estarem muito bem definidas para um possível sucesso desse processo e é difícil definir se essa estratégia tem tido sucesso. Deve-se considerar a interação de múltiplos estresses, a fenologia da planta e a integração com características de tolerância à seca, QTLs, microarranjos, e transgenia. Deve-se ser específico a um germoplasma apropriado adaptado a um ambiente escolhido e extensiva definição de mecanismos moleculares e morfo-fisiológicos.

Verificou-se na Embrapa a necessidade de desenvolver um projeto multidisciplinar sobre tolerância à seca em milho, sorgo, arroz e trigo, que envolvesse a caracterização de forma detalhada de sítios de seleção utilizados para fenotipagem (aspectos físico-hídricos e químicos) para garantir a imposição do estresse hídrico de forma adequada quanto à sua intensidade e tempo de exposição (fase fenológica desejada) nas culturas estudadas; a fenotipagem de recursos genéticos buscando identificar materiais mais tolerantes à seca e gerando dados para uso nos trabalhos de mapeamento das quatro espécies; a identificação de mecanismos morfo-fisiológicos relacionados com a tolerância à seca nas diferentes culturas; a identificação de regiões genômicas (QTLs) e genes ligados à tolerância à seca utilizando estratégias de genômica posicional e funcional; a organização de forma digitalizada dos dados gerados; e a criação de bases para estratégias futuras visando desenvolver cultivares mais adaptadas às condições de limitação hídrica.

Uma correta fenotipagem, associada ao uso de materiais genéticos contrastantes, dará subsídio para que modernas técnicas de biologia molecular sejam aplicadas para identificar genes e entender os mecanismos biológicos a eles relacionados. Para isso, os resultados advindos do mapeamento de QTLs, mapeamento associativo, microarranjos de DNA, bibliotecas subtrativas e sequenciamento massivo de cDNA serão integrados por meio de ferramentas de bioinformática. Esse vasto conjunto de informações genético-moleculares será uma valiosa fonte de genes, promotores e marcadores para serem validados e utilizados no futuro, em projetos visando o desenvolvimento de cultivares via melhoramento assistido ou transgenia.

Referências

- Allen, R.G.; Pereira, L.S.; Raes, D.; Smith, M. (1998) Crop evapotranspiration: guidelines for computing crop water requirements. Rome: FAO, 1998. 300p. (FAO. Irrigation and drainage paper, 56).
- Baker SS, Wilhelm KS, Thomashow MF. The 5'-region of *Arabidopsis thaliana* cor15a has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant Mol Biol.* 1994 Mar;24(5):701-13
- Bhatnagar-Mathur, P.; Vadez, V.; Sharma. K.K. (2008) Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. *Plant Cell Rep* 27: 411-424.
- Bohnert, H. J.; Nelson, D. E.; Jensen, R. G. (1995). Adaptations to

environmental stresses. *The Plant Cell*, 7:1099-1111.

Borlaug, N.E.; Doswell, C.R. (2005) Feeding a world of ten billion people: a 21st century challenge. In R. Tuberosa, RL Phillips, M Gale, eds, Proceedings of the International Congress in the Wake of the Double Helix: From the Green Revolution to the Gene Revolution, 27-31 May 2003, Bologna, Italy. Avenue Media, Bologna, Italy pp 3-23.

Bray, E. A. (2002). Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: an analysis using microarrays and differential expression data. *Ann Bot*, 89:803-811.

Bray, E. A. (1993). Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.* 103:1035-1040.

Bray, E.A. (1997). Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci.* 2: 48-54.

Byrne, P.F., J. Bolanos, G.O. Edmeades, and D.L. Eaton. 1995. Gains from selection under drought versus multilocation testing in related tropical maize populations. *Crop Science* 35:63-69.

Collins, N.C.; Tardieu, F.; Tuberosa R. (2008) Quantitative trait loci and crop performance under abiotic stress: where do we stand? *Plant Phys.* 147: 469-486.

Coolan, N.; Forrest, A.R.R.; Kolle, G.; Gardiner, B.B.A.; Faulkner, G.F.; Brown, M.K.; Taylor, D.F.; Steptoe, A.L.; Wani, S.; Bethel, G.; Robertson, A.J.; Perkins, A.C.; Bruce, S.J.; Lee, C.C.; Ranade, S.S.; Peckham, H.E.; Manning, J.M.; McKernan, K.J.; Grimmond, S.M. (2008). Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing. *Nature Methods*, 1223: 1-7.

Crowe, J.H.; Crowe, L.M.; Leslie, S.B.; Fisk, E. (1993). Mechanisms of stabilization of dry biomolecules in anhydrobiotic organisms. In: Close TJ, Bray EA (eds.), *Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress*, p. 11-20. Amer. Soc. Plant Physiology, Riverside, CA.

Durães, F.O.M.; Gama, E.E.G.; Gomide, R.L.; Andrade, C.L.T.; Guimarães, C.T., Magalhães, J.V. (2005) Phenotyping maize for drought response in Brazilian tropical lands: Approaches to breeding programs and genomics studies. Pp. 7-9 In: INTERDROUGHT II – The 2nd International Conference on Integrated Approaches to Sustain and Improve Plant Production under Drought Stress, 2., 2005, Rome, Italy. *Annals ... Rome: Interdrought-II Committee; University of Rome*, 2005. (Rome, Italy, from 24th to 28th September 2005 at University of Rome "La Sapienza").

Goddijn, J.M.; Verwoerd, T.C.; Voogd, E.; Krutwagen, R.W.H.H.; Graaf, P.T.H.M.; Poels, J.; Dun, K.; Kees; Ponstein, A.S.; Damm, B.; Pen, J. (1997). Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiology* 113:181-190.

- Hare, P.D.; Cress, w.a. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* 21:79-102.
- Hare P; Plessis S.P.; Cress W.A.; Staden J.V. (1996) Stress-induced changes in plant gene expression. *South Africa Journal of Science* 92:431-439.
- Harris, K.; Subudhi, P.K.; Borrell, A.; Jordan, D.; Rosenow, D.; Nguyen, H.; Klein, P.; Klein, R.; Mollet, J. (2007) Sorghum stay-green QTL individually reduce post-flowering drought-induced leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* 58: 327-338.
- Ingram J.; Bartels, D. (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Rev. Plant Physiology Plant Mol. Biology* 47: 377-403.
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *Plant Cell*. 1998 Aug;10(8):1391-406.
- Maurel, C.; Reizer, J.; Schroeder, J. I.; Chrispeels, M. J. 1993. The vacuolar membrane protein - TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes. *EMBO J*. 12:2241-2247.
- Muller, J.; Boller, T.; Wiemken, A. (1995) Trehalose and Trehalase in plants: Recent developments. *Plant Science* 112:1.
- Nepomuceno, A.L.; Farias, J. R. B.; Neumaier, N.; Cattelan, A.J; Oya, T; Delattre, N. (2001) Estratégias para amenizar impactos decorrentes das adversidades climáticas. In: Resultados de Pesquisa da Embrapa Soja.
- Pennisi E (2008). The blue revolution, drop by drop, gene by gene. *Science* 320: 21-39.
- Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi- Shinozaki K, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K (2001) Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA Microarray. *Plant Cell* 13:61-72
- Shen, B.; Jensen, R.G.; Bohnert, H.J. (1997) Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiology* 115:527-532.
- Shen, L.; Courtois, B.; McNally, K.L.; Robin, S. Li. Z. Evaluation of near-isogenic lines introgressed with QTLs for root depth through marker-aided selection. *Theor. Appl.Genet.* 103:75-83, 2001.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (1997) Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiology* 115:327-334.

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (1996) Molecular responses to drought and cold

Thomashow MF. Plant Cold Acclimation: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1999 Jun;50:571-599

Tuberosa, R.; Salvi, S.; Sanguineti, M.C.; Landi, P.; Maccaferri, M.; Conti, S. (2002) Mapping QTLs regulating morpho-physiological traits and yield: case studies, shortcomings and perspectives in drought-stressed maize. *Annals of Botany* 89: 941-963.

Tuberosa, R.; Salvi, S. (2006) Genomics approaches to improve drought tolerance in crops. *Trends Plant Sci* 11: 405-412.

Vargas, M.; van Eeuwijk, F.; Crossa, J.; Ribaut, J-M. (2006) Mapping QTLs and QTL x environment interaction for CIMMYT maize drought stress program using factorial regression and partial least squares methods. *Theor. Appl. Genet.* 112: 1009-1023.

Yamada, S.; Katsuhara, M.; Kelly, W.; Michalowski, C. B.; Bohnert, H. (1995). A family of transcripts encoding water channels proteins: Tissue-specific expression in the common ice plant. *Plant Cell* 7:1107-1112.

Yamaguchi-Shinozaki, K.; Kasuga, M.; Liu, Q.; Nakashima, K.; Sakuma, Y.; Abe, H.; Shinwari, Z.K.; Seki, M.; Shinozaki, K. (2002). Biological mechanisms of drought stress response. In: Iwanaga, M., Genetic engineering of crop plants for abiotic stress. Jircas Working Report No 23, Japan.

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell.* 1994 Feb;6(2):251-64.

Zhu, J.; Hasegawa, P.M.; Bressan, R.A. (1997) Molecular aspects of osmotic stress in plants. *Critical Review in Plant Science* 16:253-27.