

Foto: Anna Cristina Lanna



Protocolo de deficiência hídrica em arroz de terras altas para análise de transcriptoma

Anna Cristina Lanna¹
Milene Alves de Figueiredo Carvalho²
Ricardo Diógenes Dias Silveira³
Alexandre Bryan Heinemann⁴
Cláudio Brondani⁵

Introdução

O desenvolvimento de cultivares comerciais de arroz de terras altas tolerantes à deficiência hídrica é um dos principais desafios da pesquisa agrícola mundial, sobretudo devido à redução das fontes de água potável e à competição da irrigação com o consumo humano. O caráter tolerância à deficiência hídrica é complexo e, normalmente, está envolvido com diferentes rotas metabólicas relacionadas a distintos e, por vezes, complementares mecanismos fisiológicos, como fechamento de estômatos, enrolamento foliar, redução da taxa fotossintética, retardo na data de florescimento, sinalização via ácido abscísico, acúmulo de solutos, dentre outros (HADIARTO; TRAN, 2011). A análise de transcriptoma tem sido muito eficiente para identificação de genes relacionados à tolerância a deficiência hídrica em arroz (MIR et al., 2012). Um dos motivadores do uso do genoma funcional para a identificação de genes de interesse é o custo do sequenciamento dos transcritos, que tem decrescido ano a ano, permitindo o sequenciamento de mRNA (RNA-Seq) em larga escala. Esse documento objetiva estabelecer um protocolo de

deficiência hídrica aliado à obtenção de material vegetal para estudos de transcriptoma em plantas de arroz de terras altas. Esse protocolo abrange: (a) a observação da fase fenológica dos genótipos de arroz de terras altas selecionados para o referido estudo para imposição do estresse hídrico (restrição de água); (b) o monitoramento da deficiência hídrica pelo controle da quantidade de água contida no vaso em períodos pré-determinados, associado à avaliação do potencial hídrico das plantas para confirmação do estresse aplicado; e (c) a comprovação de que as plantas de arroz de terras sob deficiência hídrica ativaram mecanismos de resposta para a tolerância à deficiência hídrica.

Material e Métodos

O experimento de tolerância à deficiência hídrica foi conduzido em dois anos consecutivos, 2010 e 2011, entre os meses de novembro e março, em casa de vegetação da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO. A temperatura e umidade relativa do ar foram monitoradas durante o período do experimento.

¹ Química, Doutora em Fisiologia Vegetal, pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, anna.lanna@embrapa.br

² Engenheira agrônoma, Doutora em Fisiologia Vegetal, pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, milene.carvalho@embrapa.br

³ Biólogo, Doutorando em Biologia Molecular pela Universidade Federal de Goiás, bolsista da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, ricardo_biolgia@hotmail.com

⁴ Engenheiro agrônomo, Doutor em Irrigação e Drenagem, pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, alexandre.heinemann@embrapa.br

⁵ Engenheiro agrônomo, Doutor em Biologia Molecular, pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, claudio.brondani@embrapa.br

As cultivares Douradão e BRS Primavera selecionadas para o referido experimento fazem parte do acervo do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Arroz e Feijão e são utilizadas como genitores no programa de melhoramento de arroz de terras altas. Essas cultivares apresentam características contrastantes para tolerância à deficiência hídrica, sendo Douradão considerada tolerante e BRS Primavera, sensível. Antes da instalação do ensaio foi conduzido um experimento piloto, no mesmo local, a fim de observar as fases fenológicas das cultivares e, conseqüentemente, determinar o número de dias após emergência (DAE) para dar início aos ciclos de deficiência hídrica definidos nos experimentos. Para instalação do experimento, cerca de 10 sementes das cultivares Douradão e BRS Primavera foram semeadas em vasos contendo 8 kg de solo nativo do Cerrado, realizando as adubações necessárias para adequada condição nutricional da planta de arroz. Após a emergência foram mantidas cinco plantas em cada vaso.

Duas épocas de restrição hídrica foram selecionadas para avaliação das respostas moleculares das plantas de arroz de terras altas à deficiência hídrica: (I) Época 1 ou 1º ciclo de deficiência hídrica - corte de irrigação no estágio vegetativo V3 (início do perfilhamento; classificação de acordo com COUNCE et al., 2000) e re-início de irrigação no estágio vegetativo V6; e (II) Época 2 ou 2º ciclo de deficiência hídrica - corte de irrigação no estágio reprodutivo R3 (emissão da panícula) e re-início de irrigação no estágio reprodutivo R6 (grão leitoso), respeitando o ciclo fenológico, determinado pelo experimento piloto, de cada cultivar. Quatro regimes de irrigação foram utilizados: (1) grupo A (grupo controle) - conjunto de plantas sem restrição hídrica; (2) grupo B - conjunto de plantas submetidas a 30 - 35% de restrição hídrica; (3) grupo C - conjunto de plantas submetidas a 50 - 55% de restrição hídrica; e (4) grupo D - conjunto de plantas submetidas a 70 - 75% de restrição hídrica. Em ambos os anos de experimentação a irrigação foi realizada normalmente a partir da semeadura. Quando 50% das plantas de arroz de terras altas, de cada cultivar atingiram o estágio vegetativo V3 (início do 1º ciclo de deficiência hídrica), a irrigação foi interrompida para que os diferentes regimes hídricos fossem alcançados,

no solo, e para que as plantas, no final do 1º ciclo de deficiência hídrica (estádio vegetativo V6), estivessem respondendo, potencialmente, à deficiência hídrica imposta. A irrigação continuou normalmente para o conjunto de plantas submetidas ao 2º ciclo de deficiência hídrica até o momento em que mais de 50% das plantas desse conjunto de vasos atingiram o estágio reprodutivo R3 (emissão da panícula), quando foi aplicada a restrição hídrica.

Para estabelecer a quantidade de água no vaso para cada regime hídrico, foi determinada a capacidade de campo (CC) do solo, definida como o máximo conteúdo de água retido pelo solo após o excesso ter sido drenado (MELLO et al., 2002). Esse processo foi estabelecido registrando-se a Massa máxima do Vaso (MV_{cc}) (solo + água), e o respectivo volume de água para atingir a CC. A massa do vaso e o volume de água foram obtidos por meio de uma balança eletrônica (Marte, modelo LC20) e proveta, respectivamente. Com base no volume máximo de água para alcançar a CC, foi possível determinar, em cada vaso, a massa máxima de água retida pelo solo (Massa de Água de Referência - MAR), considerando a densidade da água igual a 1 Mg m⁻³. MAR foi determinada pela diferença entre a Massa do Vaso na CC (MV_{cc}) e a Massa do Vaso com Solo Seco (MV_{ss}) (Equação 1). Após o corte da irrigação, nos dois ciclos de deficiência hídrica impostos, os vasos foram pesados diariamente, obtendo-se assim a Massa Diária do Vaso (MDV) e, por consequência, a Massa Diária de Água (MDA). Esta foi calculada pela diferença entre a MDV e MV_{ss} (Equação 2). Os tratamentos (regimes hídricos), pré-definidos no parágrafo acima, foram expressos como Índice de Deficiência Hídrica (IDH), determinado por meio da razão entre a MDA e MAR (Equação 3), sendo que no dia do corte da irrigação MDA foi considerada igual a MAR. Essa normalização foi realizada para minimizar os efeitos das variáveis climáticas na casa de vegetação onde o experimento foi conduzido. Para os diferentes tratamentos, a Massa de Água equivalente a cada Restrição Hídrica imposta (MA_{RH}) foi previamente calculada multiplicando-se a MAR pelo valor da Restrição Hídrica pré-estabelecida (RH) (Equação 4). Dessa forma, foi possível determinar a Massa do Vaso equivalente a cada Restrição Hídrica (MV_{RH}) pela soma da MA_{RH} e da MV_{ss} (Equação 5). Assim, no

momento em que os vasos de um determinado tratamento atingiam a MV_{RH} , a mesma era mantida constante por meio da reposição diária de Água Evapotranspirada (AE), calculada pela diferença de Massa dos Vasos entre os dias i e $i-1$ (Equação 6).

$$MAR = MV_{cc} - MV_{ss} \quad \text{Equação 1}$$

$$MDA = MDV - MV_{ss} \quad \text{Equação 2}$$

$$IDH = \frac{MDA}{MAR} \quad \text{Equação 3}$$

$$MA_{RH} = MAR \cdot RH \quad \text{Equação 4}$$

$$MV_{RH} = MA_{RH} + MV_{ss} \quad \text{Equação 5}$$

$$AE = MV_{i-1} - MV_i \quad \text{Equação 6}$$

Em que:

MAR = Massa de Água de Referência; MV_{cc} = Massa do Vaso na Capacidade de Campo; MV_{ss} = Massa do Vaso com Solo Seco; MDA = Massa Diária de Água; MDV = Massa Diária do Vaso; IDH = Índice de Deficiência Hídrica; MA_{RH} = Massa de Água equivalente a cada Restrição Hídrica imposta; RH = valor da Restrição Hídrica pré-estabelecida; MV_{RH} = Massa do Vaso equivalente a cada Restrição Hídrica; AE = Água Evapotranspirada, MV_{i-1} = Massa do Vaso no dia $i-1$, MV_i = Massa do Vaso no dia i .

A duração do estresse variou com a severidade resultante do tratamento, ou seja, para as plantas submetidas a 30 - 35% de restrição hídrica ($IDH \cong 0,7$), a duração do estresse foi de aproximadamente 10 dias. Para as plantas submetidas a 50 - 55% de restrição hídrica ($IDH \cong 0,5$), a duração foi de aproximadamente 6 dias. Para as plantas submetidas a 70 - 75% de restrição hídrica ($IDH \cong 0,3$), a duração foi de aproximadamente 1 dia. Essa variação no período de estresse foi semelhante para os dois anos de experimentos (Figura 1).

Subsequentemente ao período de restrição hídrica, as plantas estressadas foram, imediatamente, irrigadas e mantidas até o final do ciclo da cultura na CC para avaliação das respectivas produtividades ($g \text{ grãos vaso}^{-1}$) em função do regime hídrico imposto. A produtividade foi utilizada como atributo balizador da severidade da deficiência hídrica de acordo com Campos et al. (2004). Os dados de produtividade foram normalizados por meio da razão entre o valor de produtividade das plantas submetidas a um determinado regime hídrico pelo valor de produtividade das plantas do tratamento controle, denominado Índice de Produtividade (IP). Para análise de transcriptoma, amostras de folhas e raízes foram coletadas no último dia de restrição hídrica do 2º ciclo de deficiência hídrica, mantidas em nitrogênio líquido e, em seguida, transportadas para o laboratório de Biotecnologia para serem armazenadas em ultrafreezer (-80 °C). Posteriormente, foi realizada a extração de RNA das amostras coletadas, por meio da utilização do kit de extração PureLink® RNA Mini Kit (Ambion®) de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA total foi extraído a partir de um *pool* de três plantas, de diferentes repetições, a fim de aumentar a eficiência no isolamento de sequências expressas, mRNA, relacionadas às respostas de tolerância à deficiência hídrica. Após as extrações do RNA total da parte aérea e raiz (plantas estressadas e controle das duas cultivares), as amostras foram quantificadas via espectrofotometria no aparelho NanoVue Plus™ (GE Healthcare), e a análise da integridade

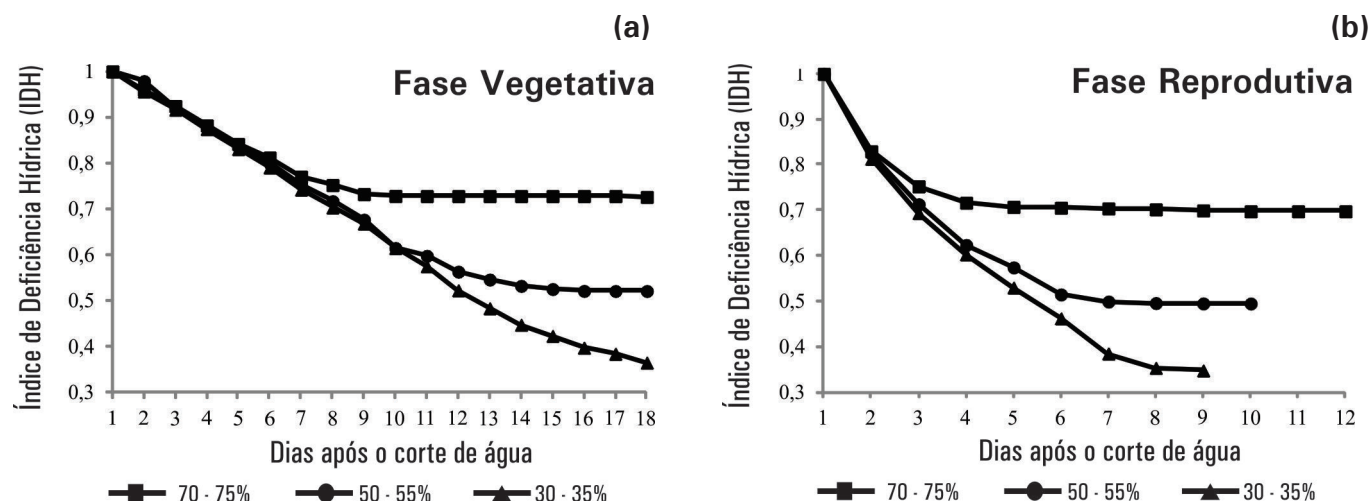


Figura 1. Índice de deficiência hídrica (IDH) após o corte de água nos vasos contendo cinco plantas de arroz de terras altas, Douradão e BRS Primavera, no (a) 1º ciclo de deficiência hídrica (estádio vegetativo) e no (b) 2º ciclo de deficiência hídrica (estádio reprodutivo).

do RNA foi verificada por eletroforese em gel desnaturante com concentração de 1% de agarose. Já o potencial hídrico foliar ante-manhã, que corresponde ao período ao qual o potencial hídrico da planta encontra-se em equilíbrio com o potencial matricial do solo, foi obtido no último dia de restrição hídrica do 2º ciclo de deficiência, no ano de 2011, utilizando-se a câmara de pressão PMS Instrument Company (Corvallis, Oregon). As folhas coletadas foram as primeiras completamente expandidas (do topo para base, considerando a haste principal), e as raízes coletadas foram as da parte mediana.

O desenho experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com parcelas subdivididas para os dois anos de experimentação. No entanto, para o primeiro ano (safra 2010/11), foram utilizadas seis repetições para cada cultivar e para cada ciclo de deficiência hídrica, sendo que três vasos, contendo cinco plantas por vaso, foram utilizados para amostragem do material vegetal e três vasos mantidos até o final do ciclo do arroz de terras altas para determinação da produtividade. Para o segundo ano (safra 2011/12), foram utilizadas sete repetições (três repetições para coleta de material vegetal e quatro mantidas até o fim do ciclo de vida da cultura para avaliação de produtividade) na Época 1, e oito repetições na Época 2 (quatro repetições utilizadas para coleta de material vegetal e quatro mantidas até o fim do ciclo de vida da cultura para avaliação de produtividade). As repetições foram feitas por regime hídrico, cultivar e ciclo de deficiência hídrica.

Resultados e Discussão

Inicialmente, observou-se o ciclo fenológico das cultivares Douradão e BRS Primavera, cultivados em casa de vegetação, como requisito inicial para determinação do número de dias após emergência (DAE) para aplicação da deficiência hídrica (Figura 2). Com essa informação foi possível determinar os períodos de restrição hídrica de acordo com a fase fenológica de cada genótipo, bem como iniciar o monitoramento da MDA durante os ciclos de deficiência hídrica (DH), levando em consideração a severidade e a duração de cada nível de estresse, para cada genótipo.

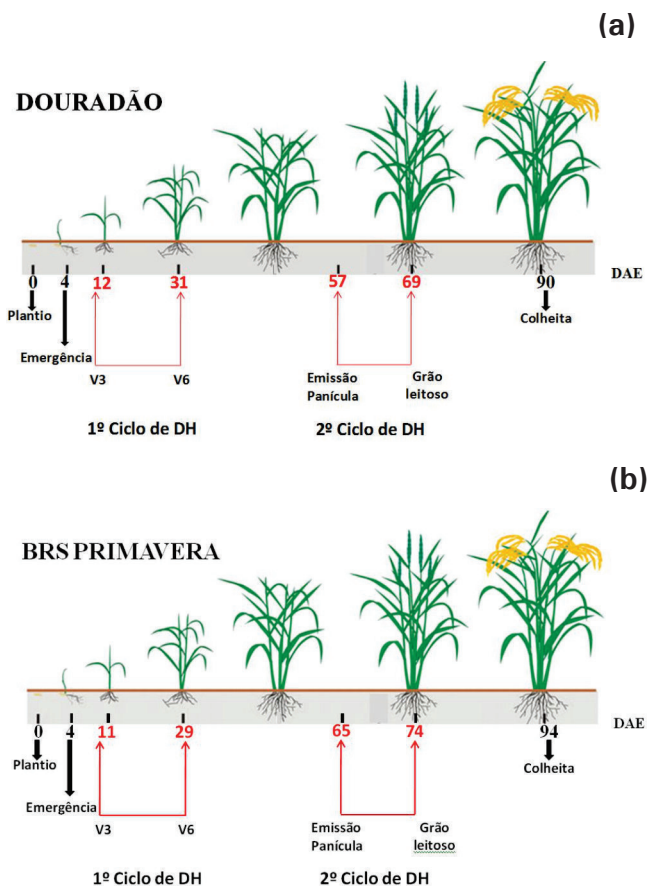


Figura 2. Ciclos de Deficiência Hídrica (DH) em função das fases fenológicas, expressas em função de Dias Após Emergência (DAE), de duas cultivares de arroz de terras altas, (a) Douradão e (b) BRS Primavera.

No primeiro ano de experimentação, para ambos os genótipos, o 1º ciclo de deficiência hídrica foi o período entre o 20º e o 31º DAE das plantas de arroz de terras altas. Já para o segundo ano, esse período foi entre o 17º e o 31º DAE. No 2º ciclo de deficiência hídrica, foi considerado o período entre o 55º e o 65º DAE, para Douradão, e entre o 63º e o 73º DAE, para BRS Primavera, no primeiro ano, e o período entre o 60º e o 72º DAE para Douradão, e entre o 67º e o 77º DAE, para BRS Primavera, no segundo ano. A discrepância do ciclo fenológico das cultivares estudadas, principalmente, durante o 2º ciclo de DH, nos dois anos de experimentação, provavelmente, ocorreu devido às diferentes condições climáticas. De acordo com a Agência de Informações da Embrapa, a temperatura ótima para o desenvolvimento do arroz situa-se entre 20 e 35 °C. As faixas de temperatura ótimas variam de 20 a 35 °C para germinação, de 30 a 33 °C para a floração e de 20 a 25 °C para a maturação. A planta do arroz não tolera temperaturas

excessivamente baixas nem excessivamente altas. Entretanto, a sensibilidade da cultura varia, tanto para uma como para a outra, em função da fase fenológica. A ocorrência de temperaturas superiores a 35 °C também pode causar esterilidade das espiguetas. A fase mais sensível do arroz a altas temperaturas é a floração. A segunda fase mais sensível é a pré-floração ou, mais especificamente, cerca de nove dias antes da emissão das panículas. Da mesma forma que para temperaturas baixas, há grandes diferenças entre genótipos quanto à tolerância a temperaturas altas (SILVA et al., 2012). Entre os anos de experimentação, foram encontradas variações entre as temperaturas máximas e mínimas médias, o que pode ter sido decisivo para a diferença entre o período entre a emergência e a fase de emissão de panícula, principalmente, para a cultivar Douradão (Tabela 1).

Tabela 1. Temperaturas médias mensais (°C), máximas e mínimas, durante o ciclo de vida de plantas de arroz de terras altas, cultivares Douradão e BRS Primavera, crescidas em casa de vegetação e submetidas a diferentes regimes hídricos, em dois anos de experimentação.

Meses	1º ano		2º ano	
	T max	T min	T max	T min
Nov	40,43	22,00	37,08	23,71
Dez	36,39	21,85	37,87	22,81
Jan	35,77	20,56	36,01	22,57
Fev	36,29	20,55	38,00	22,29
Mar	37,52	21,20	40,41	22,23

Nos experimentos realizados, o nível de estresse hídrico para plantas de arroz de terras altas foi mantido por meio da reposição de água evapotranspirada diariamente. Entretanto, como esse protocolo apresenta restrições, uma vez que muitos cientistas documentam que é um protocolo correto matematicamente, mas incorreto fisiologicamente; em 2011 foram incrementadas avaliações de potencial hídrico foliar, que é mais confiável e relevante porque mede o *status* hídrico da planta sob efeito da limitação de água no solo, e não o *status* hídrico do solo (www.plantstress.com). De acordo com esse site, o potencial hídrico é o indicador para a planta e a medida de umidade do solo é uma avaliação adicional, mas não a principal. As restrições quanto ao uso da determinação da massa do vaso recai no fato de que esse procedimento não induz estresse nas plantas, visto que elas sofrem frequentemente ciclos de recuperação de estresse, os quais são

complexos fisiologicamente e diferentes do ciclo de estresse que ocorre em condições de campo. Para confirmar a imposição da deficiência hídrica nos experimentos, a Figura 3 mostra valores de potencial hídrico (Ψ_w) foliar, significativamente reduzidos, nas duas cultivares de arroz de terras altas sob estudo, em função da deficiência hídrica imposta no 2º ciclo de DH, durante o segundo ano de experimentação. As cultivares Douradão e BRS Primavera apresentaram valores de Ψ_w foliar de -1,2 MPa e -0,47 MPa, respectivamente, no tratamento sem restrição hídrica. Entretanto, quando as plantas foram submetidas a 70% de restrição hídrica ($IDH \cong 0,3$), as folhas da cultivar Douradão apresentaram valor de Ψ_w igual a -3,3 MPa, redução de aproximadamente 175% na energia livre da água, e a cultivar BRS Primavera, valor de Ψ_w igual a -4,0 MPa, redução de aproximadamente 757%, em relação aos valores encontrados nas plantas do tratamento controle. Esses resultados oferecem um bom indicativo da maior tolerância da cultivar Douradão em relação a cultivar BRS Primavera, fornecendo maior confiabilidade da efetividade do ensaio para discriminar os genótipos com comportamento diferenciado em relação à tolerância à deficiência hídrica.

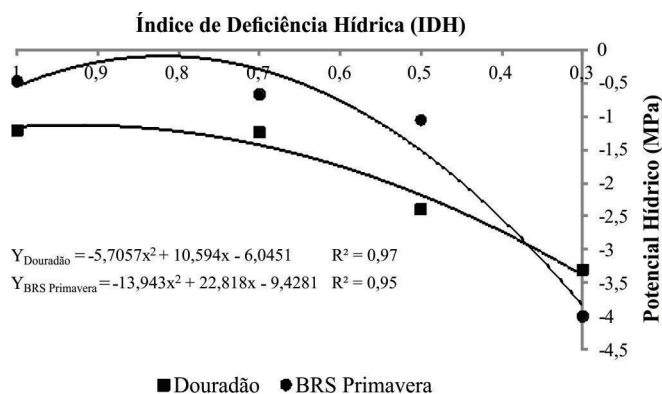


Figura 3. Potencial hídrico foliar (MPa) de plantas de arroz de terras altas, Douradão e BRS Primavera, em função do Índice de Deficiência Hídrica (IDH) imposto no 2º ciclo de deficiência hídrica do segundo ano de experimentação (2011).

Com o objetivo de definir o tratamento hídrico adequado para que as plantas apresentassem respostas moleculares de tolerância à deficiência hídrica, foi utilizado como balizador um tratamento hídrico que induzisse nas plantas um Índice de Produtividade (IP) menor que 0,5, no 2º ciclo de DH (Tabela 2).

Tabela 2. Índice de Produtividade (IP) de plantas de arroz de terras altas, cultivares Douradão e BRS Primavera, submetidas a IDH de, aproximadamente, 0,7; 0,5 e 0,3, em relação ao tratamento controle (IDH = 1,0), média dos dois anos de experimentação.

Genótipos	Ciclo de DH	IDH			
		1,0	0,7	0,5	0,3
Douradão	1º	1,00	0,97	0,86	0,49
	2º	1,00	0,66	0,50	0,11
BRS Primavera	1º	1,00	1,00	0,76	0,51
	2º	1,00	0,72	0,42	0,14

Assim, foi selecionado, para isolamento do RNA total, o tratamento de 70 - 75% de restrição hídrica (IDH ~ 0,3) para Douradão e o tratamento de 50 - 55% de restrição hídrica (IDH ~ 0,5) para BRS Primavera, no 2º ciclo de DH. Para permitir a identificação de transcritos diferencialmente expressos quando as plantas foram submetidas à baixa disponibilidade hídrica, também foram isolados o RNA total do tratamento controle (IDH = 1,0) em ambas cultivares.

De maneira geral, o IP foi menor quando a restrição hídrica foi aplicada na fase reprodutiva (2º Ciclo de DH) do que na fase vegetativa (1º Ciclo de DH), o que de fato era o esperado, dada a maior possibilidade da planta de arroz se recuperar do déficit hídrico na fase inicial de seu desenvolvimento.

Após as extrações, as quantidades de RNA total nas amostras de folha foram 145,6 ng/µl para a cultivar Douradão submetida a um IDH igual a 1,0; 105,2 ng/µl para a cultivar Douradão submetida a um IDH de, aproximadamente, 0,3; 258 ng/µl para a cultivar BRS Primavera submetida a um IDH igual a 1,0; e 374,6 ng/µl para a cultivar BRS Primavera submetida a um IDH de, aproximadamente, 0,5. Enquanto as quantidades de RNA total nas amostras de raízes foram 150 ng/µl para a cultivar Douradão submetida a um IDH igual a 1,0; 125,5 ng/µl para a cultivar Douradão submetida a um IDH de, aproximadamente, 0,3; 100 ng/µl para a cultivar BRS Primavera submetida a um IDH igual a 1,0; e 103 ng/µl para a cultivar BRS Primavera submetida a um IDH de, aproximadamente, 0,5. Considerando o grau de pureza das amostras, baseado nas razões 260/280 nm e 260/230 nm de absorvância em espectrofotômetro, houve variação entre as oito amostras entre 1,89 a 2. Esse padrão obedece às exigências da maioria das empresas de sequenciamento de nova geração, pois esses valores demonstram a falta de contaminantes,

como proteínas e outras moléculas ou sais, que poderiam interferir durante o sequenciamento das amostras. Dessa forma, os tecidos vegetais oriundos dos tratamentos com deficiência hídrica tiveram qualidade suficiente para permitir o isolamento de mRNA de alta qualidade para o sequenciamento, como demonstrado na Figura 4.

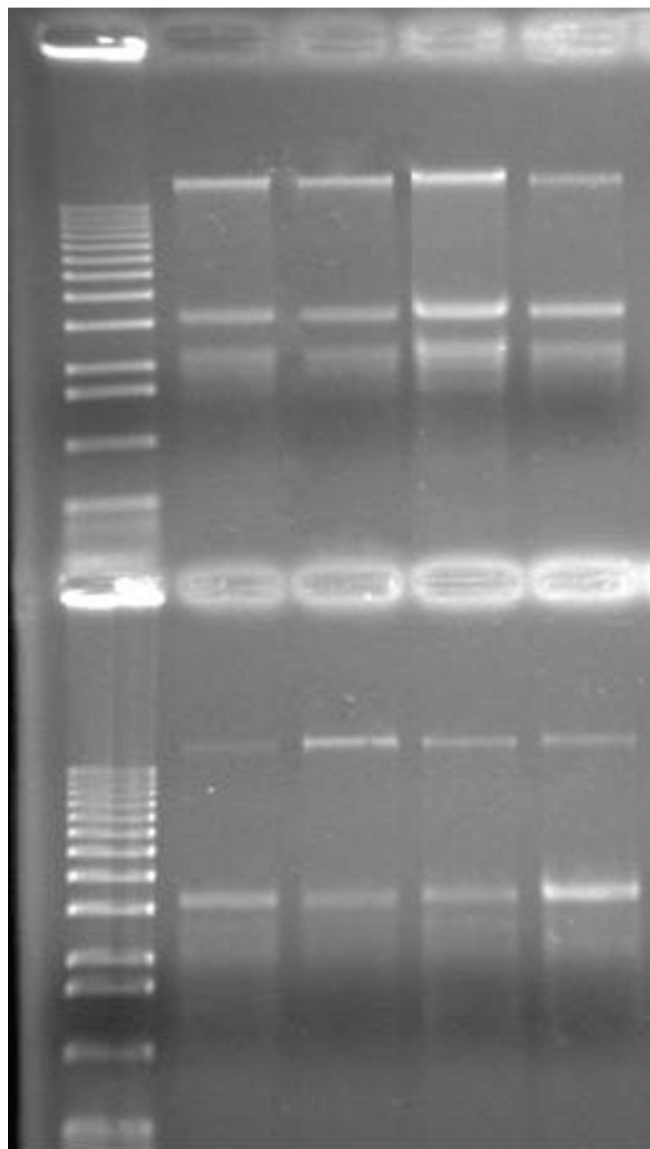


Figura 4. Gel de agarose (1%) de amostras de RNA total de arroz de terras altas: (1) e (2) Douradão, sem restrição hídrica, raiz e folha, respectivamente; (3) e (4) Douradão, restrição hídrica de 70%, raiz e folha, respectivamente; (5) e (6) BRS Primavera, sem restrição hídrica, raiz e folha, respectivamente; (7) e (8) BRS Primavera, restrição hídrica de 50%, raiz e folha, respectivamente. L: Marcador de massa molecular Ladder 100 pb.

Considerações Finais

A condução do protocolo descrito nesse documento permitiu que os comportamentos diferenciais entre

as cultivares de arroz de terras altas, Douradão e BRS Primavera, consideradas tolerante e sensível à deficiência hídrica, respectivamente, fossem observados. A redução do índice de produtividade das plantas desafiadas com baixa disponibilidade de água em relação ao tratamento controle indicou que os mecanismos de resposta, com maior ou menor intensidade, foram acionados em ambas as cultivares. Essa é a condição fundamental para que seja possível, por meio da técnica de RNA-Seq, identificar transcritos diferencialmente expressos entre um genótipo tolerante e outro sensível à deficiência hídrica. Os transcritos identificados podem ser o ponto de partida para o desenvolvimento de marcadores moleculares para uso na seleção assistida durante o desenvolvimento de linhagens-élite mais tolerantes à deficiência hídrica. Adicionalmente, os transcritos identificados podem ser clonados e superexpressos em linhagens elite de arroz através da transformação genética, também resultando no aumento da tolerância à deficiência hídrica.

Referências

CAMPOS, H.; COOPER, M.; HABBEN, J. E.; EDMÉADES, G. O.; SCHUSSLER, J. R. Improving drought tolerance in maize: a view from industry. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 90, n. 1, p. 19-34, Nov. 2004.

COUNCE, P. A.; KEISLING, T. C.; MITCHEL, A. J. A uniform, objective, and adaptive system for expressing rice development. **Crop Science**, Madison, v. 40, n. 2, p. 436-443, Mar./Apr. 2000.

HADIARTO, T.; TRAN, L. P. Progress studies of drought-responsive genes in rice. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 30, n. 3, p. 297-310, Mar. 2011.

MELLO, C. R. de; OLIVEIRA, G. C. de; RESCK, D. V. S.; LIMA, J. M. de; DIAS JÚNIOR, M. de S. Estimativa da capacidade de campo baseada no ponto de inflexão da curva característica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 4, p. 836-841, jul./ago. 2002.

MIR, R. R.; ZAMAN, M.; SREENIVASULU, N.; TRETOWAN, R.; VARSHNEY, R. K. Integrated genomics, physiology and breeding approaches for improving drought tolerance in crops. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 125, n. 4, p. 625-645, Aug. 2012.

SILVA, S. C. da; STEINMETZ, S.; HEINEMANN, A. B. Clima. In: SANTOS, A. B. dos (Ed.). **Árvore do conhecimento: arroz**. Brasília, DF: Embrapa, 2012. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000fe75winu02wx5eo07qw4xe1eq4gwu.html>>. Acesso em: 17 jan. 2012.

Comunicado Técnico, 210



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Arroz e Feijão
Endereço: Rod. GO 462. Km 12, Zona Rural, Caixa Postal 179, 75375-000, Santo Antônio de Goiás, GO
Fone: (62) 3533 2123
Fax: (62) 3533 2100
E-mail: cnpaf.sac@embrapa.br
1ª edição
Versão online (2013)

Comitê de publicações

Presidente: Camilla Souza de Oliveira
Secretário-Executivo: Luiz Roberto R. da Silva
Membros: Flávia Aparecida de Alcântara, Luís Fernando Stone, Ana Lúcia Delalibera de Faria, Heloisa Célis Breseghello, Márcia Gonzaga de Castro Oliveira, Henrique César de Oliveira Ferreira.

Expediente

Supervisão editorial: Camilla Souza de Oliveira
Revisão de texto: Camilla Souza de Oliveira
Normalização bibliográfica: Ana Lúcia D. de Faria
Editoração eletrônica: Fabiano Severino