

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR



**Respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares de laranja doce em
interação com três variedades porta-enxertos contrastantes para
tolerância à seca**

LUANA PEREIRA GONÇALVES

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2014

LUANA PEREIRA GONÇALVES

**Respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares de laranja doce em
interação com três variedades porta-enxertos contrastantes para
tolerância à seca**

Dissertação apresentada à Universidade
Estadual de Santa Cruz como parte das
exigências para obtenção do título de
Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**Área de concentração:
Biotecnologia e Genômica**

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2014

G635

Gonçalves, Luana Pereira.

Respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares de laranja doce em interação com três variedades porta-enxertos contrastantes para tolerância à seca / Luana Pereira Gonçalves. – Ilhéus, BA: UESC, 2014.

xi, 74f. : il.

Orientador: Marcio Gilberto Cardoso Costa.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.
Inclui bibliografia.

1. Cítricos. 2. Plantas – Efeito da seca. 3. Porta-enxertos. 4. Stress oxidativo. 5. Genética vegetal. I. Título.

CDD 634.3

LUANA PEREIRA GONÇALVES

Respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares de laranja doce em interação com três variedades porta-enxertos contrastantes para tolerância à seca

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**Área de concentração:
Biotecnologia e Genômica**

APROVADA:

Dr.^a Raquel Luciana Boscariol-Camargo
Centro APTA Citros Sylvio Moreira – IAC

Dr.^a Aurizangela Oliveira de Sousa
UESC

Dr. Carlos Priminho Pirovani
UESC

Dr. Márcio Gilberto Cardoso Costa
UESC – Orientador

DEDICATÓRIA

A minha formação como profissional não poderia ter sido concretizada sem a ajuda da minha família, que, no decorrer da minha vida, proporcionou-me, além de extenso carinho e amor, os conhecimentos da integridade, da perseverança e de procurar sempre em Deus a força maior para o meu desenvolvimento como ser humano. Por essa razão, gostaria de dedicar e reconhecer a vocês, minha imensa gratidão e sempre amor.

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação marca o fim de uma importante etapa da minha vida. Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram de forma decisiva para a sua concretização.

Inicio meus agradecimentos por DEUS, já que Ele colocou pessoas tão especiais a meu lado, sem as quais certamente não teria dado conta!

Ao Dr. Márcio Costa pela orientação, exemplo de profissionalismo, amizade, respeito e dedicação que sempre teve por mim.

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos, em especial a Cristina Martins, pela grande ajuda durante este projeto. Obrigada meninas pelo carinho, incentivo e dedicação.

A Dr.^a Amanda Mendes, que acreditou em mim no primeiro instante. Obrigada por ter sido amiga, irmã e mãe! Você é iluminada e me orgulho de ter sido orientada por você. Agradeço seu carinho, respeito e amizade.

As Pós-Docs Aurizangela Sousa e Danielle Scotton, sem dúvidas, essenciais para a realização desse trabalho. Obrigada pela ajuda, incentivo, dedicação, amizade, confiança e intensas conversas, explicações, mesmo quando eu não entendia, ainda assim, não desistiram de mim.

Aos membros da banca examinadora Dr.^a Raquel Luciana Boscariol-Camargo, Dr.^a Aurizangela Oliveira de Sousa e Dr. Eduardo Augusto Girardi por terem aceitado participar da avaliação deste trabalho.

Ao Dr. Alex-Alan Furtado e Dr. Carlos Priminho Pirovani pelo auxílio nas análises fisiológicas e importantes considerações durante o trabalho.

A todos os Professores e funcionário do PPGGBM, em especial ao CBG pelo suporte.

A meus pais, Josivaldo e Márcia, meu infinito agradecimento. Obrigada pelas palavras de força, superação e determinação, sem vocês eu nada seria.

À minha família, em especial a minha irmã Lorena e meus avôs Antônia, Marieta e José, por toda dedicação e carinho, por suportar toda a saudade proporcionada pela distância e principalmente por me ensinar a nunca desistir.

Agradeço a Tharisson pela compreensão, pelo amor, carinho e incentivo constantes que foram fonte de energia para vencer desafios. Amo-te!

A Tainã Oliveira (marida) e toda sua família, por me sentir parte dessa família. Inúmeros são os adjetivos pra ti. Obrigada pela sua irmandade. Amo você.

As amigas Diana Matos e Cíntia Santiago por compartilharmos juntas de tantos momentos de felicidade, sincera amizade, pelo bom convívio diário e acima de tudo pelos ensinamentos que levarei para o resto da vida.

Aos amigos que fizeram parte desse momento, sempre ajudando e incentivando, em especial aos colegas de turma 2012.1, Milena Dória, Regina Martins, Ana Camila, Márcia Branco, Ivanildes Santos e Horlei.

Aos velhos amigos, em especial Erivana, Silvana, Soraia, Rafael, Lorena Monique, Mirella, Paulo Henrique e David, que nunca estiveram ausentes, agradeço a amizade e o carinho que sempre me disponibilizaram, amo vocês!

A EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, pela parceria.

A Universidade Estadual de Santa Cruz e o Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização do mestrado.

A CAPES pela concessão da bolsa.

E a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, fez com que esse trabalho pudesse ser realizado, meu muito obrigado.

ÍNDICE

EXTRATO.....	I
ABSTRACT	IV
LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE TABELAS.....	XI
1. INTRODUÇÃO	1
2. HIPÓTESE	3
2.1. OBJETIVOS	3
2.1.1.OBJETIVO GERAL	3
2.1.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1. Aspectos gerais e panorama da citricultura	4
3.2. Porta-enxerto	7
3.3. Deficiência hídrica.....	10
3.4. Respostas dos citros à deficiência hídrica	13
3.5. Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo	14
3.6. Mecanismo Antioxidativo.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1. Material vegetal e condições de cultivo.....	24
4.2. Potencial hídrico foliar (Ψ_w)	26
4.3. Teor relativo de água (TRA) foliar	26
4.4. Estimativa da área foliar total	27
4.5. Parâmetros da curva pressão-volume (PV) em folhas.....	27
4.6. Fluorescência da clorofila a.....	28

4.7. Peróxido de hidrogênio	29
4.8. Atividade de enzimas antioxidantes	29
4.8.1. Atividade da Dismutase do Superóxido (SOD)	30
4.8.2. Atividade da catalase (CAT).....	30
4.8.3. Atividade da Peroxidase do Ascorbato (APX)	30
4.8.4. Atividade da Peroxidase do Guaiacol (GPX).....	31
4.8.5. Atividade da Oxidase do Polifenol (PPO).....	31
4.8.6. Atividade da Fenilalanina Amônia-Liase (PAL)	32
4.9. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	32
4.10. Extração de RNA e Síntese de cDNA	33
4.11. Análise de PCR em tempo real (qRT-PCR)	33
4.12. Análise Estatística	34
5. RESULTADOS.....	36
5.1. Teor relativo de água nas folhas	36
5.2. Taxa de crescimento foliar	37
5.3. Fluorescência da clorofila <i>a</i>	37
5.4. Curva PV	40
5.5. Teste histoquímico (DAB – HCl)	42
5.6. Atividade Enzimática	42
5.6.1. Dismutase do Superóxido	43
5.6.2. Catalase	44
5.6.3. Peroxidase do Ascorbato	45
5.6.4. Peroxidase do Guaiacol	45
5.6.5. Polifenoloxidase	46
5.6.6. Fenilalanina Amônia-Liase	47
5.7. Peroxidação lipídica	48
5.8. Expressão gênica (qRT-PCR).....	49
6. DISCUSSÃO	55
7. CONCLUSÃO	62
8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	63

EXTRATO

GONÇALVES, Luana Pereira, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro de 2014. **Respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares de laranja doce em interação com três variedades porta-enxertos contrastantes para tolerância à seca.** Orientador: Prof. Dr. Márcio Gilberto Cardoso Costa. Co-orientadores: Prof. Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida e Profa. Dra. Amanda Ferreira da Silva Mendes

A citricultura representa um dos setores mais competitivos do agronegócio global, sendo o estresse por deficiência hídrica um dos principais fatores que influenciam negativamente a sua produção. Um desvio significativo das condições ótimas causam mudanças em todos os níveis funcionais do organismo, que são reversíveis, em princípio, podendo tornarem-se permanentes. Essas mudanças incluem o acúmulo de espécies reativas de oxigênio nos tecidos vegetais, promovendo alterações metabólicas consideradas cruciais na resposta aos agentes estressores. Apesar dos estudos ecofisiológicos realizados nos citros sob deficiência hídrica, muito pouco é conhecido sobre as bases bioquímicas e moleculares da resposta e tolerância à seca. Estudos têm demonstrado que o comportamento das plantas cítricas à seca é influenciado, em grande parte, pelo porta-enxerto. Assim, existem diferenças moleculares, bioquímicas e fisiológicas entre os porta-enxertos, constitutivas e/ou induzidas, as quais refletem os diferentes fenótipos para tolerância à seca em citros. O objetivo deste trabalho foi caracterizar as respostas moleculares, bioquímicas e

fisiológicas de laranja-doce induzidas por variedades porta-enxertos contrastantes para tolerância à seca. O experimento foi conduzido em casa de vegetação em um delineamento em blocos casualizado com três repetições por tratamento. Foram utilizadas plantas de 1 ano de idade de laranjeira 'Westin' (*Citrus sinensis* L. Osb.) enxertadas sobre limão 'Cravo' (*C. limonia* Osb.), tangerineira 'Sunki Tropical' (*C. sunki* Hort. Antigo. Tan) e trifoliata 'Flying Dragon' (*Poncirus trifoliata* L.). Estas plantas foram submetidas à deficiência hídrica (DH) progressiva, até suas folhas alcançarem o potencial hídrico de -1,5 a -2,0 MPa. Depois disso, as plantas foram reidratadas. Foram avaliados os efeitos da variedade porta-enxerto e dos diferentes regimes hídricos nos parâmetros de crescimento, fluorescência da clorofila *a* e relações hídricas das plantas cítricas. Também foram avaliados os efeitos da variedade porta-enxerto e do regime hídrico na atividade enzimática e expressão de genes envolvidos no metabolismo antioxidativo. Os danos causados pelo estresse oxidativo foram analisados por meio do ensaio histoquímico com 3,3'-diaminobenzidina (DAB), que detecta peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e por meio de ensaios de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), como um indicador de peroxidação lipídica das membranas. Os resultados obtidos revelaram que o regime hídrico não afetou a taxa de crescimento foliar induzido pelas três variedades porta-enxerto, embora diferenças significativas neste parâmetro fosse observadas dependendo da variedade, com plantas enxertadas sobre 'Cravo' e 'Sunki Tropical' exibindo maiores taxas de crescimento foliar do que 'Flying Dragon'. Os parâmetros de F₀, F_m e F_v/F_m também não diferiram significativamente de acordo com as variedades porta-enxertos e regime hídrico. 'Sunki Tropical' e 'Flying Dragon' induziram ajustamento osmótico e da rigidez das paredes celulares em folhas de plantas submetidas à deficiência hídrica, enquanto que 'Cravo' induziu um ajuste elástico das paredes celulares. Os resultados também demonstraram que plantas enxertadas sobre 'Flying Dragon' acumularam maiores níveis de H₂O₂ e TBARS em suas folhas do que aquelas enxertadas sobre 'Cravo' e 'Sunki Tropical'. Além disso, ao contrário do observado em 'Cravo' e 'Sunki Tropical', os níveis de TBARS não foram reduzidos em 'Flying Dragon' após a reidratação das plantas. Esses dados corroboram com aqueles da atividade

de enzimas envolvidas na resposta antioxidativa em nível foliar, com 'Flying Dragon' exibindo maior atividade de SOD e GPX do que 'Cravo' e 'Sunki Tropical'. Uma indução da expressão gênica de SOD foi observada em folhas de plantas enxertadas sobre 'Cravo' e 'Flying Dragon' expostas à deficiência hídrica, enquanto que a expressão de GPX foi induzida em folhas de plantas sob deficiência hídrica, independente da variedade porta-enxerto utilizada. Coletivamente, os resultados sugerem que ajustes osmótico e da rigidez das paredes celulares operam como mecanismos de adaptação à seca em plantas sobre 'Sunki Tropical' e 'Flying Dragon', enquanto que aquelas sobre 'Cravo' utilizam como estratégia o ajuste elástico dos tecidos sob condições de deficiência hídrica. 'Cravo' e 'Sunki Tropical' também possuem um sistema antioxidante mais eficiente, apresentando menores atividades de SOD e maiores atividades de CAT em comparação com 'Flying Dragon'.

Palavras-chave: Citros, estresse hídrico, mecanismo oxidativo, ajuste osmótico.

ABSTRACT

GONÇALVES, Luana Pereira, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, February 2014. **Physiological, biochemical and molecular responses of sweet orange varieties in interaction with three rootstock varieties of contrasting drought tolerance.** Advisor: Prof. Dr. Márcio Gilberto Cardoso Costa. Committee Members: Prof. Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida and Prof. Dr. Amanda Ferreira da Silva Mendes

The citrus industry is one of the most competitive sectors of the global agribusiness, and drought stress is one of the main factors that negatively influence their production. A significant deviation from optimum conditions causes changes in all functional levels of the organisms, which are reversible in principle, but may become permanent. These changes include the accumulation of reactive oxygen species in plant tissues, promoting metabolic changes considered crucial in response to the stressors. Despite of the ecophysiological studies in citrus under water stress, very little is known about the biochemical and molecular basis of its response and tolerance to drought. Studies have shown that the behavior of citrus plants under drought stress is influenced largely by the rootstock. Thus, there are molecular, biochemical and physiological differences among rootstocks, constitutive and / or induced, which reflect the different phenotypes for drought tolerance in citrus. The objective of this study was to characterize the molecular, biochemical and physiological responses of sweet orange varieties as induced by rootstock varieties of contrasting drought tolerance. The experiment was conducted in a

greenhouse in a complete randomized block design with three replications per treatment. One-year-old plants of 'Westin' sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osb.) grafted on to 'Cravo' rangpur lime (*C. limonia* Osb.), 'Sunki Tropical' mandarin (*C. sunki* Hort. Antigo. Tan) and 'Flying Dragon' trifoliolate (*Poncirus trifoliata* L.) were used in the present study. These plants were subjected to a progressive soil water deficit (WD), until their leaves reach the water potential between -1.5 to -2.0 MPa. Thereafter, the plants were rehydrated. The effects of rootstock varieties and water regimes on growth parameters, chlorophyll fluorescence and water relations of sweet orange were evaluated. The effects of rootstock variety and water regimes on enzymatic activities and expression of genes involved in antioxidant metabolism were also evaluated. Oxidative stress was analyzed by histochemical assay with 3,3'-diaminobenzidine (DAB), which detects hydrogen peroxide (H_2O_2), and by evaluation of thiobarbituric acid-reacting substances (TBARS), as an indicator of lipid peroxidation of membranes. The results revealed that the water regime did not affect the leaf growth rate of sweet orange, irrespective of rootstock variety. However, significant differences in this parameter were observed depending on the rootstock, with plants grafted on to 'Cravo' and 'Tropical Sunki' showing higher rates of leaf growth than those grafted onto 'Flying Dragon'. F_0 , F_m and F_v/F_m parameters also did not differ according to the rootstock variety and water regime. 'Sunki Tropical' and 'Flying Dragon' rootstocks induced osmotic adjustment and cell wall rigidity in leaves of sweet orange exposed to water deficit, while 'Cravo' induced an elastic adjustment. The results also demonstrated that plants grafted onto 'Flying Dragon' accumulated higher levels of H_2O_2 and TBARS in their leaves than those grafted on to 'Cravo' and 'Sunki Tropical'. Besides, TBARS levels were not reduced in 'Flying Dragon'-grafted plants, as observed for 'Cravo'- and 'Sunki Tropical'-grafted plants, even after rehydration. These data corroborated with those of the activity of enzymes involved in the antioxidant metabolism, with 'Flying Dragon'-grafted plants showing increased SOD and GPX activity in leaves than 'Cravo'- and 'Sunki Tropical'-grafted plants. SOD expression was up-regulated in leaves of 'Cravo'- and 'Flying Dragon'-grafted plants exposed to water deficit, whereas an up-regulation of GPX expression was observed in leaves of plants under water deficit, irrespective of the

rootstock variety. Collectively, the results suggest that osmotic adjustment and cell wall rigidity function as mechanisms of adaptation to drought in 'Sunki Tropical'- and 'Flying Dragon'-grafted sweet orange plants, while 'Cravo'-grafted plants use as a strategy the increase of tissue elasticity (elastic adjustment) under water deficit conditions. 'Cravo' and 'Sunki Tropical' also have a more efficient antioxidante system, showing a decreased SOD activity and an increased CAT activity as compared with 'Flying Dragon'.

Keywords: Citrus, water stress, oxidative mechanism, osmotic adjustment.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: O ESTRESSE OXIDATIVO RESULTA DO DESEQUILÍBRIO ENTRE OS NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) E ANTIOXIDANTES (AOX). SOB CIRCUNSTÂNCIAS NORMAIS, AS CÉLULAS SÃO CAPAZES DE EQUILIBRAR A PRODUÇÃO DE OXIDANTES E ANTIOXIDANTES, RESULTANDO EM EQUILÍBRIO REDOX. O ESTRESSE OXIDATIVO OCORRE QUANDO AS CÉLULAS SÃO SUBMETIDAS A NÍVEIS EXCESSIVOS DE ROS, OU COMO RESULTADO DE REDUÇÃO DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES (ADAPTADO DE SCANDALIO, 2005). 16
- FIGURA 2: GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) EM PLANTAS. A ATIVAÇÃO DE O_2 OCORRE POR DOIS MECANISMOS DIFERENTES. REDUÇÃO MONOVALENTE GRADUAL DE O_2 LEVANDO A FORMAÇÃO DE $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , E $\cdot OH$, ENQUANTO A TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA PARA O_2 LEVA À FORMAÇÃO DE 1O_2 . $O_2^{\cdot-}$ É FACILMENTE DISMUTADO PELA ENZIMA DISMUTASE DO SUPERÓXIDO (SOD) E CONVERTIDO EM H_2O_2 . H_2O_2 É CATALISADO EM H_2O PELAS ENZIMAS CATALASE (CAT), PEROXIDASE DO GUAICOL (GPX) E PEROXIDASE DO ASCORBATO (APX) (ADAPTADO DE SHARMA ET AL., 2012). 17
- FIGURA 3: MECANISMOS ENZIMÁTICOS DE ELIMINAÇÃO DE ROS: (A) CICLO DA PEROXIDASE DO ASCORBATO (APX) (B) DISMUTASE DO SUPERÓXIDO (SOD). (C) CATALASE (CAT). (D) CICLO DA PEROXIDASE DO GUAICOL (GPX). (ADAPTADO DE GRATÃO ET AL. 2005). 19
- FIGURA 4: ESQUEMA DAS ROTAS DE PRODUÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS: ROTA DO ÁCIDO CHIQUÍMICO E ÁCIDO MEVALÔNICO. (ADAPTADO DE TIVERON, 2010). 23
- FIGURA 5: PLANTAS DE LARANJEIRA 'WESTIN' ENXERTADAS EM LIMÃO 'CRAVO', TANGERINEIRA 'SUNKI TROPICAL' E TRIFOLIATA 'FLYING DRAGON' MANTIDAS EM CASA DE VEGETAÇÃO, PARA A IMPLEMENTAÇÃO DO EXPERIMENTO DE DEFICIÊNCIA HÍDRICA.. 24
- FIGURA 6: TRANSPLANTIO (A) E RESTABELECIMENTO (B) DOS PORTA-ENXERTOS LIMÃO 'CRAVO', TANGERINEIRA 'SUNKI TROPICAL' E TRIFOLIATA 'FLYING DRAGON'. AS PLANTAS FORAM RETIRADAS DOS SACOS PLÁSTICOS. APÓS A RETIRADA DE TODO O SUBSTRATO, COM CUIDADO PARA NÃO DESTRUIR A RAIZ, AS PLANTAS FORAM PLANTADAS EM VASOS DE 45 L. AS PLANTAS FORAM IRRIGADAS ATÉ A SATURAÇÃO DO SOLO. 25
- FIGURA 7: PLANTAS DE LARANJA 'WESTIN' ENXERTADAS LIMÃO 'CRAVO', TANGERINEIRA 'SUNKI TROPICAL' E TRIFOLIATA 'FLYING DRAGON' PRONTAS PARA O INÍCIO DO EXPERIMENTO (A). OS VASOS FORAM COBERTOS COM PAPEL ALUMÍNIO PARA QUE A PERDA DE ÁGUA FOSSE ESSENCIALMENTE PELA FOLHA (B)..... 26
- FIGURA 8: FOLHAS DESTACADAS DE LARANJEIRA 'WESTIN' ENXERTADAS EM LIMÃO 'CRAVO', TANGERINEIRA 'SUNKI TROPICAL' E TRIFOLIATA 'FLYING DRAGON' FORAM COLETADAS E ESTIMADAS O SEU POTENCIAL HÍDRICO, ATRAVÉS DA BOMBA DE SCHOLANDER. AS FOLHAS APRESENTARAM UM POTENCIAL HÍDRICO FOLIAR INICIAL DE -0,1 À -0,5 MPA E FINAL DE -3,5 À -4,0 MPA. 28
- FIGURA 9: TEOR RELATIVO DE ÁGUA EM FOLHAS DE PLANTAS CONTROLE (IRRIGADA) E SOB DEFICIÊNCIA HÍDRICA (DH) DE LIMÃO 'CRAVO', TANGERINEIRA 'SUNKI TROPICAL' E TRIFOLIATA

'FLYING DRAGON' DURANTE O PERÍODO DO EXPERIMENTO. MÉDIAS SEGUIDAS POR LETRAS MAIÚSCULAS DIFERENTES, PARA CADA GENÓTIPO, APRESENTAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS PELO TESTE DE TUKEY ($P \leq 0,05$). ASSIM COMO MÉDIAS SEGUIDAS POR LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES, PARA CADA TRATAMENTO, APRESENTAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS PELO TESTE DE TUKEY ($P \leq 0,05$).....	36
FIGURA 10: ESTIMATIVA DA ÁREA FOLIAR TOTAL DE PLANTAS CONTROLE E SOB DEFICIÊNCIA HÍDRICA (DH) DE LIMÃO 'CRAVO', TANGERINEIRA 'SUNKI TROPICAL' E TRIFOLIATA 'FLYING DRAGON' DURANTE O PERÍODO DO EXPERIMENTO. MÉDIAS SEGUIDAS POR ASTERISCO (*) PARA CADA GENÓTIPO APRESENTAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS PELO TESTE T DE STUDENT ($P \leq 0,05$). 37	
FIGURA 11: ACÚMULO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM DISCOS FOLIARES DE FOLHAS DE LARANJEIRA 'WESTIN' ENXERTADAS EM LIMÃO 'CRAVO', TANGERINEIRA 'SUNKI TROPICAL' E TRIFOLIATA 'FLYING DRAGON' DE PLANTAS CONTROLE E SOB DEFICIÊNCIA HÍDRICA, INCUBADO COM DAB-HCL (1 MG ML^{-1}).....	42
FIGURA 12: ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SOD ESTIMADA EM FOLHAS DE LARANJEIRA 'WESTIN' ENXERTADAS EM LIMÃO 'CRAVO', TANGERINEIRA 'SUNKI TROPICAL' E TRIFOLIATA 'FLYING DRAGON' NOS DIFERENTES REGIMES HÍDRICOS. MÉDIAS SEGUIDAS POR ASTERISCO (*) PARA CADA GENÓTIPO APRESENTAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS PELO TESTE T DE STUDENT (* - $P \leq 0,05$; ** - $P \leq 0,01$ E *** - $P \leq 0,001$) EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO CONTROLE DA VARIEDADE LIMÃO 'CRAVO'.....	43
FIGURA 13: ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CAT ESTIMADA EM FOLHAS DE LARANJEIRA 'WESTIN' ENXERTADAS EM LIMÃO 'CRAVO', TANGERINEIRA 'SUNKI TROPICAL' E TRIFOLIATA 'FLYING DRAGON' NOS DIFERENTES REGIMES HÍDRICOS. MÉDIAS SEGUIDAS POR ASTERISCO (*) PARA CADA GENÓTIPO APRESENTAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS PELO TESTE T DE STUDENT (* - $P \leq 0,05$; ** - $P \leq 0,01$ E *** - $P \leq 0,001$) EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO CONTROLE DA VARIEDADE LIMÃO 'CRAVO'.....	44
FIGURA 14: ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA APX ESTIMADA EM FOLHAS DE LARANJEIRA 'WESTIN' ENXERTADAS EM LIMÃO 'CRAVO', TANGERINEIRA 'SUNKI TROPICAL' E TRIFOLIATA 'FLYING DRAGON' NOS DIFERENTES REGIMES HÍDRICOS. MÉDIAS SEGUIDAS POR ASTERISCO (*) PARA CADA GENÓTIPO APRESENTAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS PELO TESTE T DE STUDENT (* - $P \leq 0,05$; ** - $P \leq 0,01$ E *** - $P \leq 0,001$) EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO CONTROLE DA VARIEDADE LIMÃO 'CRAVO'.....	45
FIGURA 15: ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GPX ESTIMADA EM FOLHAS DE LARANJEIRA 'WESTIN' ENXERTADAS EM LIMÃO 'CRAVO', TANGERINEIRA 'SUNKI TROPICAL' E TRIFOLIATA 'FLYING DRAGON' NOS DIFERENTES REGIMES HÍDRICOS. MÉDIAS SEGUIDAS POR ASTERISCO (*) PARA CADA GENÓTIPO APRESENTAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS PELO TESTE T DE STUDENT (* - $P \leq 0,05$; ** - $P \leq 0,01$ E *** - $P \leq 0,001$) EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO CONTROLE DA VARIEDADE LIMÃO 'CRAVO'.....	46
FIGURA 16: ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA PPO ESTIMADA EM FOLHAS DE LARANJEIRA 'WESTIN' ENXERTADAS EM LIMÃO 'CRAVO', TANGERINEIRA 'SUNKI TROPICAL' E TRIFOLIATA 'FLYING DRAGON' NOS DIFERENTES REGIMES HÍDRICOS. MÉDIAS SEGUIDAS POR ASTERISCO (*) PARA	

CADA GENÓTIPO APRESENTAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS PELO TESTE T DE STUDENT (* - $P \leq 0,05$; ** - $P \leq 0,01$ E *** - $P \leq 0,001$) EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO CONTROLE DA VARIEDADE LIMÃO 'CRAVO'	47
FIGURA 17: ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA PAL ESTIMADA EM FOLHAS DE LARANJEIRA 'WESTIN' ENXERTADAS EM LIMÃO 'CRAVO', TANGERINEIRA 'SUNKI TROPICAL' E TRIFOLIATA 'FLYING DRAGON' NOS DIFERENTES REGIMES HÍDRICOS. MÉDIAS SEGUIDAS POR ASTERISCO (*) PARA CADA GENÓTIPO APRESENTAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS PELO TESTE T DE STUDENT (* - $P \leq 0,05$; ** - $P \leq 0,01$ E *** - $P \leq 0,001$) EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO CONTROLE DA VARIEDADE LIMÃO 'CRAVO'	48
FIGURA 18: CONTEÚDO DE TBARS EM FOLHAS DE LARANJEIRA 'WESTIN' ENXERTADAS EM LIMÃO 'CRAVO', TANGERINEIRA 'SUNKI TROPICAL' E TRIFOLIATA 'FLYING DRAGON' NOS DIFERENTES REGIMES HÍDRICOS. LETRAS MAIÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS EM $P \leq 0,05$ (TESTE DE TUKEY) PARA MESMA VARIEDADE NOS DIFERENTES TRATAMENTOS. LETRAS MINÚSCULAS IGUAIS PARA MESMO TRATAMENTO E NAS DIFERENTES VARIEDADES NÃO INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS PARA O TESTE DE TUKEY A 5%.	49
FIGURA 19: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE <i>SOD</i> EM FOLHAS DE LARANJEIRA 'WESTIN' ENXERTADAS EM LIMÃO 'CRAVO', TANGERINEIRA 'SUNKI TROPICAL' E TRIFOLIATA 'FLYING DRAGON' SOB DIFERENTES REGIMES HÍDRICOS. OS PERFIS DE EXPRESSÃO FORAM DETERMINADOS POR qPCR. OS NÍVEIS DE EXPRESSÃO FORAM NORMALIZADOS AO VALOR CORRESPONDENTE DA EXPRESSÃO DO GENE <i>GAPC2</i> . OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA \pm EP (ERRO PADRÃO) DE TRÊS RÉPLICAS EXPERIMENTAIS. ASTERISCO (*) INDICA DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ($P \leq 0,05$) EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO CONTROLE DA VARIEDADE 'CRAVO' PELO TESTE T DE STUDENT.....	50
FIGURA 20: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE <i>CAT</i> EM FOLHAS DE LARANJEIRA 'WESTIN' ENXERTADAS EM LIMÃO 'CRAVO', TANGERINEIRA 'SUNKI TROPICAL' E TRIFOLIATA 'FLYING DRAGON' SOB DIFERENTES REGIMES HÍDRICOS. OS PERFIS DE EXPRESSÃO FORAM DETERMINADOS POR qPCR. OS NÍVEIS DE EXPRESSÃO FORAM NORMALIZADOS AO VALOR CORRESPONDENTE DA EXPRESSÃO DO GENE <i>GAPC2</i> . OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA \pm EP (ERRO PADRÃO) DE TRÊS RÉPLICAS EXPERIMENTAIS. ASTERISCO (*) INDICA DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ($P \leq 0,05$) EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO CONTROLE DA VARIEDADE 'CRAVO' PELO TESTE T DE STUDENT.....	51
FIGURA 21: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE <i>APX</i> EM FOLHAS DE LARANJEIRA 'WESTIN' ENXERTADAS EM LIMÃO 'CRAVO', TANGERINEIRA 'SUNKI TROPICAL' E TRIFOLIATA 'FLYING DRAGON' SOB DIFERENTES REGIMES HÍDRICOS. OS PERFIS DE EXPRESSÃO FORAM DETERMINADOS POR qPCR. OS NÍVEIS DE EXPRESSÃO FORAM NORMALIZADOS AO VALOR CORRESPONDENTE DA EXPRESSÃO DO GENE <i>GAPC2</i> . OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA \pm EP (ERRO PADRÃO) DE TRÊS RÉPLICAS EXPERIMENTAIS. ASTERISCO (*) INDICA DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ($P \leq 0,05$) EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO CONTROLE DA VARIEDADE 'CRAVO' PELO TESTE T DE STUDENT.....	52

FIGURA 22: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE *GPX* EM FOLHAS DE LARANJEIRA 'WESTIN' ENXERTADAS EM LIMÃO 'CRAVO', TANGERINEIRA 'SUNKI TROPICAL' E TRIFOLIATA 'FLYING DRAGON' SOB DIFERENTES REGIMES HÍDRICOS. OS PERFIS DE EXPRESSÃO FORAM DETERMINADOS POR qPCR. OS NÍVEIS DE EXPRESSÃO FORAM NORMALIZADOS AO VALOR CORRESPONDENTE DA EXPRESSÃO DO GENE *GAPC2*. OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA ± EP (ERRO PADRÃO) DE TRÊS RÉPLICAS EXPERIMENTAIS. ASTERISCO (*) INDICA DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ($p \leq 0,05$) EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO CONTROLE DA VARIEDADE 'CRAVO' PELO TESTE T DE STUDENT..... 53

FIGURA 23: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE *PPO* EM FOLHAS DE FOLHAS DE LARANJEIRA 'WESTIN' ENXERTADAS EM LIMÃO 'CRAVO', TANGERINEIRA 'SUNKI TROPICAL' E TRIFOLIATA 'FLYING DRAGON' SOB DIFERENTES REGIMES HÍDRICOS. OS PERFIS DE EXPRESSÃO FORAM DETERMINADOS POR qRT-PCR. OS NÍVEIS DE EXPRESSÃO FORAM NORMALIZADOS AO VALOR CORRESPONDENTE DA EXPRESSÃO DO GENE *GAPC2*. OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA ± SE (ERRO PADRÃO) DE TRÊS RÉPLICAS EXPERIMENTAIS. ASTERISCO(*) INDICA DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ($p \leq 0,05$) EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO CONTROLE DE CADA VARIEDADE PELO TESTE DE T DE STUDENT. 53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: DISTRIBUIÇÃO DA PRODUÇÃO BRASILEIRA DE FRUTAS CÍTRICAS (IBGE, 2013).....	6
TABELA 2: OLIGONUCLEOTÍDEOS EMPREGADOS NAS ANÁLISES DE qRT-PCR.	34
TABELA 3: EFEITOS DOS DIFERENTES REGIMES HÍDRICOS NA FLUORESCÊNCIA CLOROFILA A DE FOLHAS DE LARANJEIRA 'WESTIN' ENXERTADAS EM LIMÃO 'CRAVO', TANGERINEIRA 'SUNKI TROPICAL' E TRIFOLIATA 'FLYING DRAGON'. OS VALORES SÃO AS MÉDIAS DE F_0 (FLUORESCÊNCIA MÍNIMA), F_M (FLUORESCÊNCIA MÁXIMA) E F_v/F_M (EFICIÊNCIA MÁXIMA DO FOTOSISTEMA II).....	39
TABELA 4: MÉDIA DO TEOR RELATIVO DE ÁGUA NO PONTO DE PERDA DE TURGOR (RWC^{TLP}), POTENCIAL OSMÓTICO EM PLENA TURGESCÊNCIA (Ψ_0), POTENCIAL OSMÓTICO NO PONTO DE PERDA DE TURGOR (Ψ^{TLP}), MÓDULO DE ELASTICIDADE (E) E AJUSTE OSMÓTICO (AO) EM FOLHAS DE LARANJEIRA 'WESTIN' ENXERTADAS EM LIMÃO 'CRAVO', TANGERINEIRA 'SUNKI TROPICAL' E TRIFOLIATA 'FLYING DRAGON' SUBMETIDOS À DIFERENTES REGIMES HÍDRICOS (N=3). VARIEDADE (V) E REGIME HÍDRICO (RH).	41

1. INTRODUÇÃO

Os citros se destacam como uma das principais fruteiras do mundo, com grande importância econômica, social e cultural em nossa sociedade. No cenário internacional o Brasil se destaca como um dos maiores produtores de laranja doce, respondendo por 37,3% da produção mundial (USDA, 2013), sendo também o maior exportador de suco de laranja. O estado de São Paulo representa 72,3% da produção brasileira e o Nordeste inclui o segundo e o terceiro maiores produtores nacional de citros, Bahia e Sergipe, respectivamente, com a produção conjunta estimada em 10%. A Bahia contribui com 52,5% da produção total desta fruta no Nordeste (IBGE, 2013).

A propagação comercial dos citros é realizada principalmente pela técnica de enxertia, que apresenta diversas vantagens (Citrolima, 2013). O porta-enxerto exerce influência direta sobre as copas na adaptação a diferentes condições de clima e solo, tolerância a doenças virais e na produção e qualidade da fruta (Bravo e Gallardo, 1994a), tornando-se fundamental no êxito da atividade citrícola (Auler et al. 2008).

O limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck) representa a principal variedade porta-enxerto utilizada na citricultura brasileira, principalmente devido as suas diversas características vantajosas, incluindo a indução de alta produtividade e precocidade de produção das copas, tolerância à seca e à tristeza dos citros (CTV), facilidade de obtenção de sementes e compatibilidade adequada com a maioria das variedades copas (Pompeu Junior, 2005). Os mecanismos pelos quais o limão Cravo se adapta melhor à deficiência hídrica, porém, são poucos conhecidos.

A susceptibilidade do limãoCravo à Morte Súbita dos Citros (MSC) vem gerando reduções expressivas na produção de frutos, fazendo necessário uma diversificação dos porta-enxertos empregados na citricultura brasileira (Cantagallo et al., 2005). Entretanto, os demais porta-enxertos alternativos ao limão Cravo, como tangerineira Cleópatra, citrumelo Swingle, trifoliata e a tangerineira Sunki, apresentam certas limitações, incluindo a incompatibilidade com algumas variedades copa, início de produção tardio e, sobretudo, a suscetibilidade à seca (Pompeu Junior, 2005). Para que ocorra diversificação na utilização de outros porta-enxertos, a tolerância à seca é um dos mais importantes pré-requisitos, já que predomina o cultivo dos citros sem irrigação no Brasil, em regiões que sofrem a incidência de períodos de déficits hídricos temporários (Ortolani et al., 1991).

Variedades copas em diferentes combinações de porta-enxertos nos citros apresentam comportamentos distintos frente à deficiência hídrica. Esse fenômeno ocorre porque os porta-enxertos induzem alterações nas relações hídricas, taxa de assimilação de CO₂, transpiração e eficiência no uso da água das plantas (Medina et al., 2005).

Dessa forma, o presente estudo buscou verificar os efeitos do porta-enxerto na resposta de laranjeira doce à deficiência hídrica, empregando-se abordagens moleculares, bioquímicas e fisiológicas. Os resultados obtidos fornecem subsídios para um melhor entendimento dos mecanismos de adaptação à deficiência hídrica conferidos pelo porta-enxerto.

2. HIPÓTESE

A interação copa e porta-enxerto induz alterações moleculares, bioquímicas e fisiológicas que afetam o metabolismo das plantas cítricas e suas consequentes respostas e adaptação à deficiência hídrica.

2.1. OBJETIVOS

2.1.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar as respostas moleculares, bioquímicas e fisiológicas de laranja-doce na interação com variedades porta-enxertos contrastantes para tolerância à seca.

2.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

i. Submeter plantas de laranja doce, em combinação com variedades porta-enxerto contrastantes para tolerância à seca, a diferentes regimes hídricos;

ii. Avaliar os efeitos dos diferentes regimes hídricos e variedades porta-enxerto nos parâmetros de crescimento, fluorescência da clorofila *a* e relações hídricas das plantas cítricas;

iii. Analisar os efeitos dos diferentes regimes hídricos e variedades porta-enxerto na atividade enzimática e expressão de genes envolvidos no metabolismo antioxidativo.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Aspectos gerais e panorama da citricultura

Pertencente à família Rutaceae, o gênero *Citrus*, do ponto de vista comercial, destaca-se como um dos mais importantes. O gênero pertence a subfamília Aurantioideae e tribo Citreae, sendo composta por três subtribos. A subtribo Citrinae apresenta 13 gêneros e 65 espécies, contendo os principais gêneros de interesse comercial, tais como *Poncirus*, *Fortunella* e *Citrus* (Swingle; Reece, 1967). Incluem espécies alógamas e autogamas, sexualmente compatíveis, altamente heterozigotas e diplóides, com 18 cromossomos nas células somáticas ($2n = 18$) (Cameron; Frost, 1968; Passos et al., 2005).

As laranjas doces (*Citrus sinensis* (L) Osbeck) são originárias de regiões úmidas tropicais e subtropicais no sudeste do continente asiático, tendo sido introduzidas no Brasil por volta do período colonial (Figueiredo, 1991; Lorenzi et al., 2006). Apresentando condições climáticas favoráveis, o cultivo das plantas cítricas apresentou rápida disseminação pelo país, desenvolvendo-se bem e atingindo altos níveis de produção (Moreira; Moreira, 1991), expandindo-se por todo o território nacional (Neves et al., 2010). Dependendo da época da colheita, as variedades podem ser consideradas como de maturação precoce (março a junho), de meia estação (maio a agosto) ou tardia (julho a dezembro) (Duenhas et al., 2002).

As laranjas doces estão subdivididas em quatro grupos de acordo com suas características: comum ('Pêra', 'Valência', 'Natal' e 'Hamlin'), mais utilizada para consumo (fruta fresca) quanto para a indústria, as de umbigo ('Baia', 'Baianinha'), sanguíneas ('Sanguínea') e de baixa acidez ('Lima', 'Piralima' e 'Serra' 'D'água'), sendo esse cultivares originados de mutações somáticas (Mourão Filho et al., 2008). Basicamente, a citricultura divide-se na produção de fruta para consumo in natura ou para produção de suco, existindo também outros produtos derivados das frutas que estão se destacando no setor, como é o caso dos óleos essenciais (Zulian et al., 2013).

Segundo Neves et al. (2010), desde quando as primeiras exportações começaram, a partir de 1962, a citricultura veio contribuindo de forma definitiva para o desenvolvimento do Brasil. Durante esse período, o setor arrecadou US\$ 60 bilhões em exportações e só em 2010, mais de US\$ 2 bilhões. De acordo com a mesma fonte, no Brasil, em 2010, a citricultura gerou, entre empregos diretos e indiretos, um contingente de 230 mil posições, e uma massa salarial anual de R\$ 676 milhões. Portanto, o grande avanço da citricultura brasileira levou o sistema agroindustrial a abarcar diferentes segmentos como de insumos, produção, indústria processadora e "packing houses", distribuição e consumo (Neves; Jank, 2006).

O mercado brasileiro é bastante promissor e cada vez mais exige uma maior variedade e qualidade na produção. Nas últimas décadas, a laranja e as demais culturas cítricas vem se destacando tanto em volume de produção, como em área plantada. O Brasil é o maior produtor mundial de laranja, com participação de 37,3% na produção mundial, seguido pelos EUA, com 15,9%. No contexto mundial, mesmo sendo cultivado em vários países, Brasil, Estados Unidos e China detêm cerca de 66% da produção mundial de citros (FAO, 2012). O Brasil apresenta cerca de 800 mil hectares de área plantada, que correspondeu a 40% da área cultivada com fruticultura no país na safra 2012/2013 (IBGE/LSPA Setembro/2013). A produção de laranjas doces representa cerca de 90% do total da produção nacional de citros (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição da produção brasileira de frutas cítricas (IBGE, 2013)

Posição	Variedade	Participação (%)
1º	Laranja doce	90,3
2º	Lima ácida e Limão	5,1
3º	Tangerinas	4,6

O sistema agroindustrial cítrico brasileiro é principalmente representado pela região Sudeste, tendo São Paulo como o estado que mais produz, em torno de 72% da produção nacional de laranja (IBGE, 2013). Em segundo lugar encontra-se a região Nordeste, sendo o estado da Bahia responsável por 6% da produção. Em seguida os estados do Paraná (5,7%), Minas Gerais (5,2%), Sergipe (3,8%) e Rio Grande do Sul (2,3%) (IBGE, 2013).

Embora a citricultura nacional apresente um alto poder de competição em nível mundial, há limitações. Quando a citricultura brasileira alcançou alto impacto comercial, iniciou-se o uso da técnica de plantas enxertadas. De acordo com FUNDECITRUS (2013), 80% das plantas cítricas plantadas no estado de São Paulo estão enxertadas sobre um único porta-enxerto, o limão 'Cravo'. A pouca combinação copa/porta-enxerto torna a citricultura vulnerável, já que surtos de pragas e doenças vêm surgindo ao longo dos anos (Schinor et al., 2006).

Huanglongbing (HLB – ex-Greening) é a doença mais importante e destrutiva da citricultura mundial (J.Belasque Junior et al., 2009), sendo considerada como uma das causas da redução do parque industrial cítrico em diversos países (Bové, 2008). Os primeiros sintomas de HLB foram observados em Março de 2004 no estado de São Paulo. O HLB é caracterizado pela presença da bactéria *Candidatus Liberibacter spp.*, que é transmitida para a planta, pelo psíldeo (*Diaphorina Citri*), inseto presente nos pomares brasileiros desde a década de 40 (FUNDECITRUS, 2013).

Além disso, outro agravante causador de importantes perdas econômicas em pomares está relacionada ao estresse abiótico, sendo o estresse por seca o mais importante, já que diminui o crescimento vegetativo, provoca abortamento de frutos jovens e reduz o desenvolvimento e a

qualidade dos frutos (Pérez-Pérez et al., 2009; Rodríguez-Gamir et al., 2010). Diante disso, a diversificação de porta-enxertos que incluam características de tolerância à seca terá um efeito direto na qualidade dos frutos e produtividade.

3.2. Porta-enxerto

Durante a trajetória da citricultura brasileira, a utilização de porta-enxertos se destaca como um grande fator influenciador de produção e crescimento das plantas (Donato et al., 2007). O processo de enxertia permite a união de dois materiais vegetais geneticamente distintos, que trazem consigo suas próprias características, levando a um ganho no desempenho da copa em função da eficiência do porta-enxerto utilizado, formando uma nova planta produtiva e com maior longevidade. Essa compatibilidade é fundamental para o sucesso de um pomar comercial ao longo do tempo (Carlos et al., 1997).

Modificações como desenvolvimento, maturação e peso dos frutos, produção, teores de açúcares, síntese e utilização de nutrientes, transpiração, tolerância e/ou resistência a fatores bióticos ou abióticos são influenciadas pelo porta-enxerto. Já a copa apresenta influências menos visíveis sobre o porta-enxerto, mas ocorrendo no desenvolvimento das raízes e na tolerância, como exemplo frio, seca, pragas e doenças (Pompeu Junior, 2005).

Após a expansão comercial da citricultura nacional, tendo a enxertia a principal forma de propagação, a cadeia citrícola enfrentou sérios problemas. A laranjeira 'Caipira' (*C. sinensis*) foi o primeiro porta-enxerto utilizado, mas sua baixa resistência à gomose de *Phytophthora* spp. associada à sua baixa tolerância à seca, motivou sua substituição pela laranjeira 'Azeda' (*C. aurantium*), sendo o principal porta-enxerto na década de 1940. A limeira da 'Pérsia' (*C. limettioides*), limão 'Cravo' (*C. limonia*), laranjeira 'Caipira' e limão 'Rugoso' (*Citrus jambhiri* Lush.) completaram o suporte citrícola da época (Pompeu Junior, 2001). Com a chegada do vírus da tristeza dos citros (CTV) na região, sua disseminação, por borbulha e pulgão preto, causou a morte

das plantas enxertadas em laranjeira 'Azeda' e limeira da 'Pérsia', intolerantes ao vírus (Calixto, 2003; Pompeu Junior, 2005).

De acordo com Pompeu Junior (2005), experimentos conduzidos na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) e no Instituto Agronômico de Campinas (IAC) mostraram que os porta-enxertos limoeiro 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck), tangerineira 'Sunki' (*C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka), tangerineira 'Cleópatra' (*C. reshni* hort. Ex Tanaka), laranjeira 'Caipira' (*C. sinensis* (L.) Osb.) e limoeiro 'Rugoso' (*C. jambhiri* Lush.) não apresentaram os sintomas da doença, sendo considerados tolerantes ao CTV e utilizados na renovação da citricultura. Contudo, os porta-enxertos alternativos ao 'Cravo', como tangerineira 'Cleópatra', citrumelo 'Swingle', trifoliata e a tangerineira 'Sunki, manifestaram algumas limitações, tais como incompatibilidade com algumas variedades copa, início de produção tardio e, especialmente, a suscetibilidade à seca.

Atualmente, o limoeiro 'Cravo', citrumelo 'Swingle', tangerineira 'Sunki' e a tangerineira 'Cleópatra' são os porta-enxertos mais utilizados na citricultura brasileira (FUNDECITRUS, 2013). Entretanto, a citricultura vem enfrentando uma séria doença chamada MSC, afetando principalmente plantas de laranjeiras doces [*C. sinensis* (L.)Osb.] enxertadas sobre 'Cravo' (Müller et al., 2002; Magalhães-Filho et al., 2008). AMorte Súbita do Citros (MSC) é uma doença destrutiva e representa uma ameaça potencial para a citricultura nacional, já que afeta laranjeiras doces e tangerineiras enxertadas em porta-enxertos intolerantes, como os limoeiros Cravo, Volkameriano e Rugoso (Bassanezi et al., 2003; Pompeu Junior, 2011;FUNDECITRUS, 2013).

O limoeiro 'Cravo' (*Citrus limonia* Osb.) tem sido o porta-enxerto mais utilizado no Brasil desde o início da década de 1960, com cerca de 80% das plantas enxertadas sobre ele (Citrolima, 2013). As razões para este porta-enxerto ser amplamente utilizado são: alta produtividade das plantas, precocidade de produção, compatibilidade com diversas copas, boa adaptação a diversos tipos de solo e clima, além de ser tolerante à tristeza dos citros e à seca (Pompeu Junior, 1991, 2005; Leite Júnior, 1992). A adaptação à seca depende de uma série de características fisiológicas e morfológicas (Bray, 1993). As características que fazem o 'Cravo' se adaptar melhor à deficiência hídrica são pouco conhecidas e devem ser investigadas,

visto que o surgimento de novos porta-enxertos que apresentem essas características fenotípicas e fisiológicas devem ser selecionados (Magalhães-Filho et al., 2008).

A utilização de porta-enxertos alternativos, como tangerineiras 'Cleópatra' (*C. reshni* hort. ex Tanaka) e 'Sunki' [*C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka] e citrumelo 'Swingle' (*C. paradisi* Macfaden x *Poncirus trifoliata* Rafinesque), vem sendo realizada como forma de controlar essas doenças, embora essas variedades apresentem menor tolerância à seca do que 'Cravo'. Contudo, as ótimas características do 'Cravo' fazem com que ele continue prevalecendo nos novos plantios (Pompeu Junior, 2011).

O uso da tangerineira 'Sunki' como porta-enxerto começou desde o início do século passado, motivado por apresentar características desejáveis com comportamento semelhantes à tangerineira 'Cleópatra' (*C. reshni* hort. ex Tan.), como sua resistência ao declínio dos citros, tolerância à tristeza, à xiloporose, a MSC, elevado vigor e boa produtividade de frutos (Bassanezi et al., 2002; Pompeu Junior, 2005). Isso a tornou uma variedade de grande interesse comercial e muito utilizada em cruzamentos genéticos visando à obtenção de novos porta-enxertos (Schinor et al., 2011).

Novas seleções da tangerineira 'Sunki' foram obtidas pela Embrapa Mandioca e Fruticultura, denominadas 'Tropical' e 'Maravilha'. Essas variedades apresentam quase 100% de poliembrionia nucelar, com número médio de 18 e 7 sementes por fruto, respectivamente, sendo a tangerineira 'Sunki Tropical' com grande relevância, visto que tem mostrado características de boa resistência à gomose de *Phytophthora* e tolerância à seca similar a do 'Cravo' (Soares Filho et al., 2002; 2003). Estudos revelam que plantas enxertadas nesse porta-enxerto não são afetadas pela MSC, que sua presença nos viveiros aumentou de 5,1% em 2002 para 7,1% em 2003 (Pompeu Junior, 2005), além de ser uma variedade compatível com a laranjeira 'Pera' (*C. sinensis*) (FUNDECITRUS, 2013).

Outras variedades que vêm se destacando no cenário nacional são as trifoliatas (*Poncirus trifoliata*). No Rio Grande do Sul é o porta-enxerto mais utilizado, alcançando até 97,53% das mudas produzidas em 1998 (Schäfer, 2000). Em geral, o porta-enxerto *Poncirus trifoliata* e alguns dos seus híbridos

induzem um menor vigor à variedade copa, quando comparados com porta-enxertos mais vigorosos como o 'Cravo' (Schäfer et al., 2001a).

Uma das características mais interessantes dos trifoliatas é sua resistência à Gomose, o que tornam estes porta-enxertos viáveis em solos mais pesados e úmidos, além de ser resistente a nematoides, à tristeza (CTV), MSC e recentemente descrito ao HLB. É, no entanto, muito suscetível ao exocortis e mediana a altamente suscetível ao declínio e à seca. A seleção conhecida como 'Flying Dragon' tem sido utilizada de forma crescente no Brasil, principalmente na produção de lima ácida (Espinoza - Núñez et al., 2011; Citrolima, 2013).

A diversificação dos porta-enxertos utilizados na citricultura é de grande importância, visto que existe no Brasil uma grande diversidade de ambientes (Cerqueira et al., 2004). Diante dessa situação é importante a ampliação da base genética de variedades copa e porta-enxerto (Machado et al. 2005). Entretanto, o desenvolvimento de novos porta-enxertos, capazes de substituir ou compor com o 'Cravo', a base dos pomares cítricos brasileiros, não é uma tarefa fácil, visto que este apresenta boa tolerância à seca (Pompeu Junior, 2005) e outras características já citadas. Dificuldades como a alta heterozigossidade, gerando progênies com comportamento imprevisível, devido à segregação dos diferentes locos, o longo período pré-reprodutivo e a ocorrência de poliembrionia, comuns aos *Citrus* e outros gêneros afins, como *Poncirus* e *Fortunella*, também dificultam a execução de programas de melhoramento genético de citros (Soares Filho et al., 2003).

O desenvolvimento de novos porta-enxertos tolerantes à seca em citros, por meio de melhoramento genético clássico e/ou estratégias inovadoras, poderá ser essencial para manutenção da citricultura nacional. Consequentemente, a compreensão dos mecanismos de tolerância à seca e a exploração do seu potencial tem sido uma prioridade em diversos estudos realizados (Boscariol-Camargo et al. 2007).

3.3. Deficiência hídrica

As áreas cultivadas com citros estão sujeitas a variações agroclimáticas, já que é a fruteira mais plantada no país e está presente na maioria dos

estados brasileiros. Algumas regiões apresentam precipitações inferiores às necessidades das plantas, como observado no semiárido brasileiro, com distribuição pluviométrica irregular durante o ano, causando períodos prolongados de ausência de chuva e, conseqüentemente, ocasionando estresse às plantas e inviabilizando o cultivo sem irrigação (Mattos Junior et al., 2005; Brito et al., 2012).

As principais regiões produtoras de laranja no Brasil também têm sido frequentemente afetadas pela deficiência hídrica. No Estado de São Paulo, por exemplo, tem-se observado uma frequente e característica intensificação do período de estiagem do sul para o norte do Estado durante os meses de inverno, o que tem afetado negativamente a produção e qualidade dos frutos (Sentelhas, 2005). Por outro lado, a produção citrícola dos Estados de Bahia e Sergipe está estabelecida na região dos tabuleiros costeiros e os problemas de deficiência hídrica e conseqüente estresse nas plantas surgem em função da interação dos horizontes coesos dos solos, localizados a pequena profundidade, com o clima quente e frequente episódios de estiagem, principalmente nos meses de verão (Souza et al., 2004). Este fenômeno tende a se agravar com as modificações climáticas que o planeta vem sofrendo nos últimos anos decorrentes do aquecimento global.

As plantas estão constantemente submetidas a condições de múltiplos estresses que podem afetar o seu desenvolvimento (Taiz; Zeiger, 2004), gerando um processo de aclimatação que irá contribuir para a sua sobrevivência. Quando a taxa de transpiração excede a absorção de água, a planta pode ser considerada como estressada, sendo este causado por uma série de componentes e diferentes tensões (seca, salinidade e baixa temperatura) (Bray, 1997).

A ocorrência de deficiência hídrica em plantas cultivadas é um dos principais fatores limitantes da produção vegetal, afetando o crescimento e o desenvolvimento das culturas (Nogueira et al., 2001). Com isso, a planta busca uma série de estratégias para tolerância ao estresse por deficiência hídrica visando resistir ao período de seca. De modo geral, as respostas das plantas à deficiência hídrica variam de acordo com a espécie, com a intensidade e duração do estresse, podendo se manifestar em termos morfológicos, fisiológicos e moleculares (Wang, 2003; Taiz & Zeiger, 2004).

Segundo Yue et al (2006), as relações planta-água têm demonstrado que a maioria das plantas utiliza o retardo e a tolerância à desidratação como principais estratégias fisiológicas e morfológicas em resposta à deficiência hídrica. O retardo à desidratação é uma estratégia que tende a reduzir a perda de água por meio do aumento da resistência estomática e cuticular e de alterações morfológicas nas folhas (Jones; Corlett, 1992). Por outro lado, a tolerância à desidratação é uma estratégia que permite a planta crescer e permanecer viva após um ciclo de hidratação e desidratação. Desta forma, a tolerância à desidratação indica a capacidade do tecido em resistir à dessecação, sendo um parâmetro avaliador da capacidade que a planta apresenta em se recuperar do estresse (Shinozaki; Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Pierre et al., 2012). Os mecanismos primários de tolerância à desidratação incluem o ajuste elástico das paredes celulares (módulo de elasticidade, ϵ) e ajuste osmótico (Savé et al., 1993; Touchette et al., 2007; Munns; Tester, 2008).

A estratégia de retardo à desidratação, que inclui mecanismos como a redução da área foliar, diminuição da condutância estomática e aprofundamento das raízes, busca melhorar o desempenho das espécies cultivadas durante a imposição à seca. Entretanto, há uma redução na captação de CO₂ devido ao fechamento dos estômatos, além do desvio da energia requerida para o crescimento de raízes, o que pode afetar a produção de frutos (revisado por Medina et al., 2005; Verslues et al., 2006). Além disso, podem ocorrer limitações em componentes não estomáticos, com danos nos centros de reação do fotossistema II, os quais podem apresentar reversão parcial após reidratação (Cruz et al., 2009).

Entre as respostas moleculares das plantas a deficiência hídrica está a indução da síntese do fitormônio ácido abscísico (ABA), responsável pelo fechamento dos estômatos e ativação de genes de resposta à seca, que induzem modificações bioquímicas, fisiológicas e anatômicas (Verslues et al., 2006; Shinozaki; Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

Os genes de resposta à seca têm sido classificados em dois principais grupos, de acordo com a função da proteína codificada: funcionais e reguladoras. O primeiro grupo codifica proteínas funcionais que protegem diretamente a célula vegetal contra o estresse, tais como osmoprotetores

(prolina, betaína, manitol e galactinol), LEAs (*late embryogenesis abundant*), chaperonas, transportadores, várias proteases e enzimas detoxificadoras de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Saibo et al., 2009, Oliveira et al., 2011; Reguera et al., 2012). O segundo grupo codifica proteínas regulatórias envolvidas na regulação da expressão gênica e transdução de sinal em resposta ao estresse, incluindo vários fatores de transcrição (AP2/ERF, bZIP, NAC, MYB, MYC e WRKY), proteínas quinases (CDPK, GSK3/Shaggy, MAPKKK e SnRK2), enzimas envolvidas no metabolismo de fosfolipídios, síntese de ABA (NCEs) e outras moléculas sinalizadoras (proteínas de ligação a calmodulina, proteínas 14-3-3 e proteínas sensoras de cálcio). Análise molecular dos produtos gênicos do segundo grupo demonstra que diversos sistemas regulatórios de transcrição e transdução de sinais são controlados por ABA enquanto outros não, indicando o envolvimento de sistemas regulatórios de resposta à seca tanto dependente como independente de ABA (Shinozaki; Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

3.4. Respostas dos citros à deficiência hídrica

As respostas das plantas cítricas ao déficit hídrico incluem mecanismos de retardo à desidratação, como o fechamento dos estômatos, que reduz a perda de água por transpiração, mas ao mesmo tempo afeta o acesso do carbono atmosférico aos sítios de fixação no mesófilo (Medina et al., 2005; Magalhães-Filho et al., 2008). Com isso, ocorre redução na fotossíntese e crescimento das plantas, encurvamento e queda foliar, queda de frutos jovens ou redução no crescimento dos frutos já desenvolvidos. Durante o florescimento, a seca leva à queda das flores e conseqüentemente à redução na produção, o que também está associado à redução da translocação de nutrientes (Sentelhas, 2005; Ahuja et al., 2010).

Vale ressaltar que essas respostas dos citros à seca também são influenciadas pela intensidade, variedade porta-enxerto, período e duração do estresse, assim como interações planta-solo-atmosfera (Mattos, 2007).

O ajuste osmótico é um dos mais frequentes mecanismos de tolerância à seca em plantas e também tem sido observado em citros submetidos a estresse por deficiência hídrica e salino (Medina et al., 2005). O ajuste

osmótico permite a continuidade de absorção de água pela planta em potenciais de água mais baixos no solo, favorecendo a manutenção da turgescência celular, necessário para a abertura estomática, sustentando a fotossíntese e o crescimento (Rodríguez-Gamir et al., 2010).

Os principais reguladores osmóticos incluem os açúcares solúveis (principalmente sacarose e frutose), açúcares-alcoóis (glicerol e inosítois metilados), açúcares complexos (trealose, rafinose e frutanos), íons K⁺ e metabólitos com carga (glicinabetaina, prolina, ectoína e pinitol) (Taiz, 2003).

O ajuste osmótico foi relatado em plantas de tangerineira 'Cleópatra' submetidas à deficiência hídrica, provavelmente devido ao acúmulo de prolina, amido e compostos de amônio quaternário em suas folhas (García-Sánchez et al., 2007). Um aumento no conteúdo de prolina (Laborem et al., 1991) e de açúcares solúveis (Yelenosky, 1979) também foi relatado em outras espécies de citros durante a deficiência hídrica.

Outra adaptação observada em citros sob condições de deficiência hídrica é o ajuste elástico das paredes celulares (Savé et al., 1995). As folhas de laranja 'Newhall' e de tangor 'Ellendale' apresentaram decréscimos significativos no módulo de elasticidade quando submetidas ao estresse por deficiência hídrica (Savé et al., 1995). Essa maior elasticidade das paredes celulares permite a manutenção da turgescência e a continuidade na utilização de nutrientes e assimilados para o crescimento (Medina et al., 2005).

3.5. Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo

A oxidação de biomoléculas afeta seriamente o metabolismo vegetal, resultando em alterações celulares como danos em membranas, perda de funções das organelas, redução na eficiência metabólica e na fixação do carbono, além de perdas de eletrólitos e mutações, que levam a disfunções fisiológicas, podendo acarretar em morte celular (Dat et al. 2000; Mittler, 2002; Scandalios, 2005).

De forma modulada, as plantas conseguem gerar respostas de defesa de tal maneira a superar tais estresses e retornar ao metabolismo normal.

Algumas dessas respostas primárias são desencadeadas por sinais ambientais, nos quais fatores como seca, salinidade, temperatura, metais pesados, alta luminosidade, radiação ultra-violeta, hipóxia e ausência de nutrientes essenciais, denominados estressores abióticos, levam a planta a um dano oxidativo, que por vias antioxidantes, combatem essas injúrias (Azevedo et al., 1998; Asada, 2006; Halliwell; Gutteridge, 2006; Soares; Machado, 2007). Compreender os mecanismos de proteção dos vegetais é essencial para obter, por meio da biotecnologia, variedades mais resistentes e/ou tolerantes que possam aumentar a produtividade e a qualidade dos frutos (Soares; Machado, 2007).

A deficiência hídrica, assim como outros fatores ambientais, pode causar efeitos desfavoráveis sobre as plantas, decorrentes de estresse oxidativo, provocado pela intensificação da formação de espécies reativas do oxigênio (ROS). As ROS atingem moléculas vitais como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, gerando distúrbios estruturais, metabólicos e fisiológicos nas células vegetais, podendo levá-las à morte (Hallwell; Gutteridge 2006; Bray et al., 2000). No entanto, algumas dessas reações de produção de ROS estão envolvidas no metabolismo normal das plantas, como fotossíntese e respiração (Mittler, 2002).

A terminologia espécies reativas de oxigênio (ROS) compreende os radicais livres e outras espécies que são muito reativas devido a sua instabilidade (Ribeiro et al., 2005). Radical livre refere-se a qualquer átomo ou molécula capaz de existir independentemente, apesar de possuir um ou mais elétrons desemparelhados (Hallwell;Gutteridge, 2006).

Sob estresse hídrico, a produção de ROS é reforçada de várias maneiras. A inibição de assimilação de dióxido de carbono (CO₂), devido ao fechamento estomático, juntamente com as mudanças nas atividades dos fotossistemas e a capacidade de transporte fotossintético resulta em uma produção acelerada de ROS (Asada, 1999). O estresse oxidativo causado pelas ROS irá ocorrer quando deixar de existir o balanço entre antioxidantes e oxidantes (Scandalios, 2005) (Figura 1).

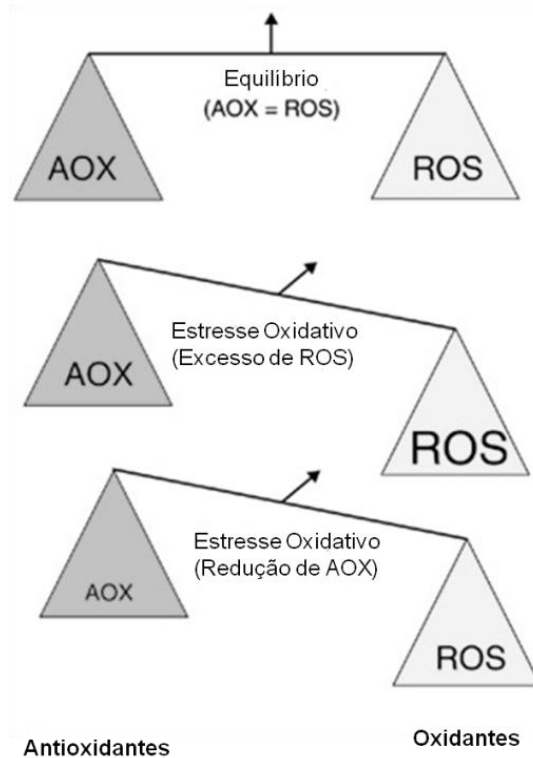


Figura 1: O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e antioxidantes (AOX). Sob circunstâncias normais, as células são capazes de equilibrar a produção de oxidantes e antioxidantes, resultando em equilíbrio redox. O estresse oxidativo ocorre quando as células são submetidas a níveis excessivos de ROS, ou como resultado de redução das defesas antioxidantes (Adaptado de Scandalio, 2005).

As ROS são geradas como produto da cadeia transportadora de elétrons, durante o metabolismo normal da planta (Moller, 2001), principalmente nas cadeias transportadoras de elétrons no cloroplasto (fotossíntese), mitocôndria (respiração celular) e na fotorrespiração (Dat et al., 2000; Meloni et al., 2003; Asada, 2006).

As principais formas de ROS formados nos processos são: radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), sendo as primeiras espécies reativas formadas, oxigênio singlet (1O_2), molécula altamente reativa se comparado ao O_2 , radical hidroxila (OH^{\cdot}), altamente reativo e de meia vida curta, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), apontado como sinalizador de defesa, podendo atravessar livremente as membranas através das aquaporinas e ser acumulado no interior das células (Vranová et al., 2002; Apel & Hirt 2004; Soares; Machado 2007).

A molécula de oxigênio (O_2) é uma molécula totalmente inofensiva. Em seu estado fundamental tem dois elétrons desemparelhados com spin paralelo que a torna paramagnética, e, portanto, pouco provável na

participação de reações com moléculas orgânicas, a menos que ela esteja ativada (Apel; Hirt 2004). A ativação de O_2 pode ocorrer por dois mecanismos diferentes: (i) absorção de energia suficiente para inverter a rotação sobre um dos elétrons desemparelhados e (ii) redução gradual monovalente. No primeiro caso, 1O_2 é formado, ao passo que no último, o O_2 é sequencialmente reduzido em $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , e OH^{\bullet} (Sharma et al., 2012) (Figura 2).

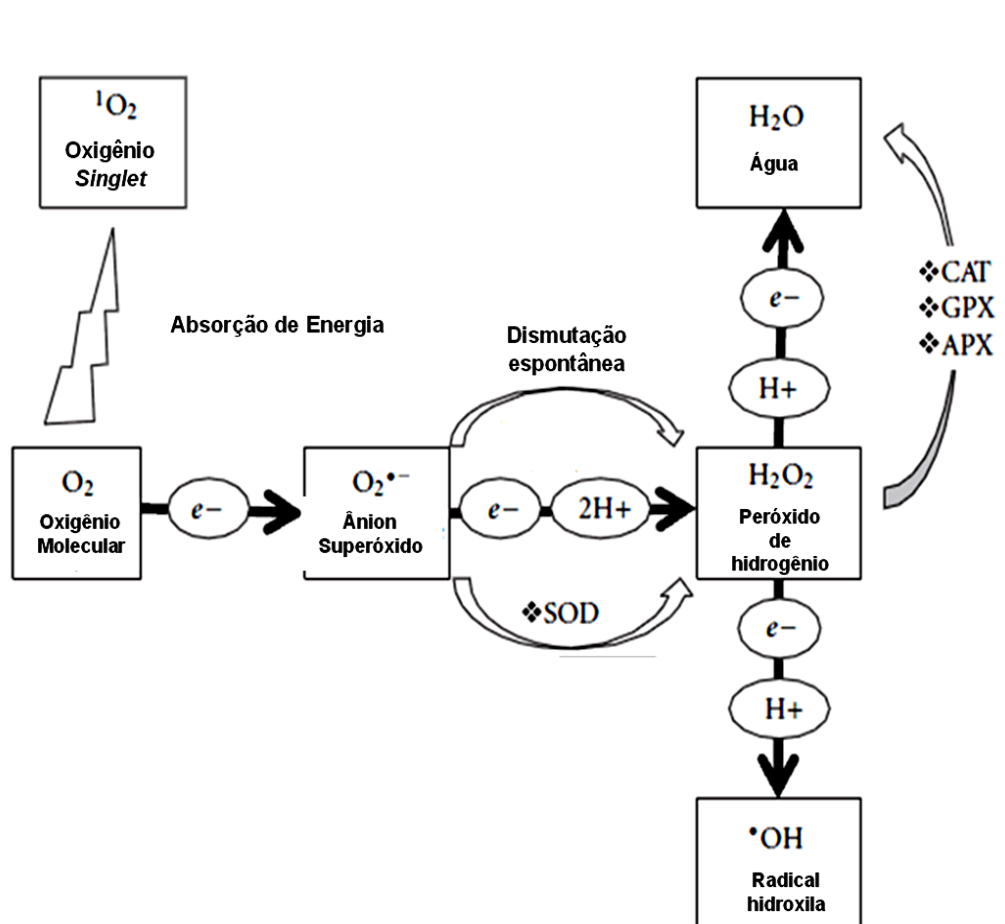


Figura 2: Geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) em plantas. A ativação de O_2 ocorre por dois mecanismos diferentes. Redução monovalente gradual de O_2 levando a formação de $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , e $^{\bullet}OH$, enquanto a transferência de energia para O_2 leva à formação de 1O_2 . $O_2^{\bullet-}$ é facilmente dismutado pela enzima dismutase do superóxido (SOD) e convertido em H_2O_2 . H_2O_2 é catalisado em H_2O pelas enzimas catalase (CAT), peroxidase do guaiacol (GPX) e peroxidase do ascorbato (APX) (Adaptado de Sharma et al., 2012).

As espécies reativas de oxigênio podem ser prejudiciais, em excesso, ou podem atuar como moléculas sinalizadoras, dependendo do delicado

equilíbrio entre a produção e a eliminação de ROS. Devido aos papéis multifuncionais de ROS, é necessário que as células controlem os seus níveis para evitar alguma injúria oxidativa, sem as eliminar por completamente.

Os recentes resultados indicam que ROS nem sempre são subprodutos metabólicos prejudiciais, mas podem desempenhar um papel significativo no funcionamento da célula, participando numa grande variedade de processos fisiológicos associados com o crescimento e desenvolvimento vegetal (Van Breusegem et al., 2001; Foyer e Noctor, 2005; Doupis et al., 2013).

3.6. Mecanismo Antioxidativo

A desintoxicação do excesso de ROS é conseguida graças a um eficiente sistema antioxidante compreendido por mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos (Foyer e Noctor, 2005). O sistema de defesa antioxidativo atua na interrupção dos processos de oxidação desencadeados pelas ROS, presente no apoplasto, e em vários compartimentos subcelulares (Pang e Wang, 2008; Sharma et al., 2012). Estudos estão sendo realizados na busca de novas informações sobre a formação e destino das ROS e na compreensão de redes bioquímicas envolvidas em respostas celulares ao estresse oxidativo (Sharma et al., 2012).

Como mecanismo antioxidativo enzimático, as plantas incluem enzimas tais como dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase do guaiacol (GPX) (Mittler et al., 2004; Apel; Hirt, 2004; Soares e Machado 2007), representadas na Figura 3, oxidase do polifenol (PPO) (Kwyabara & Katho, 1999) e fenilalanina amônia liase (PAL) (Sarma et al., 1998; Nakazawa et al., 2001). O aumento das atividades enzimáticas está intimamente relacionado com o aumento da tolerância a uma variedade de fatores de estresse abióticos (Dat et al., 2000).

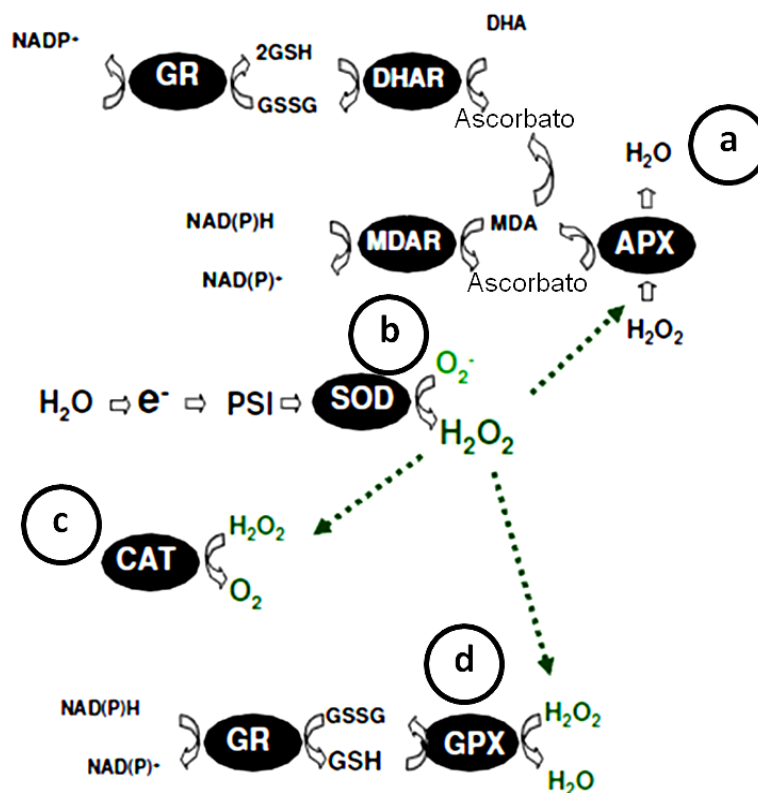


Figura 3: Mecanismos enzimáticos de eliminação de ROS: (a) Ciclo da Peroxidase do Ascorbato (APX) (b) Dismutase do superóxido (SOD). (c) Catalase (CAT). (d) Ciclo da Peroxidase do Guaiacol (GPX). (Adaptado de Gratão *et al.* 2005).

A enzima superóxido dismutase (SOD) é considerada o antioxidante enzimático intracelular mais eficaz, presente em todos os compartimentos celulares propensos ao estresse oxidativo mediados pelas ROS, compondo a primeira linha de defesa enzimática por converter o $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 (Figura 3b) (Mittler, 2002; Martins e Mourato, 2008). É uma metaloenzima classificada em três grupos, de acordo com o metal co-fator utilizado. As plantas, normalmente, apresentam as formas Cu/Zn-SOD no citosol, Cu/Zn e/ou Fe-SOD no cloroplasto e Mn-SOD na mitocôndria (Alscher et al. 2002; Resende et al. 2003; Apel; Hirt 2004; Scandalios, 2005). A atividade da SOD está ligada diretamente ao radical $O_2^{\bullet-}$, já que à medida que ela reduz sua atividade ocorre um aumento simultâneo da $O_2^{\bullet-}$. O radical $O_2^{\bullet-}$ é um dos principais oxidantes responsáveis pela peroxidação de lipídios e consequente aumento na permeabilidade das membranas (Apel; Hirt 2004).

Como produto da dismutação do $O_2^{\cdot-}$, o H_2O_2 , em altas concentrações, deve ser removido de modo que sua conversão em radicais mais reativos, como o OH^{\cdot} , seja evitado (Perl-Treves-Treves; Perl, 2002), necessitando de outros mecanismos antioxidantes de defesa (Noctor; Foyer, 1998). O acúmulo de H_2O_2 nos tecidos foliares ou sua indução endógena promove o fechamento dos estômatos e, logo, diminui a taxa transpiratória, atravessa as membranas celulares, promovendo a peroxidação lipídica (Resende et al. 2003), além de apresentar atividade sinalizadora para a indução na expressão de genes referentes à ativação da catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase do guaiacol (GPX) (Soares; Machado 2007).

A CAT é uma das principais enzimas na eliminação de H_2O_2 gerados em diferentes processos nas células como fotorrespiração e β -oxidação dos ácidos graxos, atuando nos peroxissomos, glioxissomos e citosol, podendo ser encontrada também em mitocôndrias. CAT converte H_2O_2 à H_2O e O_2 (Mittler, 2002; Perl-Treves; Perl, 2002; Dubey, 2010).

Como a CAT degrada o H_2O_2 sem qualquer redutor, esta enzima fornece às plantas uma forma energeticamente eficiente para remover estas moléculas (Dat et al., 2000). Além disso, é considerada enzima chave envolvida na remoção de peróxidos tóxicos nas células quando estes estão em concentrações altas, pois apresenta baixa afinidade pelo H_2O_2 (Mittler, 2002). A CAT tem uma das maiores taxas de rotatividade: uma molécula de CAT pode converter ± 6 milhões de moléculas de H_2O_2 para H_2O e O_2 por minuto (Gill e Tuteja, 2010).

Diferente da CAT, a peroxidase do ascorbato (APX) necessita de agentes redutores celulares. A APX apresenta alta especificidade pelo ascorbato (ou ácido ascórbico) como substrato redutor, catalisando a reação de neutralização do H_2O_2 em H_2O (Carvezan, 2008), com formação da molécula de monodesidroascorbato (MDA). Este radical pode ser diretamente reduzido a MDAR (monodesidroascorbato-redutase), utilizando o NADPH como redutor, ou sofrer uma dismutação e formar desidroascorbato (DHA).

O DHA é reduzido a ascorbato pela ação da DHAR, que utiliza a glutathiona reduzida (GSH) como doadora de elétrons. Esta reação origina glutathiona no estado oxidado (GSSG), que é novamente reduzida a GSH pelo NADPH, numa reação catalisada pela enzima glutathiona redutase (GR). Este

ciclo é conhecido como glutathiona-ascorbato (Figura 3a) (Asada e Takahashi, 1987; Gratão et al., 2005; Martins e Mourato, 2008).

A APX está localizada primeiramente nos cloroplastos (membrana dos tilacóides e estroma) no citosol (Asada e Takahashi; 1987; Madhusudhan et al., 2003; Sharma et al., 2012), mitocôndrias, apoplasto e peroxissomas (Mittler, 2002). Segundo Dat et al. (2000), o equilíbrio entre as atividades de SOD e CAT e/ou APX nas células é crucial para a determinação do nível de estado estacionário de radicais superóxido e de peróxido de hidrogênio, sendo este equilíbrio importante para prevenir a formação do radical hidroxila, que é altamente tóxico para os tecidos vegetais. Além disso, de acordo com Mittler (2002), esta enzima apresenta alta afinidade com o H_2O_2 , sugerindo que ela seja responsável pelo controle dos níveis de ROS para efeitos de sinalização molecular, já que atua em baixas concentrações de H_2O_2 , na ordem dos μM , diferente da CAT, que atua em níveis mais altos, em mM.

A peroxidase do guaiacol (GPX), assim como a APX, necessita de moléculas redutoras para dismutar o peróxido acumulado intracelularmente. A presença da GR nos cloroplastos produz altos níveis GSH, que além de regenerar o ascorbato na atividade da APX, também participa da regeneração da GSSG formada na redução do H_2O_2 a H_2O pela GPX (Figura 3d) (Apel; Hirt, 2004). A enzima GPX utiliza preferencialmente fenóis aromáticos, como o guaiacol ou o pirogalol, embora a GPX possa também oxidar o ascorbato, a uma taxa de 1%, e são muito inferiores ao consumo do guaiacol (Asada, 1999; Gill; Tuteja, 2010; Sharma, 2012). A GPX está associada com muitos processos biossintéticos, incluindo lignificação da parede de celular, degradação do ácido indolacético (AIA), biossíntese do etileno, e defesa contra estresses bióticos e abióticos nas plantas (Gill; Tuteja, 2010; Sharma, 2012)

A polifenoloxidase (PPO) faz parte do grupo das oxirredutases e está relacionada com a oxidação de grupos fenólicos do metabolismo secundário (Mendonça; Guerra, 2003; Alvarenga et al., 2011). Acredita-se que esta enzima esteja localizada nos cloroplastos, essencialmente no lúmen dos tilacóides, participando também dos mecanismos de defesa da planta (Kuwabara; Katoh, 1999; Mendonça; Guerra, 2003). A PPO está associada a

mecanismos de construção da parede celular dos vegetais, visto que a lignina é um polímero de grupos fenilpropanóides, e a enzima forma uma ligação cruzada entre os grupos fenólicos (Taiz; Zeiger, 2009; Alvarenga et al., 2011). Além disso, provoca nos vegetais (frutas e hortaliças) o escurecimento dos tecidos oriundo das reações de oxidação da PPO decorrente do produto que é liberado do sítio ativo das tirosinases, a o-quinona (Éspin et al., 1995; Mendonça; Guerra, 2003; Alvarenga et al., 2011).

A fenilalanina amônia-liase (PAL) possivelmente é a enzima mais estudada no metabolismo secundário vegetal, pois está situada em um ponto de ramificação entre o metabolismo primário e secundário, e a reação que ela catalisa é uma etapa reguladora importante na formação de muitos compostos fenólicos (Taiz e Zeiger, 2004). Esses compostos fenólicos são produzidos na planta seguindo duas rotas diferentes, a do ácido chiquímico, que participa da via biossintética da maioria dos fenóis vegetais e a rota do ácido mevalônico, sendo menos expressivos nas plantas (Figura 4) (Tiveron, 2010).

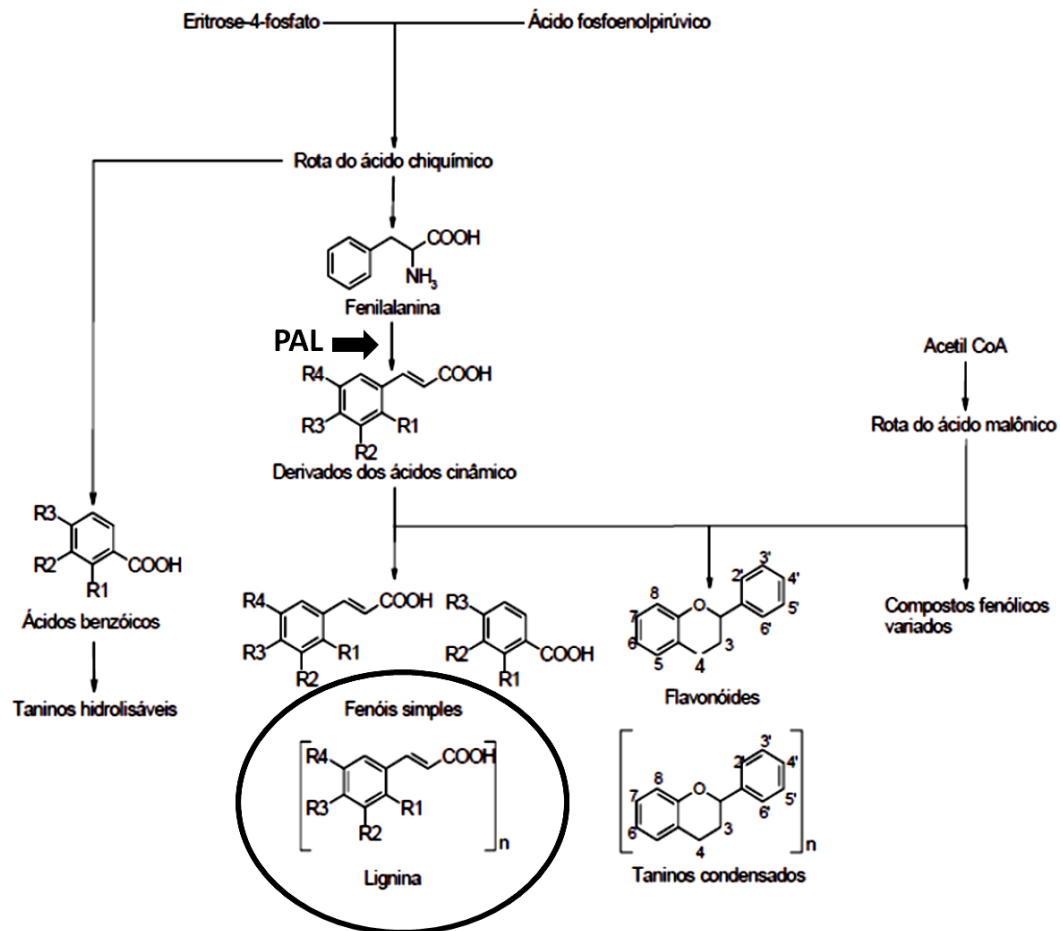


Figura 4: Esquema das rotas de produção dos compostos fenólicos: rota do ácido chiquímico e ácido mevalônico. (Adaptado de Tiveron, 2010).

A PAL está localizada nos cloroplastos, principalmente nas membranas dos tilacóides e atua na desaminação da L-fenilalanina, formando ácido trans-cinâmico e amônia (Cavalcanti et al., 2005). Assim como a PPO, a PAL está diretamente envolvida na lignificação da parede celular vegetal (Oliveira et al., 2001), envolvida na rota dos fenilpropanóides, tais como flavonoides, fitoalexinas, ligninas e derivados do ácido benzoico (Figura 4) (Sarma et al., 1998).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material vegetal e condições de cultivo

O estudo foi realizado em condições de casa de vegetação na Universidade Estadual de Santa Cruz, município de Ilhéus, Sul da Bahia. As plantas selecionadas foram 27 mudas de laranjeira 'Westin' (*Citrus sinensis* L. Osb.), de aproximadamente 1 ano de idade, de origem nucelar, enxertadas sobre clones nucleares de limoeiro 'Cravo' (*C. limonia* Osb.), tangerineira 'Sunki Tropical' (*C. sunki* Hort. ex. Tan.) e trifoliata 'Flying Dragon' (*Poncirus trifoliata* L.). Para cada combinação de porta-enxerto tinha-se 9 plantas, sendo 3 repetições por tratamento (irrigado, deficiência hídrica e reidratação) (Figura 5).



Figura 5: Plantas de laranjeira 'Westin' enxertadas em limão 'Cravo', tangerineira 'Sunki Tropical' e trifoliata 'Flying Dragon' mantidas em casa de vegetação, para a implementação do experimento de deficiência hídrica..

As plantas foram inicialmente transplantadas para vasos plásticos (45 L) contendo solo:areia (3:1) como substrato, onde permaneceram por todo o período experimental. A fim de favorecer o desenvolvimento de um sistema radicular denso, as plantas foram podadas a cerca de 1 m a partir de sua base após o transplântio (Figura 6).

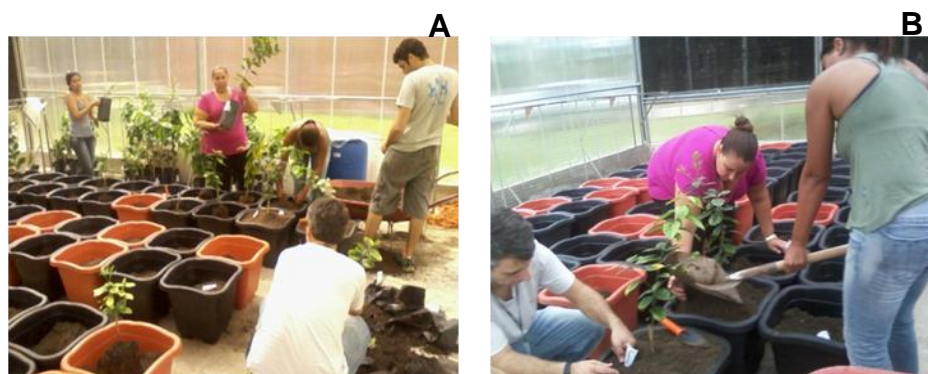


Figura 6: Transplântio (A) e restabelecimento (B) dos porta-enxertos Limão 'Cravo', tangerineira 'Sunki Tropical' e trifoliata 'Flying Dragon'. As plantas foram retiradas dos sacos plásticos. Após a retirada de todo o substrato, com cuidado para não destruir a raiz, as plantas foram plantadas em vasos de 45 L. As plantas foram irrigadas até a saturação do solo.

As plantas foram fertilizadas semanalmente com 1 g/L de nitrato de cálcio, 0,4 g/L de nitrato de potássio, 0,6 g/L de sulfato de magnésio e 0,4 g/L de fosfato monoamônico (MAP). Micronutrientes F.T.E. (50 g/vaso) foram misturados ao solo por ocasião do enchimento dos vasos.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação com umidade e temperaturas do ar variando de 70 a 96% e 21 a 32 C°, respectivamente. Cada vaso, contendo apenas uma planta, foi irrigado para que o solo fosse mantido próximo à capacidade de campo até o momento de ser aplicado os tratamentos. Após 30 dias do transplântio, as plantas foram submetidas a três tratamentos: (i) controle, em que as plantas foram irrigadas e o potencial hídrico foliar foi mantido entre -0,1 à -0,5 MPa durante todo o experimento, (ii) deficiência hídrica, em que ocorreu a suspensão gradativa da irrigação até o potencial hídrico foliar atingir valores entre -1,5 à -2,5 MPa e (iii) reidratação, em que as plantas submetidas à deficiência hídrica foram irrigadas até o reestabelecimento do potencial hídrico foliar para valores entre

-0,1 à -0,5 MPa. Todos os vasos foram vedados na parte superior com papel alumínio, para que fosse minimizada a perda de água por evaporação (Figura 7).

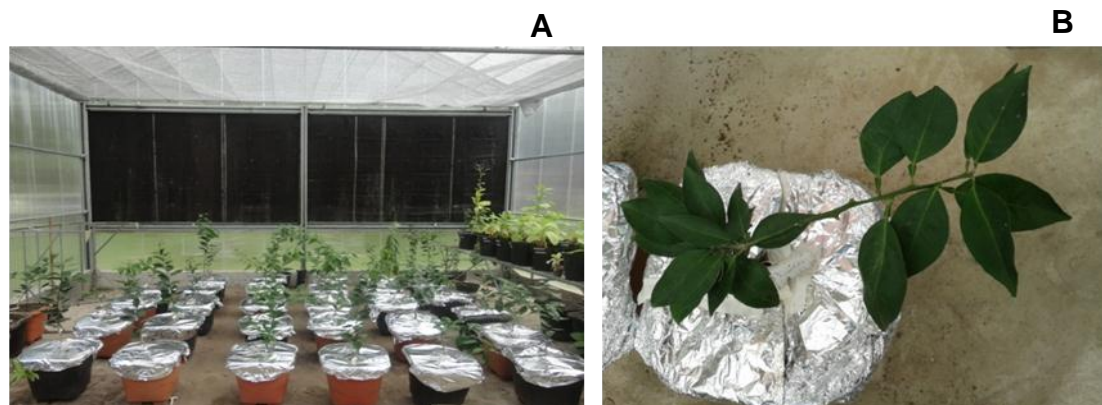


Figura 7: Plantas de laranja 'Westin' enxertadas em limão 'Cravo', tangerineira 'Sunki Tropical' e trifoliata 'Flying Dragon' prontas para o início do experimento (A). Os vasos foram cobertos com papel alumínio para que a perda de água fosse essencialmente pela folha (B).

O delineamento experimental foi realizado em blocos ao acaso, com três repetições por tratamento.

4.2. Potencial hídrico foliar (Ψ_w)

O Ψ_w foi determinado a partir da segunda ou terceira folha totalmente expandida e madura do ápice da planta, utilizando uma câmara de pressão (bomba de Scholander). As medições foram realizadas semanalmente, no total de seis, a partir da aplicação dos tratamentos entre 0 e 2 h da manhã (potencial hídrico antemanhã).

4.3. Teor relativo de água (TRA) foliar

As medições de TRA foliar foram efetuadas, após a aplicação dos tratamentos, paralelamente com as medições de Ψ_w , pelo método de pesagem. Foram retirados 6 discos foliares (repetições) de cada planta dos diferentes tratamentos e de todas as variedades, usando um furador de rolhas. O valor do TRA foi determinado de acordo os procedimentos descritos por Smart e Bingham (1974). Os discos foram pesados imediatamente em

balança analítica para avaliação da biomassa fresca atual (BFA). Em seguida, os discos foram acondicionados em microtubos de 1,5 mL, em condições saturadas de umidade, até massa constante, para determinação da biomassa fresca saturada (BFS). Logo após, os mesmos discos foram colocados para secar em estufa de circulação forçada de ar a 75 °C até massa constante, para obtenção da biomassa seca (BS). A seguinte fórmula foi empregada para o cálculo do TRA: $TRA (\%) = [(BFA-BS) / (BFS-BS)] \times 100$.

4.4. Estimativa da área foliar total

Medidas da área foliar total foram efetuadas no início e ao final dos tratamentos. Durante as coletas, medidas não-destrutivas de comprimento (C) e da maior largura (L) foliar das plantas foram efetuadas estimando-se a área de folha pela equação:

$$AFFolha = K \cdot C \cdot L$$

O valor de K utilizado na equação foi de 0,72, conforme Coelho Filho et al. (2003). Com o resultado da área de cada folha amostrada, calculou-se a área média das folhas (AFmédia), que multiplicada pelo número de folhas da planta, permitiu a estimativa da área foliar total (AFT). A área foliar final foi subtraída da área foliar inicial e este resultado foi dividido pelo o número de dias do experimento, gerando a taxa de crescimento foliar. Para as plantas enxertadas em limão 'Cravo' e tangerineira 'Sunki Tropical' o experimento durou 45 dias e para trifoliata 'Flying Dragon' 103 dias. Esse valor foi dado em cm²/dia (Coelho Filho et al., 2004).

4.5. Parâmetros da curva pressão-volume (PV) em folhas

Os parâmetros da curva PV foram determinados a partir de 3 folhas de cada planta referente aos diferentes tratamentos. Para obter a relação Pressão x Volume, as folhas foram submetidas à hidratação máxima, considerando-se saturadas aquelas com $\Psi_w \geq -0,03$ MPa e colocadas sobre uma bancada de laboratório, e alternadamente, pesadas e medidas o seu potencial hídrico foliar por meio de uma câmara de pressão (bomba de Scholander). A biomassa fresca e o potencial de pressão do xilema (ψ_x)

foram estimados em intervalos de 1 hora durante o processo de desidratação (técnica da transpiração livre) até que o ψ_x fosse alcançado, atingindo cerca de -4,0 MPa, sendo necessário aproximadamente 12 horas (Figura 8).



Figura 8: Folhas destacadas de laranjeira 'Westin' enxertadas em limão 'Cravo', tangerineira 'Sunki Tropical' e trifoliata 'Flying Dragon' foram coletadas e estimadas o seu potencial hídrico, através da bomba de Scholander. As folhas apresentaram um potencial hídrico foliar inicial de -0,1 à -0,5 MPa e final de -3,5 à -4,0 MPa.

Subseqüentemente, a massa seca foi determinada depois de 24 h em estufa de circulação forçada de ar a 75°C. O inverso de ψ_x foi representado como uma função do conteúdo relativo de água (RWC), como descrito por DaMatta et al. (1993). Os cálculos dos parâmetros teor relativo de água no ponto de perda de turgor (RWC^{TLP}), potencial osmótico em plena turgescência (Ψ_0), potencial osmótico no ponto de perda de turgor (Ψ^{TLP}) e módulo de elasticidade (ϵ) foram calculados utilizando planilhas de análises conforme descritos por Koide et al. (2000) e Sack et al. (2003).

4.6. Fluorescência da clorofila a

A fluorescência da clorofila a foi determinada usando um fluorímetro portátil Pocket PEA (Hansatech Instruments Ltd, UK) em folhas completamente expandidas. Os dados foram coletados em maio de 2013, entre 8 e 9h da manhã, usando 3 plantas de cada variedade em cada tratamento (irrigado, deficiência hídrica e reidratado). As folhas selecionadas

foram submetidas a um período de adaptação ao escuro por 20 minutos, suficiente para a oxidação completa dos centros de reação. Após este período, as folhas foram expostas a um pulso saturante de luz com intensidade de $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 1s. Foram avaliados a fluorescência inicial (F_0), a fluorescência máxima (F_m), a fluorescência variável (F_v) e a razão F_v/F_m .

4.7. Peróxido de hidrogênio

O estresse oxidativo em tecidos foliares foi avaliado usando discos foliares submetidos ao ensaio de coloração histoquímica com DAB-HCl (3,3' – Diaminobenzidina Tetrahidrocloro). As amostras foram submetidas à infiltração a vácuo com 1 mg mL^{-1} de DAB-HCl, por 4 horas. Após esse período, os discos foliares foram fervidos em etanol 96% por 4 h e posteriormente fotografados em lupa para detecção da coloração marrom.

4.8. Atividade de enzimas antioxidantes

Aproximadamente 40 mg de tecido vegetal foliar liofilizado foi misturado a 0,028 g de PVP (polivinilpirrolidona) (0,7g de PVP/ g de tecido) e submetido a maceração em nitrogênio líquido, homogenizado em 800 μL de tampão de extração, específico para cada ensaio enzimático, e agitado brevemente em vórtex. Posteriormente, sonicou-se as amostras em ultrassonicador de sonda (Ultrasonic processor Gex 130, 130 W), em gelo, até o rompimento total dos tecidos, sob amplitude de 70%, 8 pulsos de 5 s, com intervalos de 10 s, e submetidos a centrifugação a 14000 rpm por 10 min à 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e armazenado, temporariamente, em gelo, obtendo-se o extrato bruto. Foi utilizado um pool de amostras vegetal foliar para cada variedade, com 3 réplicas biológicas e experimentais para cada tratamento. As atividades enzimáticas foram realizadas em quadruplicata.

4.8.1. Atividade da Dismutase do Superóxido (SOD)

Uma unidade de atividade enzimática (UA) de SOD foi determinada medindo-se a capacidade da enzima em obter 50% de inibição da redução fotoquímica de nitroazul de tetrazólio (NBT), que leva à formação de um precipitado de cor azul denominado formazana. O método utilizado para avaliação da atividade enzimática foi descrito por Gianopolitis e Ries (1977), com modificações. Ao extrato bruto, foi adicionado o tampão de extração contendo: tampão fosfato de potássio (50 mM / pH 6,0), EDTA (1mM) e metionina (13 mM). A atividade enzimática foi iniciada com a adição de riboflavina (1mM). A leitura inicial ocorreu após a placa ter ficado no escuro por 5 min, sendo a segunda leitura realizada após a placa ter sido submetida a luz fluorescente de 15W, expostas por mais 5 min. Após iluminação, a reação foi finalizada e as amostras lidas em espectrofotômetro de microplacas Spectramax Paradigm (Molecular Devices) a 560 nm. Foram considerados como brancos os poços que não continham extrato vegetal bruto.

4.8.2. Atividade da catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Havir e Mchale (1987), com algumas modificações. A atividade é definida pela velocidade do consumo de H₂O₂, em reação monitorada em espectrofotômetro de microplacas Spectramax Paradigm (Molecular Devices). O tampão de reação foi constituído de sódio a 50 mM e 12,5 mM de H₂O₂ com 1 µL de extrato bruto, sendo a atividade realizada a 30°C. A reação foi iniciada pela adição de H₂O₂ a 30 mM e as leituras foram realizadas calculando-se o decaimento a 240 nm por 300 s contra um branco livre de extrato vegetal, expresso em mmol H₂O₂/g MF/min, usando-se o coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹ cm⁻¹

4.8.3. Atividade da Peroxidase do Ascorbato (APX)

A atividade de APX foi determinada seguindo metodologia descrita por Nakano e Asada (1981), com modificações. O tampão de reação consistiu de

tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,3), 2 mM de H₂O₂ , 0,5 mM de ascorbato e 100 µL do extrato enzimático diluído. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplacas Spectramax Paradigm (Molecular Devices) a 290 nm, um minuto após a adição do H₂O₂ no tampão contendo ascorbato e o extrato enzimático. Foram realizadas leituras da solução de reação sem o extrato enzimático (branco do reagente) para correção dos cálculos. A análise foi realizada em quadruplicada e expressa em quantidade de enzima que catalisa a oxidação de um micromol de ascorbato por minuto em uma grama de massa fresca (µmolAsA/gMS/min).

4.8.4. Atividade da Peroxidase do Guaiacol (GPX)

Preparou-se para o ensaio enzimático microplacas de 96 poços contendo 140 µL de tampão de reação GPX 2x [40 mmol L⁻¹ de guaiacol, H₂O₂ a 0,06% e fosfato de sódio (20 mmol L⁻¹, pH 6.0)], 139 µL de tampão fosfato (50 mmol L⁻¹, pH 6,0) e 1 µL de extrato enzimático, que foi previamente diluído. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro de microplacas VERSAmax (Molecular services), em comprimento de onda de 470 nm. A atividade de peroxidases foi expressa com o aumento do consumo de guaiacol em µmol s⁻¹ g⁻¹ de biomassa fresca. A conversão dos dados obtidos em valores de absorbância a 470 nm min⁻¹ g⁻¹ de matéria seca para consumo de guaiacol em mmol h⁻¹ g⁻¹ de matéria seca foi feita com o uso da equação $y=0.1284x + 0.0189$ (R²=0.99) originada a partir de uma curva padrão para GPX (Rehem et al., 2011).

4.8.5. Atividade da Oxidase do Polifenol (PPO)

Para determinação da atividade de PPO, coletou-se uma alíquota de 10 µL do extrato bruto onde se diluiu em 90 µL de tampão fosfato 50 mM, pH 6,0. Posteriormente, foram preparadas microplacas de 96 poços contendo 200 µL de tampão PPO (epicatequina 5 mmol L⁻¹, 100 mM ácido cítrico, 20 mM Na₂HPO₄, pH 7,5), 60 µL de tampão fosfato 50 mM, pH 6,0 e 20 µL de extrato enzimático diluído (1:10). As leituras foram realizadas utilizando-se um espectrofotômetro de microplacas VERSAmax (Molecular services). A atividade de PPO foi expressa com o aumento do consumo de epicatequina

em mg g⁻¹ de matéria seca por min. A conversão dos dados obtidos em valores de absorvância, a 444 nm min⁻¹ g⁻¹ de matéria seca, para consumo de epicatequina em mg g⁻¹ de matéria seca min⁻¹, foi feita com o uso da equação $y = - 0,091 + 50,657x$, originada a partir de uma curva padrão para PPO-epicatequina, de acordo com a metodologia descrita por Bertolde et al. (2012).

4.8.6. Atividade da Fenilalanina Amônia-Liase (PAL)

A atividade da PAL foi determinada pela medida espectrofotométrica da conversão da L-fenilalanina para ácido-transcinâmico em 290 nm de absorvância utilizando o espectrofotômetro de microplacas Espectramax Paradigm (Molecular Devices). O extrato vegetal foi extraído a partir do tampão de borato de sódio 100 mM com pH 7,0 - KOH. As amostras foram incubadas em banho maria (40°C por 1h). O sobrenadante foi então utilizado para avaliar a atividade da PAL. As leituras foram feitas em quadruplicatas, após ter adicionado às amostras o tampão de reação 2x, com tampão borato de sódio 100 mM, pH 8,8 - KOH e L-fenilalanina a 12 mM (Pascholati et al., 1986 com modificações).

4.9. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O dano oxidativo aos lipídios nas membranas das células dos tecidos de folhas foi estimado como substâncias que reagem com ácido tiobarbitúrico (TBARS), principalmente malondialdeído (MDA), segundo o protocolo descrito por Heath e Paker (1968). Aproximadamente 20 mg das amostras frescas de folhas foram trituradas e homogeneizadas em 2 mL de solução aquosa de TCA a 0,1%. Os extratos obtidos foram centrifugados durante 6 min a 14000 rpm, a temperatura de 4°C. O sobrenadante foi retirado e transferido para um novo microtubo de 2,0 mL e pipetados 0,5 mL de extrato em tubos para a reação. Nos tubos de reação foram adicionados 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico a 0,5% (TBA) em TCA a 20%. Aos tubos do branco foram adicionados 1,5 mL de TCA a 20%. Os tubos permaneceram em banho maria a 95°C durante 30 min e, em seguida, as reações foram paralisadas imediatamente em gelo. Após o resfriamento, o conteúdo foi centrifugado

durante 6 min a 14000 rpm. Em seguida, a concentração de TBARS acumulada foi determinada por meio de leitura em espectrofotômetro de microplacas VERSAmax (Molecular services) com as absorvâncias das reações a 532 nm.

4.10. Extração de RNA e Síntese de cDNA

O pool de RNA total de folhas das plantas submetidas aos diferentes tratamentos foi isolado utilizando o RNeasy Micro Kit (Qiagen). A qualidade e a integridade do RNA extraído foram avaliadas por análise em gel de agarose 1% e quantificado utilizando NANODrop. As amostras foram tratadas com DNase I, RNase free (Fermentas Life Science) após o processo de extração, seguindo as instruções do fabricante (1µl de DNase). A reação de transcrição reversa foi realizada usando o kit RevertAid H Minus (Fermentas - First Strand cDNA Synthesis Kit K1631 K1632), seguindo as instruções do fabricante.

4.11. Análise de PCR em tempo real (qRT-PCR)

Para as análises de expressão gênica via qRT-PCR foram utilizados oligonucleotídeos especificamente desenhados para a amplificação dos genes que codificam enzimas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo, baseado em suas sequências disponíveis no banco de informação genômica de *Citrus sinensis*, no Phytozome (<http://www.phytozome.org/>), conforme descritos na Tabela 2.

As reações foram realizadas em termociclador da Stratagene Mx 3005P (Agilent Technologies), contendo o software MxPro-Mx 3005P, usando o kit Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific). O gene utilizado como controle endógeno (gene de referência) foi o da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase C2 (GAPC2) (Mafra et al., 2012).

As reações foram feitas em três réplicas, o volume utilizado na reação foi de 22 µL, contendo 100 ng de cDNA, 1 µL de cada primer específico (R+F) 10 µmol.L⁻¹ e 11 µL de Maxima® SYBR Green/ROX qRT-PCR Master Mix (2X) (Fermentas)(Tabela 2). Para testar a especificidade dos oligonucleotídeos, os produtos foram analisados por curva de dissociação. A

ciclagem de amplificação foi realizada nas seguintes etapas: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Essas etapas foram repetidas por 40 ciclos. Após a ciclagem de amplificação dos genes, foi realizada a dissociação dos produtos para confirmar a formação de produtos únicos e específicos, neste caso as etapas realizadas apresentaram as seguintes características: 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto e 95 °C por 1 segundo. Para quantificação da expressão utilizou-se o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak;Schmittgen, 2001), considerando a média dos valores de C_t das três réplicas realizadas.

Tabela 2: Oligonucleotídeos empregados nas análises de qRT-PCR.

Gene	Loco	Oligonucleotídeos
SOD	orange1.1g032551m	Forward: 5'-TAGGCTTGGGTAAATCCGTAGGA-3' Reverse: 5'-CTAATCGCCGGCTCCAAAG-3'
CAT	orange1.1g044386m	Forward: 5'-CCGATCACGAGGACCAATTT-3' Reverse: 5'-TTCAAGACCAAGCGTCCAAC-3'
APX	orange1.1g024615m	Forward: 5'-TATTGCCGTTAGGCTTTTGGGA-3' Reverse: 5'-GGTAACCTCAACGCCAACAAC-3'
GPX	orange1.1g027311m	Forward: 5'-GCTTGGAGATTCTGGCCTTTC-3' Reverse: 5'-TCAGCCTTAAAGCGAGTGCAT-3'
PPO	orange1.1g042556m	Forward: 5'-CTAACGTTTCATTGTGCTTATTGTG-3' Reverse: 5'-GAAATGGGAAAAATAGCCATGAGT-3'
*GAPC2	At1g13440	Forward: 5'-TCTTGCCTGCTTTGAATGGA-3' Reverse: 5'-TGTGAGGTCAACCACTGCGACAT-3'

*sequências dosoligonucleotídeosde acordo com Mafra et al. (2012).

4.12. Análise Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Realizou-se teste de Tukey e ANOVA para avaliar as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) nos parâmetros fisiológicos da curva PV, acúmulo de substâncias que reagem com TBARS e teor relativo de água. Para análise de área

foliar, fluorescência da clorofila *a*, atividade enzimática e quantificação relativa da expressão gênica utilizou-se ANOVA e o teste t de Student ($p \leq 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Teor relativo de água nas folhas

O teor relativo de água (TRA) nas folhas de laranjeira 'Westin' (*Citrus sinensis* L. Osb.) variou de acordo com a variedade porta-enxerto e com o regime hídrico empregado. Todas as variedades porta-enxerto decresceram o TRA na condição de deficiência hídrica, apesar de não apresentarem diferença significativa ($p \leq 0,05$), com exceção da variedade tangerineira 'Sunki Tropical' (Figura 9).

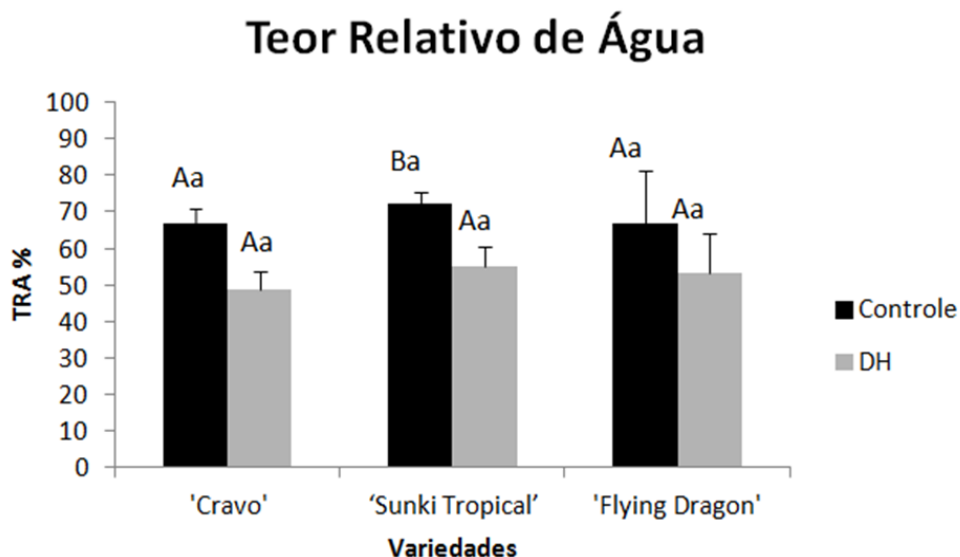


Figura 9: Teor relativo de água em folhas de plantas controle (irrigada) e sob deficiência hídrica (DH) de limão 'Cravo', tangerineira 'Sunki Tropical' e trifoliata 'Flying Dragon' durante o período do experimento. Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes, para cada genótipo, apresentam diferenças estatísticas pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Assim como médias seguidas por letras minúsculas diferentes, para cada tratamento, apresentam diferenças estatísticas pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

5.2. Taxa de crescimento foliar

Observou-se que o regime hídrico não afetou a taxa de crescimento foliar das plantas enxertadas sobre as três variedades porta-enxerto (Figura 10). Entretanto, diferenças na taxa de crescimento foliar foram observadas entre as variedades porta-enxerto, independente do regime hídrico. 'Cravo' e 'Sunki Tropical' proporcionaram uma taxa de crescimento foliar significativamente maior do que aquela de 'Flying Dragon', que possui como característica a indução de um efeito ananicante sobre as copas.

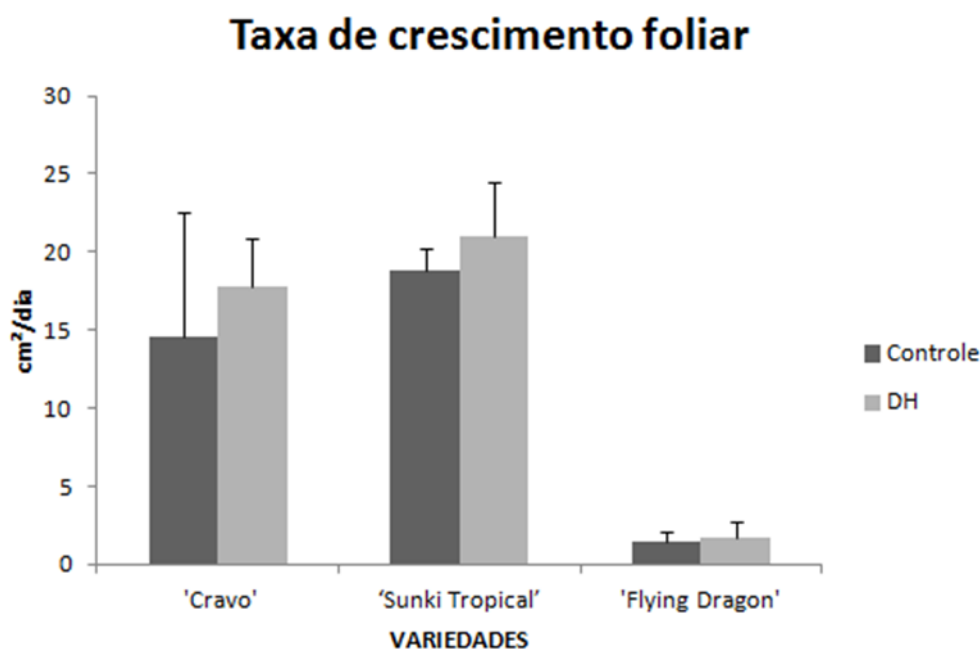


Figura 10: Estimativa da área foliar total de plantas controle e sob deficiência hídrica (DH) de limão 'Cravo', tangerineira 'Sunki Tropical' e trifoliata 'Flying Dragon' durante o período do experimento. Não foram observadas diferenças significativas entre tratamentos para cada variedade, de acordo com o Teste T de Student ($P \leq 0,05$).

5.3. Fluorescência da clorofila a

Em condições de ambientes estressantes ocorre o decréscimo característico na eficiência quântica potencial do fotossistema II (Cruz et al.,

2009). A partir dos resultados obtidos, observou-se que a eficiência fotossintética máxima das plantas, dada pela relação F_v/F_m , reduziu os seus valores na condição de deficiência hídrica em todos os genótipos avaliados. Entretanto, as diferenças observadas não apresentarem diferença significativa ($P \leq 0,05$).

As variedades 'Cravo' e 'Flying Dragon' não apresentaram qualquer diferença significativa ($P \leq 0,05$) com relação aos parâmetros de F_0 , F_m e F_v/F_m . Já a variedade 'Sunki Tropical' foi estatisticamente diferente ($P \leq 0,05$) na condição de déficit hídrico para o parâmetro F_0 , sem entretanto ocorrer nenhuma significância nos parâmetros F_m e F_v/F_m , como mostra a Tabela 3.

Tabela 3: Efeitos dos diferentes regimes hídricos na fluorescência clorofila *a* de folhas de laranjeira ‘Westin’ enxertadas em limão ‘Cravo’, tangerineira ‘Sunki Tropical’ e trifoliata ‘Flying Dragon’. Os valores são as médias de F_0 (fluorescência mínima), F_m (fluorescência máxima) e F_v/F_m (eficiência máxima do fotossistema II).

	Cravo			Tropical			Flying Dragon		
	Controle	Deficiência hídrica	Reidratação	Controle	Deficiência hídrica	Reidratação	Controle	Deficiência hídrica	Reidratação
F_0	6928.33 a	8394.33 a	7792.00 a	6687.33 a	7714.67 b	7169.67 a	6462 a	7136.33 a	6645.67 a
F_m	39457.33 a	39502.00 a	37324.67 a	39322.00 a	37016.00 a	37233.00 a	38730.33 a	33955.00 a	39837.00 a
F_v/F_m	0.82 a	0.79 a	0.79 a	0.83 a	0.79 a	0.81 a	0.83 a	0.79 a	0.83 a

Dentro de cada linha, letras diferentes indicam diferenças significativas em $P \leq 0,05$ (teste t) para médias da mesma variedade nos diferentes tratamento.

5.4. Curva PV

Os resultados da Tabela 4 mostram que o teor relativo de água no ponto de perda de turgor (RWC^{TLP}) aumentou significativamente quando as variedades 'Sunki Tropical' e 'Flying Dragon' foram submetidas à deficiência hídrica, ao contrário de 'Cravo', que não ocorreu diferenças significativas para este parâmetro de acordo com o regime hídrico. Estes dados estão de acordo com o aumento significativo no módulo de elasticidade (ϵ) de 'Sunki Tropical' e 'Flying Dragon', os quais indicam que as suas paredes celulares se tornaram mais rígidas com o déficit hídrico, o que afeta a manutenção da turgescência celular com a redução do volume de água. Com exceção de 'Cravo', as variedades 'Sunki Tropical' e 'Flying Dragon' também reduziram o potencial osmótico em plena turgescência (Ψ_0), o que demonstra a ocorrência de ajuste osmótico nessas variedades em função da deficiência hídrica, principalmente em 'Sunki Tropical'. 'Sunki Tropical' e 'Flying Dragon' também induziram menores potenciais osmóticos no ponto de perda de turgor (Ψ^{TLP}) do que 'Cravo', o que foi causado pelo fato das suas paredes celulares se tornarem menos elásticas em condições de deficiência hídrica.

A ocorrência de ajuste osmótico em 'Sunki Tropical' e 'Flying Dragon' provavelmente contribuiu para que essas variedades apresentassem um menor potencial osmótico no ponto de perda de turgor (Ψ^{TLP}), quando comparado com 'Cravo'.

Um decréscimo no módulo de elasticidade foi observado em plantas enxertadas sobre 'Cravo', demonstrando a ocorrência de ajuste elástico das paredes celulares, ou seja, de aumento da elasticidade dos tecidos, em plantas submetidas à deficiência hídrica.

Assim, mecanismos de ajustamento osmótico e da rigidez das paredes celulares induzidos por 'Sunki Tropical' e 'Flying Dragon' contribuíram para a adaptação das plantas às condições impostas de deficiência hídrica, enquanto que 'Cravo' induziu o ajuste elástico dos tecidos como estratégia para adaptação à seca.

Tabela 4: Média do teor relativo de água no ponto de perda de turgor (RWC^{TLP}), potencial osmótico em plena turgescência (Ψ_0), potencial osmótico no ponto de perda de turgor (Ψ^{TLP}), módulo de elasticidade (ϵ) e ajuste osmótico (AO) em folhas de laranjeira 'Westin' enxertadas em limoeiro 'Cravo', tangerineira 'Sunki Tropical' e trifoliata 'Flying Dragon' submetidos à diferentes regimes hídricos (n=3). Variedade (V) e Regime Hídrico (RH).

Curva PV	'Cravo'		'Sunki Tropical'		'Flying Dragon'		ANOVA		
	Controle	DH	Controle	DH	Controle	DH	V	RH	V x RH
RWC^{TLP} (%)	83.91 a	84.91 a	70.76 a	86.69 b	82.65 a	90.05 b	**	***	*
Ψ_0 (MPa)	-1.91 a	-1.61 a	-1.83 a	-2.06 a	-1.47 a	-1.56 a	*	ns	ns
Ψ^{TLP} (MPa)	-2.75 a	-2.28 b	-3.00 a	-2.53 a	-2.53 a	-2.43 a	*	***	ns
ϵ (MPa)	11.69 a	9.56b	6.25 a	14.52 b	8.67 a	14.23 b	ns	***	**
AO		-0.300		0.228		0.087			

Dentro de cada linha, letras diferentes indicam diferenças significativas em $P \leq 0,05$ para mesma variedade nos diferentes tratamentos. ns, ou *, ** e *** indicam diferenças não significativas ou significativas em $P < 0,05$, 0,01 e 0,001, respectivamente pelo teste de Tukey.

5.5. Teste histoquímico (DAB – HCl)

A detecção de H_2O_2 foi efetuada por meio da técnica de coloração histoquímica com DAB-HCl. DAB forma um polímero de coloração marrom-avermelhado na presença de H_2O_2 . Os resultados do teste revelaram um maior escurecimento dos discos foliares das variedades porta-enxerto submetidas à deficiência hídrica (Figura 11). Entretanto, os discos foliares de 'Flying Dragon' apresentaram um maior escurecimento do que aqueles de 'Cravo' e 'Sunki Tropical', tanto em condições controle como de deficiência hídrica (Figura 11). Esses resultados indicam que a deficiência hídrica induziu um maior acúmulo de H_2O_2 nas diferentes variedades porta-enxerto, sendo este acúmulo maior na variedade 'Flying Dragon'.

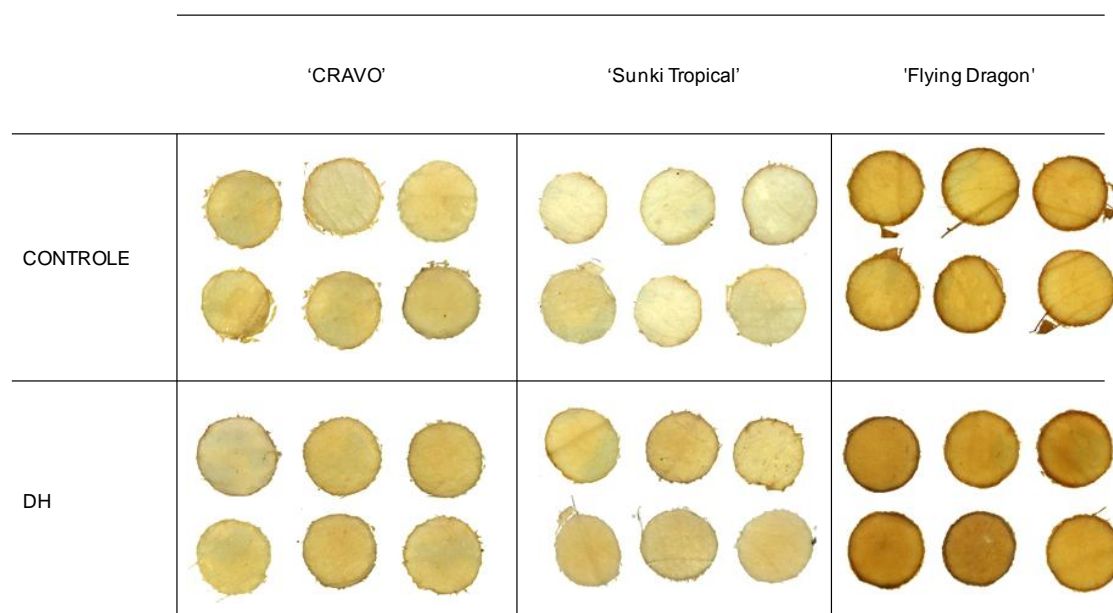


Figura 11: Acúmulo de peróxido de hidrogênio em discos foliares de folhas de laranjeira 'Westin' enxertadas em limoeiro 'Cravo', tangerineira 'Sunki Tropical' e trifoliata 'Flying Dragon' de plantas controle e sob deficiência hídrica, incubado com DAB-HCL (1 mg mL^{-1}).

5.6. Atividade Enzimática

Os resultados obtidos demonstram que o estresse oxidativo leva a uma ativação do sistema antioxidante da planta e que as atividades das enzimas em estudo, para os três regimes hídricos, foram diferencialmente requeridas.

5.6.1. Dismutase do Superóxido

A atividade da SOD apresentou diferenças significativas ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ e $p \leq 0,001$) quando as variedades porta-enxerto e regimes hídricos avaliados foram comparados com a respectiva atividade em 'Cravo' sob condições controle (Figura 12). Observou-se que a variedade tangerineira 'Sunki Tropical' apresentou menores valores de atividade de SOD nos diferentes regimes hídricos, revelando diferença significativa entre os tratamentos. 'Flying Dragon' apresentou maior atividade da SOD quando comparada com as demais variedades, independente do regime hídrico.

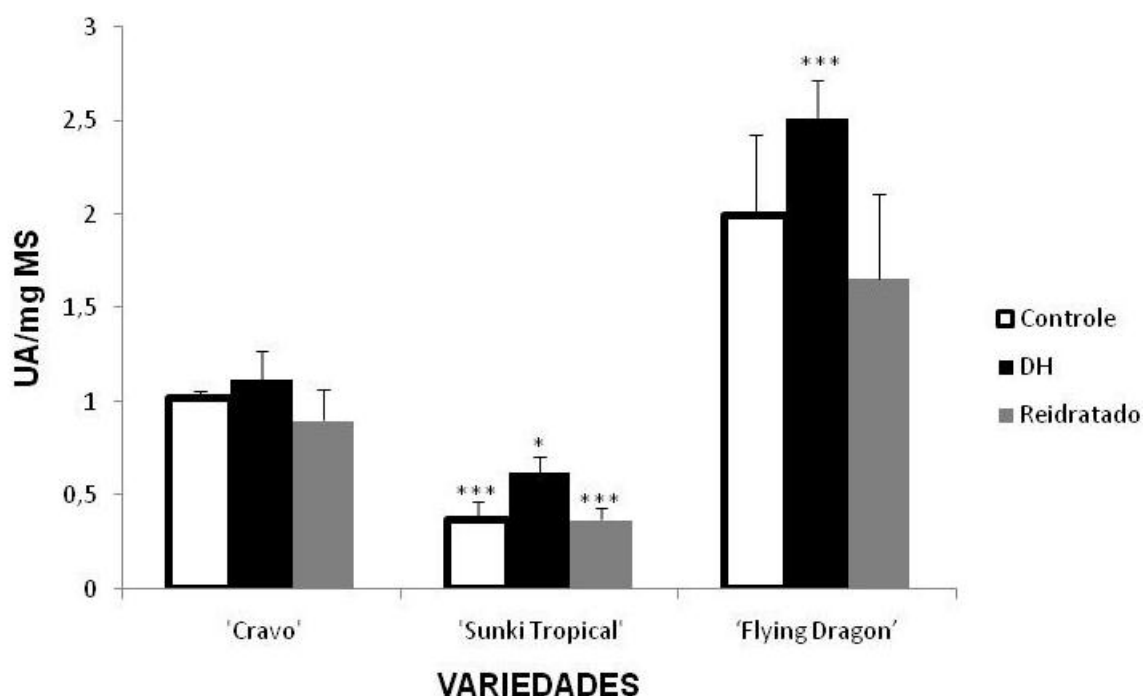


Figura 12: Atividade enzimática da SOD estimada em folhas de laranja 'Westin' enxertadas em limão 'Cravo', tangerineira 'Sunki Tropical' e trifoliata 'Flying Dragon' nos diferentes regimes hídricos. Médias seguidas por asterisco (*) para cada genótipo apresentam diferenças estatísticas pelo Teste T de Student (* - $P \leq 0,05$; ** - $p \leq 0,01$ e *** - $p \leq 0,001$) em relação ao tratamento controle da variedade limão 'Cravo'.

5.6.2. Catalase

Na variedade 'Cravo', observou-se que a atividade da catalase, no tratamento reidratado foi significativamente reduzida, quando comparada aos demais tratamentos dessa variedade (Figura 13). Já para 'Sunki Tropical', não foram observadas variações significativas na atividade da enzima CAT nos diferentes regimes hídricos, quando essas foram comparadas à atividade CAT em 'Cravo' sob condições controle. A variedade 'Flying Dragon' apresentou redução significativa tanto para o tratamento de deficiência hídrica quanto para o reidratado, o que não foi observado no seu tratamento controle (Figura 13).

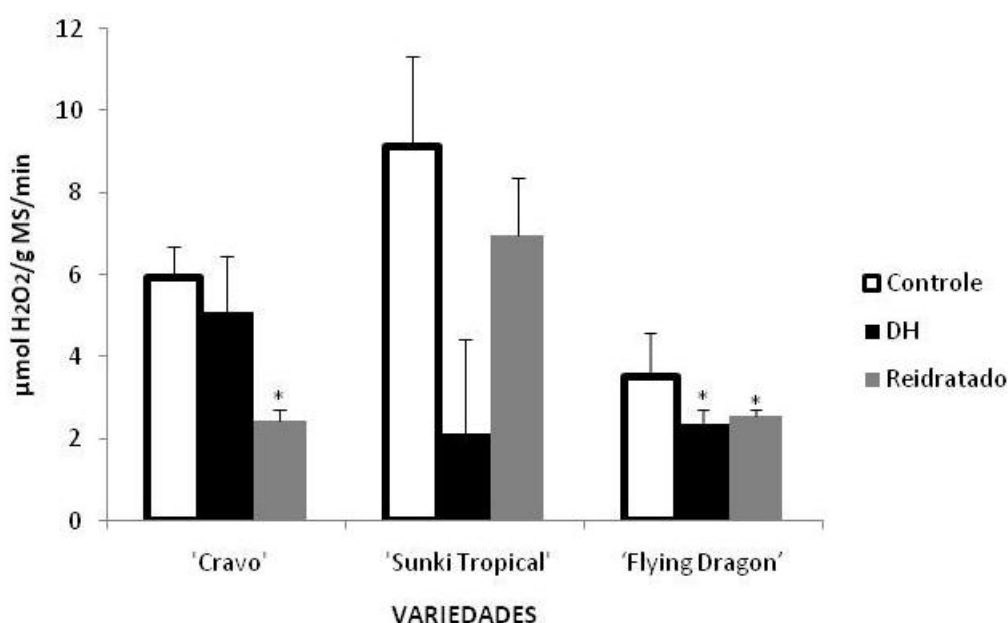


Figura 13: Atividade enzimática da CAT estimada em folhas de laranja 'Westin' enxertadas em limão 'Cravo', tangerineira 'Sunki Tropical' e trifoliata 'Flying Dragon' nos diferentes regimes hídricos. Médias seguidas por asterisco (*) para cada genótipo apresentam diferenças estatísticas pelo Teste T de Student (* - $P \leq 0,05$; ** - $p \leq 0,01$ e *** - $p \leq 0,001$) em relação ao tratamento controle da variedade limão 'Cravo'.

5.6.3. Peroxidase do Ascorbato

Na variedade 'Cravo', a atividade enzimática da APX foi estatisticamente maior no tratamento controle, do que nos regimes de deficiência hídrica e reidratado (Figura 14), indicando que esta variedade, naturalmente, apresenta uma maior ação enzimática da APX. Porém, a variedade 'Sunki Tropical', demonstrou um comportamento inverso à atividade desempenhada pela APX em 'Cravo', com uma redução significativa nos regimes controle, deficiência hídrica e reidratação, quando comparados ao controle de 'cravo'. A variedade 'Flying Dragon' também apresentou redução significativa ($p < 0,05$) na atividade APX entre os tratamentos aplicados nesse experimento (Figura 14).

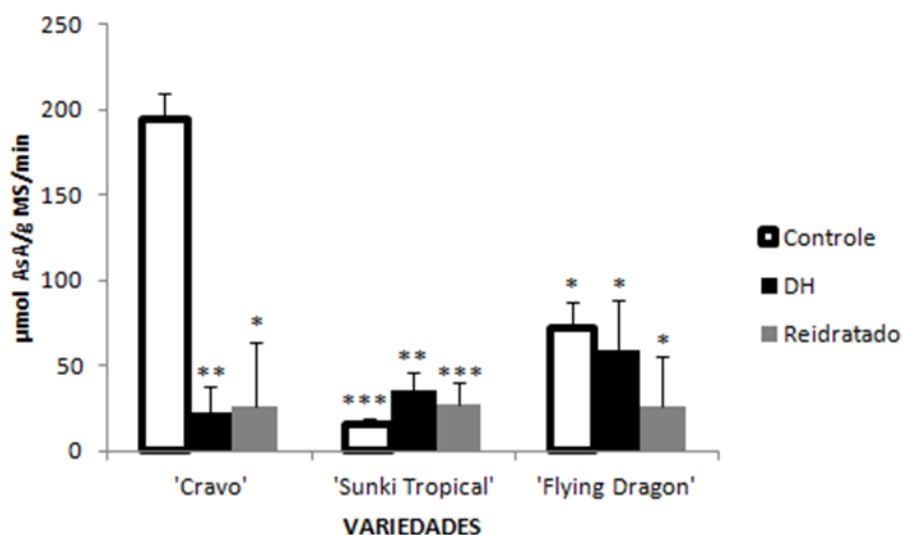


Figura 14: Atividade enzimática da APX estimada em folhas de laranja 'Westin' enxertadas em limão 'Cravo', tangerineira 'Sunki Tropical' e trifoliata 'Flying Dragon' nos diferentes regimes hídricos. Médias seguidas por asterisco (*) para cada genótipo apresentam diferenças estatísticas pelo Teste T de Student (* - $P \leq 0,05$; ** - $p \leq 0,01$ e *** - $p \leq 0,001$) em relação ao tratamento controle da variedade limão 'Cravo'.

5.6.4. Peroxidase do Guaiacol

A atividade enzimática da GPX foi reduzida significativamente na variedade 'Cravo', sob deficiência hídrica, mas induzida sob condições de

reidratação (Figura 15). Uma atividade de GPX significativamente maior também foi observada em 'Sunki Tropical' sob controle e de deficiência hídrica, quando comparada a atividade de GPX em 'Cravo' sob condições controle. Em 'Flying Dragon', a atividade de GPX foi significativamente maior em todos os regimes hídricos, sendo o tratamento de deficiência hídrica o que mais apresentou atividade desta enzima (Figura 15).

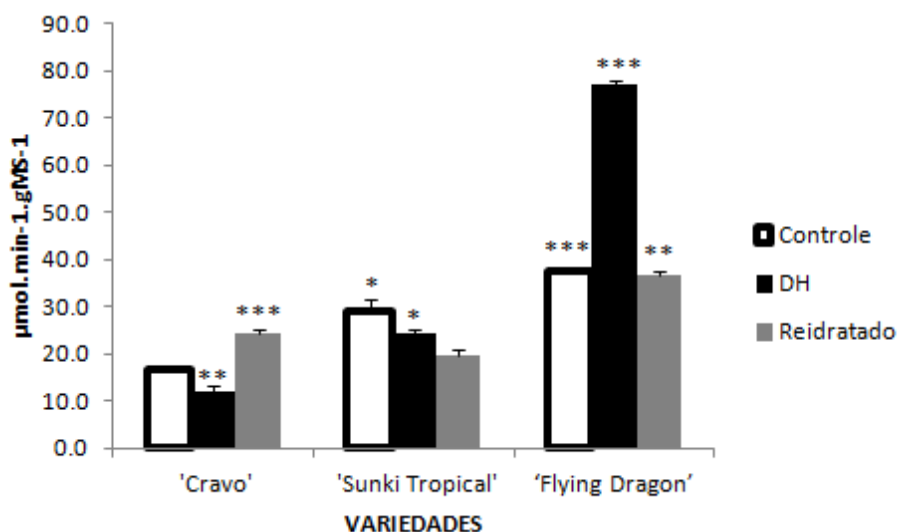


Figura 15: Atividade enzimática da GPX estimada em folhas de laranjeira 'Westin' enxertadas em limão 'Cravo', tangerineira 'Sunki Tropical' e trifoliata 'Flying Dragon' nos diferentes regimes hídricos. Médias seguidas por asterisco (*) para cada genótipo apresentam diferenças estatísticas pelo Teste T de Student (* - $P \leq 0,05$; ** - $p \leq 0,01$ e *** - $p \leq 0,001$) em relação ao tratamento controle da variedade limão 'Cravo'

5.6.5. Polifenoloxidase

A atividade da enzima PPO manteve-se similar em todos os regimes hídricos analisados e variedades porta-enxerto, não apresentando diferença significativa ($p \leq 0,05$) (Figura 16).

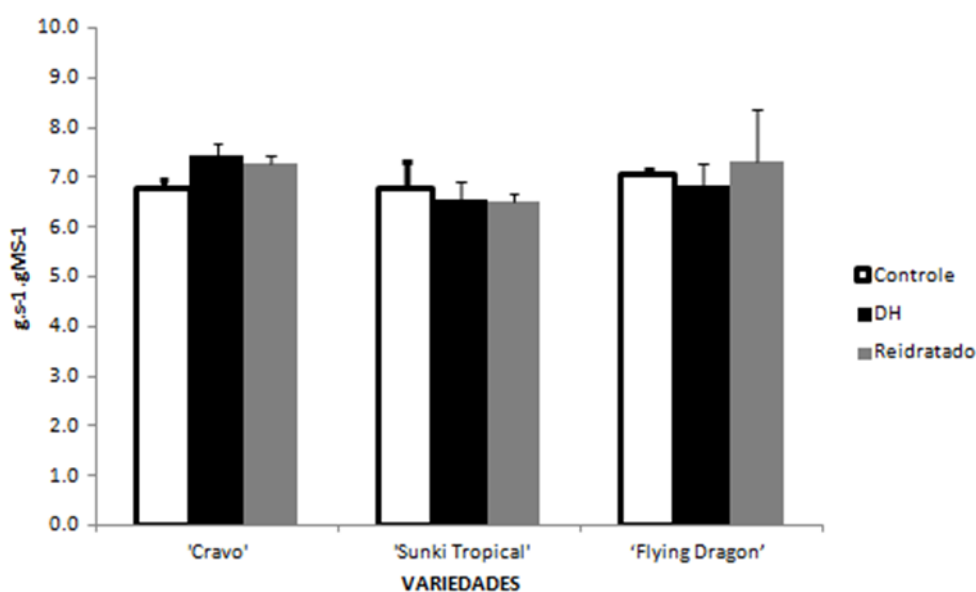


Figura 16: Atividade enzimática da PPO estimada em folhas de laranjeira 'Westin' enxertadas em limão 'Cravo', tangerineira 'Sunki Tropical' e trifoliata 'Flying Dragon' nos diferentes regimes hídricos. Médias seguidas por asterisco (*) para cada genótipo apresentam diferenças estatísticas pelo Teste T de Student (* - $P \leq 0,05$; ** - $p \leq 0,01$ e *** - $p \leq 0,001$) em relação ao tratamento controle da variedade limão 'Cravo'

5.6.6. Fenilalanina Amônia-Liase

A atividade enzimática da PAL revelou diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) para 'Cravo'. No tratamento de deficiência hídrica essa atividade foi aumentada, enquanto que na reidratação foi reduzida, quando comparadas ao controle de 'Cravo'. Já para a variedade 'Sunki Tropical' não observou-se diferenças significativas de atividade quando comparadas com o controle de 'Cravo'. Para 'Flying Dragon', notou-se um aumento significativo da atividade enzimática na condição de deficiência hídrica (Figura 17).

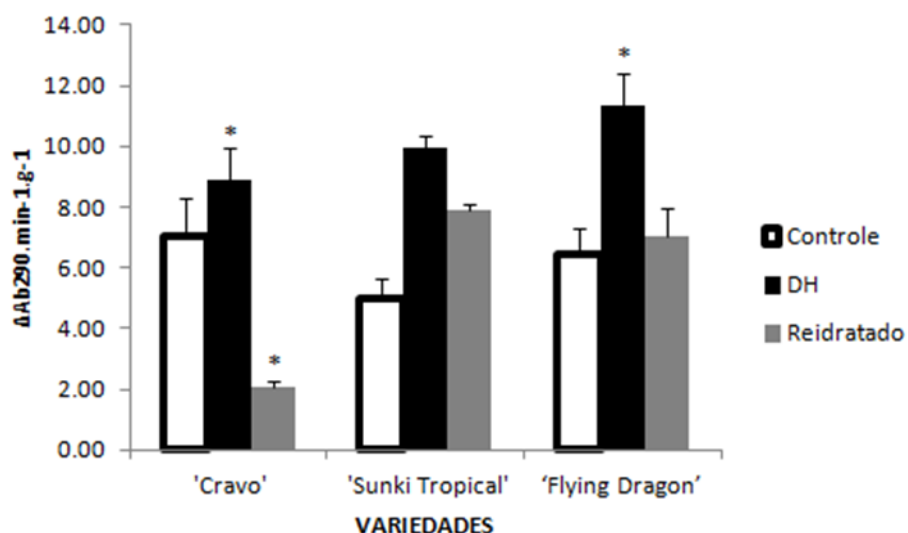


Figura 17: Atividade enzimática da PAL estimada em folhas de laranjeira 'Westin' enxertadas em limão 'Cravo', tangerineira 'Sunki Tropical' e trifoliata 'Flying Dragon' nos diferentes regimes hídricos. Médias seguidas por asterisco (*) para cada genótipo apresentam diferenças estatísticas pelo Teste T de Student (* - $P \leq 0,05$; ** - $p \leq 0,01$ e *** - $p \leq 0,001$) em relação ao tratamento controle da variedade limão 'Cravo'

5.7. Peroxidação lipídica

Todas as variedades porta-enxerto avaliadas induziram um maior acúmulo de substâncias que reagem com TBARS sob condições de deficiência hídrica (Figura 18). Entretanto, ao contrário de 'Cravo' e 'Sunki Tropical', 'Flying Dragon' não reduziu o grau de peroxidação das membranas após a reidratação.

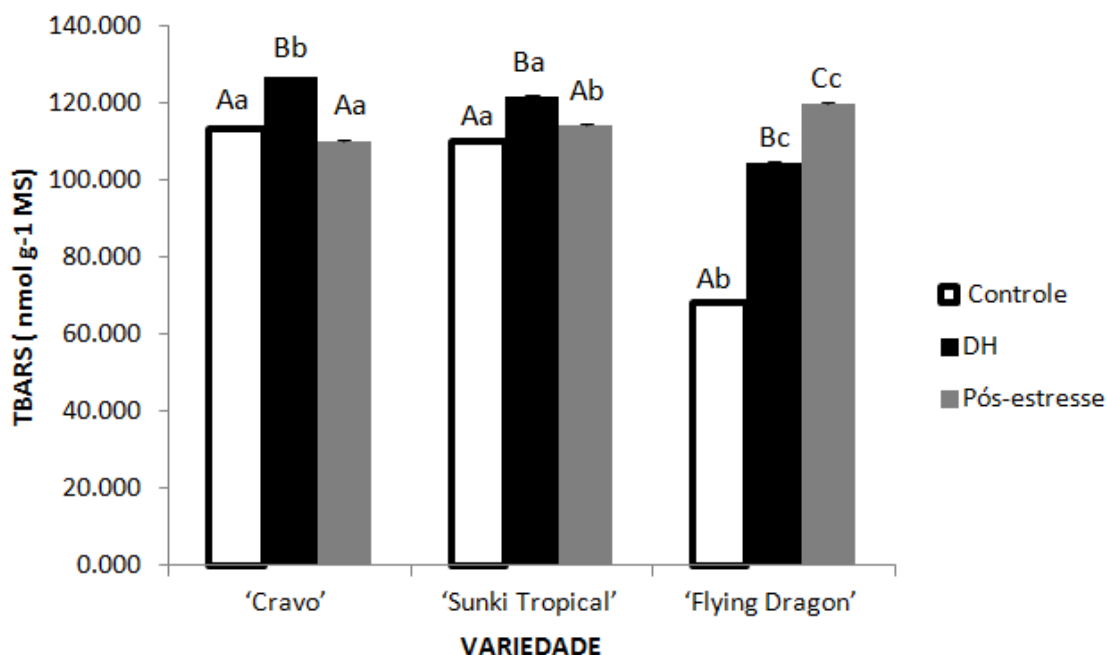


Figura 18: Conteúdo de TBARS em folhas de laranja 'Westin' enxertadas em limão 'Cravo', tangerineira 'Sunki Tropical' e trifoliata 'Flying Dragon' nos diferentes regimes hídricos. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas em $P \leq 0,05$ (teste de Tukey) para mesma variedade nos diferentes tratamentos. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas para as diferentes variedades num mesmo tratamento ($P \leq 0,05$ pelo teste de Tukey).

5.8. Expressão gênica (qRT-PCR)

A abundância de transcritos de alguns genes codificando para enzimas envolvidas em mecanismos antioxidativo, SOD, CAT, APX, GPX e PPO, foi investigada por qRT-PCR em folhas de laranja 'Westin' enxertadas em 'Cravo', 'Sunki Tropical' e 'Flying Dragon', submetidas aos diferentes regimes hídricos. Os resultados revelaram que todos os genes avaliados apresentaram expressão diferencial entre as diferentes variedades porta-enxerto e regimes hídricos. Em 'Cravo', SOD apresentou expressão diferencial entre os tratamentos, sendo mais expresso na condição de deficiência hídrica, com 1,4x, quando comparado ao seu controle (Figura 19). Entretanto, a sua expressão foi reprimida em 'Cravo' sob condições de reidratação. Já 'Sunki Tropical' não apresentou diferenças significativas ($P \leq 0,05$) na expressão relativa de SOD sob os diferentes regimes hídricos, quando comparados ao controle de 'Cravo'. Para 'Flying Dragon', observou-

se um expressão 1,6x maior de SOD na condição de deficiência hídrica, quando comparado a 'Cravo' sob condições controle.

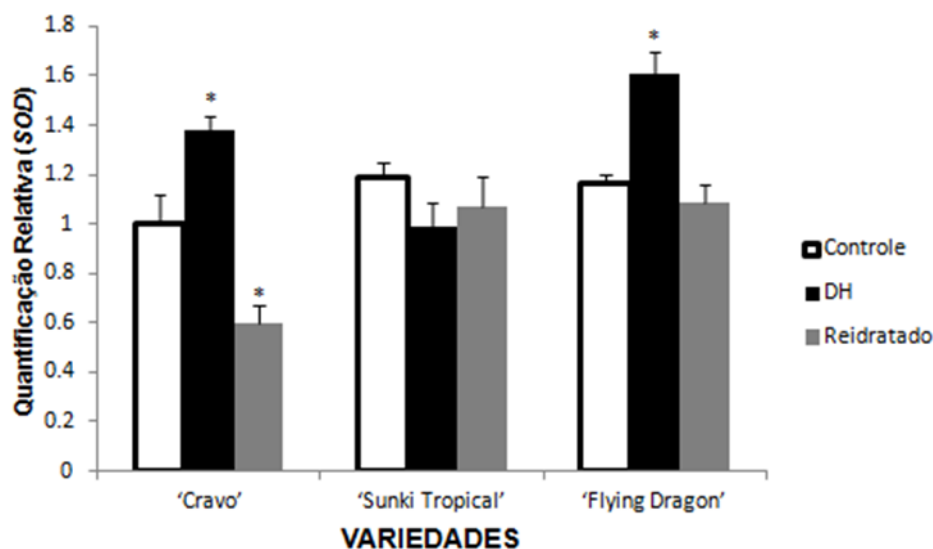


Figura 19: Análise da expressão do gene *SOD* em folhas de laranja 'Westin' enxertadas em limão 'Cravo', tangerineira 'Sunki Tropical' e trifoliata 'Flying Dragon' sob diferentes regimes hídricos. Os perfis de expressão foram determinados por qPCR. Os níveis de expressão foram normalizados ao valor correspondente da expressão do gene *GAPC2*. Os dados representam a média \pm EP (erro padrão) de três réplicas experimentais. Asterisco (*) indica diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao tratamento controle da variedade 'Cravo' pelo Teste T de Student.

A expressão relativa de *CAT* em 'Cravo' foi reduzida em 0,5x na condição de deficiência hídrica e 0,8x na condição de reidratação, quando comparadas com a condição controle. Já para 'Sunki Tropical' observou-se uma redução significativa ($P \leq 0,05$) nos diferentes regimes hídricos, quando comparados ao controle de 'Cravo', sendo o maior nível de redução da expressão, com 0,3x, observada na condição de deficiência hídrica. Em 'Flying Dragon', a expressão deste gene não apresentou diferença estatística ($P \leq 0,05$) nas condições controle e de deficiência hídrica. Porém notou-se uma redução significativa de 0,4x da expressão desse gene na condição de reidratação (Figura 20).

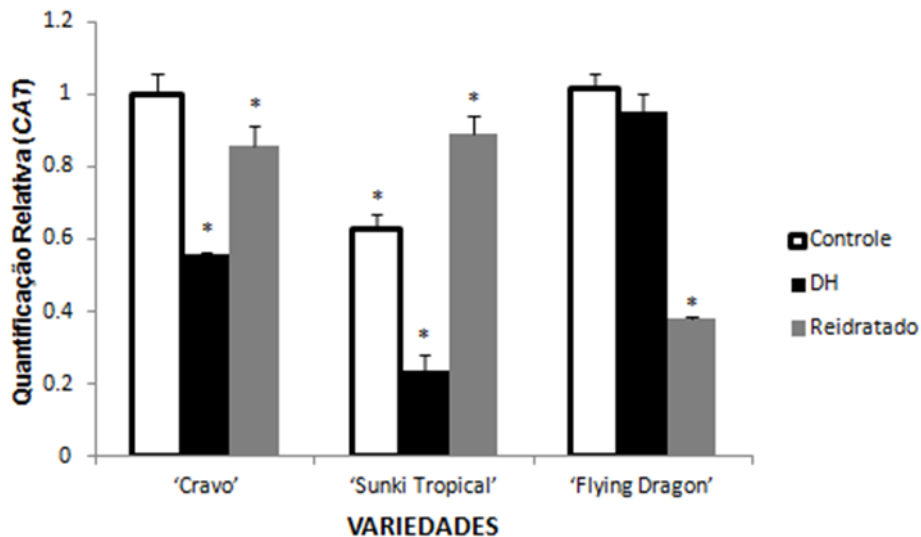


Figura 20: Análise da expressão do gene *CAT* em folhas de laranjeira 'Westin' enxertadas em limão 'Cravo', tangerineira 'Sunki Tropical' e trifoliata 'Flying Dragon' sob diferentes regimes hídricos. Os perfis de expressão foram determinados por qPCR. Os níveis de expressão foram normalizados ao valor correspondente da expressão do gene *GAPC2*. Os dados representam a média \pm EP (erro padrão) de três réplicas experimentais. Asterisco (*) indica diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao tratamento controle da variedade 'Cravo' pelo Teste T de Student.

Avaliando a expressão relativa de *APX* em 'Cravo', não foram observadas diferenças significativas entre os regimes hídricos aplicados. Já na variedade 'Sunki Tropical' notou-se diferença significativa ($P \leq 0,05$) nos tratamentos controle e deficiência hídrica, tendo sua expressão reduzida em 0,6x cada, quando comparados ao controle de 'Cravo'. O perfil observado em 'Flying Dragon' foi um decréscimo significativo de 0,5x na expressão de *APX* na condição de reidratação (Figura 21).

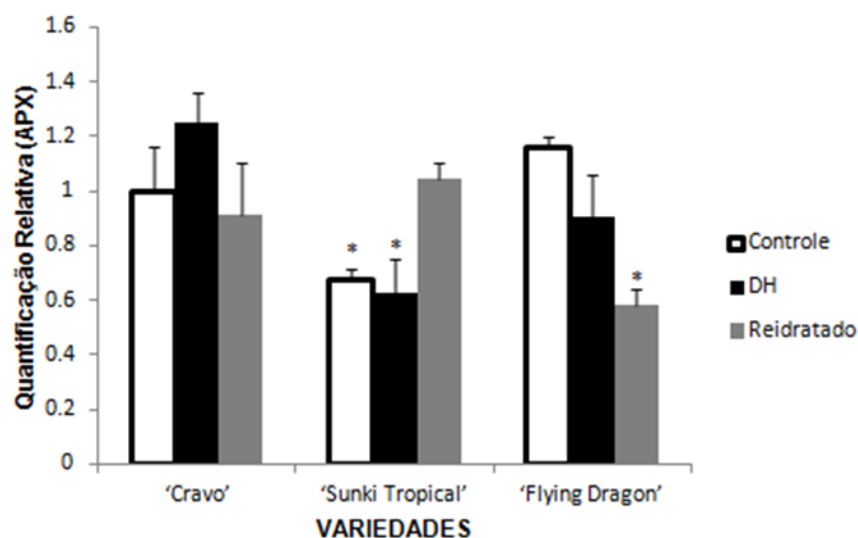


Figura 21: Análise da expressão do gene *APX* em folhas de laranja 'Westin' enxertadas em limão 'Cravo', tangerineira 'Sunki Tropical' e trifoliata 'Flying Dragon' sob diferentes regimes hídricos. Os perfis de expressão foram determinados por qPCR. Os níveis de expressão foram normalizados ao valor correspondente da expressão do gene *GAPC2*. Os dados representam a média \pm EP (erro padrão) de três réplicas experimentais. Asterisco (*) indica diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao tratamento controle da variedade 'Cravo' pelo Teste T de Student.

Com relação à expressão relativa de *GPX*, 'Cravo', 'Sunki Tropical' e 'Flying Dragon' apresentaram uma indução significativa na expressão do gene na condição de deficiência hídrica, de 2,1x, 5,3x e 1,6x, respectivamente, quando comparado a 'Cravo' sob condições controle (Figura 22). Não foram observadas diferenças significativas de expressão gênica na condição de reidratação para as diferentes variedades analisadas, com exceção de 'Sunki Tropical', cuja expressão do gene foi significativamente reprimida, em 0,7x, quando comparada ao controle de 'Cravo'.

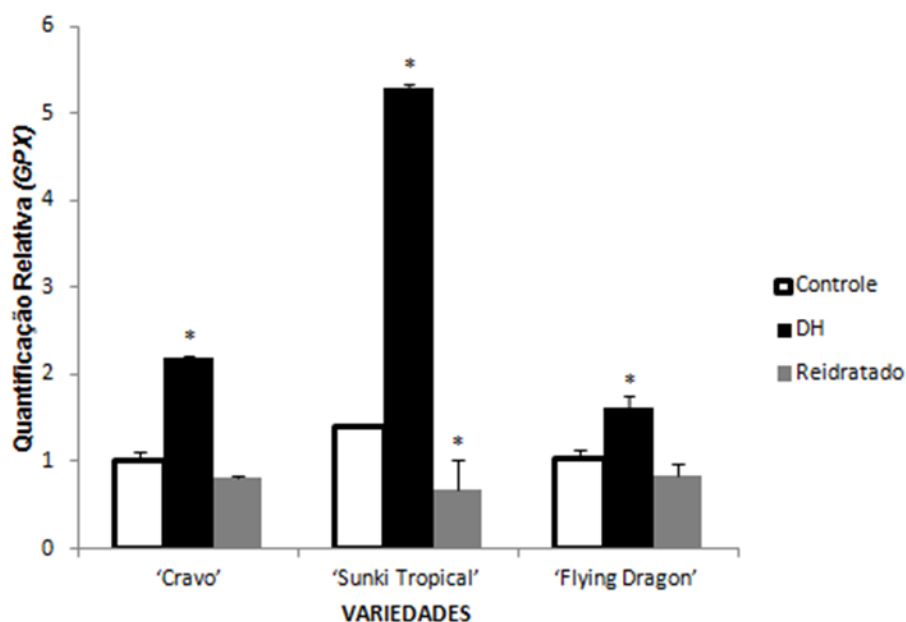


Figura 22: Análise da expressão do gene *GPX* em folhas de laranja 'Westin' enxertadas em limão 'Cravo', tangerineira 'Sunki Tropical' e trifoliata 'Flying Dragon' sob diferentes regimes hídricos. Os perfis de expressão foram determinados por qPCR. Os níveis de expressão foram normalizados ao valor correspondente da expressão do gene *GAPC2*. Os dados representam a média \pm EP (erro padrão) de três réplicas experimentais. Asterisco (*) indica diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao tratamento controle da variedade 'Cravo' pelo Teste T de Student.

Com relação de *PPO*, observou-se que a sua expressão em 'Cravo' foi significativamente induzida nas condições de deficiência hídrica (11x) e reidratação (18x) (Figura 23). 'Sunki Tropical' também apresentou uma indução significativa ($P \leq 0,05$) na expressão desse gene nos diferentes regimes hídricos (4x no controle, 10x em deficiência hídrica e 4x em reidratação), quando comparado à 'Cravo' sob condições controle (Figura 23). Para 'Flying Dragon', houve umaumento significativo de 20x na expressão gênica de *PPO*, na condição controle, quando comparado ao controle de 'Cravo'. Já na condição de reidratação, a expressão desse gene foi significativamente reprimida, em 0,2x, quando comparado a 'Cravo' controle (Figura 23).

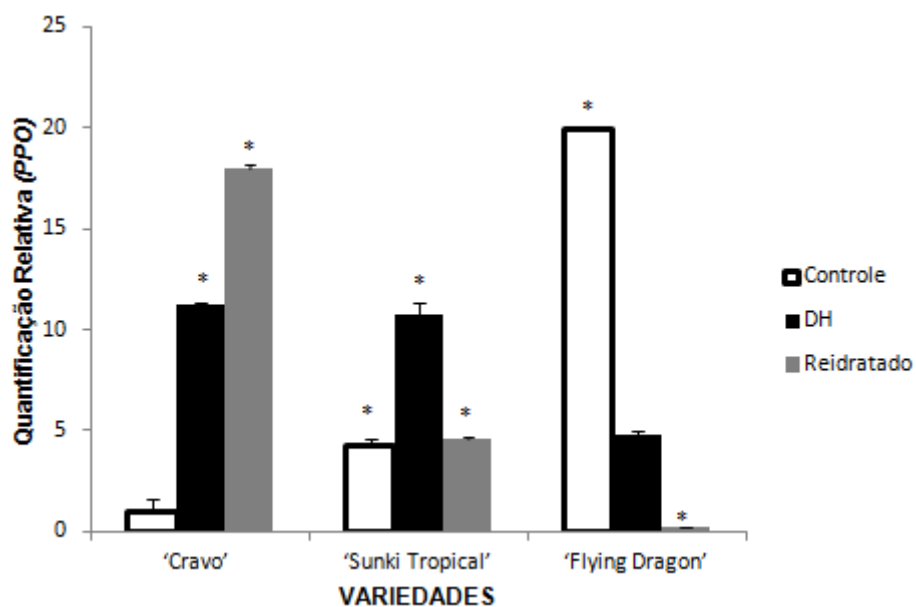


Figura 23: Análise da expressão do gene *PPO* em folhas de laranjeira 'Westin' enxertadas em limão 'Cravo', tangerineira 'Sunki Tropical' e trifoliata 'Flying Dragon' sob diferentes regimes hídricos. Os perfis de expressão foram determinados por qPCR. Os níveis de expressão foram normalizados ao valor correspondente da expressão do gene GAPC2. Os dados representam a média \pm EP (erro padrão) de três réplicas experimentais. Asterisco (*) indica diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao tratamento controle da variedade 'Cravo' pelo Teste T de Student.

6. DISCUSSÃO

O uso eficiente da água permite uma maior longevidade das plantas quando estas se encontrem em condições adversas, como seca. O TRA reflete a dinâmica do balanço da água na folha, isto é, o resultado entre a quantidade de água que entra na folha e a que sai por transpiração (Machado et al., 1999). O TRA não foi afetado significativamente pela imposição dos diferentes regimes hídricos (controle e deficiência hídrica) em 'Cravo' e 'Flying Dragon', conforme mostrado na Figura 9. Contudo, o TRA em folhas de 'Sunki Tropical' apresentou redução significativa sob condições de deficiência hídrica, demonstrando que os mecanismos de ajustamento osmótico e da rigidez das paredes celulares (Tabela 4) não foram suficientes para garantir a manutenção da turgescência foliar nesta variedade. Já as demais variedades estudadas apresentaram capacidade semelhante de retenção de água nas células do mesofilo foliar entre as condições de disponibilidade e de deficiência hídrica.

Comparando-se os resultados obtidos no presente estudo com aqueles relatados na literatura, verifica-se que Machado et al. (1999), usando laranjeira 'Valência' enxertada sobre limão 'Cravo' e trifoliata (*Poncirus trifoliata* Raf.), observaram que os valores de TRA foliar se mantiveram constantes até o limite de 13-15% de umidade do solo (potencial hídrico foliar entre -0,8 e -2,0 MPa), independentemente do porto-enxerto utilizado. Abaixo desse limite, reduções significativas no TRA foliar foram observadas em ambas as variedades. Por outro lado, García-Sánchez et al. (2007), utilizando pé-francos dos porta-enxertos citrange 'Carrizo' e tangerineira 'Cleópatra',

observaram redução significativa no TRA foliar de ambas variedades, nove dias após a suspensão da irrigação (potencial hídrico foliar entre -2,5 e -3,0 MPa), sendo essa redução maior em 'Carrizo' do que em 'Cleópatra'. Portanto, a não observância de variações significativas no TRA foliar em duas das três variedades avaliadas no presente estudo provavelmente se deve as condições moderadas de deficiência hídrica imposta (potencial hídrico foliar entre -1,5 à -2,0 MPa).

A estimativa da taxa de crescimento foliar revelou que não houve diferenças significativas neste parâmetro em função do regime hídrico, independente da variedade porta-enxerto avaliada. Entretanto, 'Flying Dragon' apresentou uma reduzida taxa de crescimento comparado com as demais variedades porta-enxerto. Este reduzido crescimento é atribuído ao fato de 'Flying Dragon' induzir uma redução do porte em variedades de laranja doce nele enxertadas (Cantuarias-Avilés et al., 2011).

Neves et al. (2013), em estudos com pé-francos de limão 'Cravo' e tangerineira 'Sunki Maravilha' em regimes hídricos controlados, também encontraram o mesmo comportamento para limão 'Cravo'. Este tipo de resposta apresentada pelas variedades porta-enxerto pode indicar a existência de algum mecanismo de adaptação à seca, uma vez que o crescimento das plantas foi mantido sob condição estressante.

A dinâmica de redução da perda de água por transpiração induzida pelo fechamento estomático gera decréscimos na assimilação do CO₂ e na eficiência quântica do fotossistema II (PSII). Os resultados obtidos neste estudo mostram que apesar dos diferentes regimes hídricos aplicados, os parâmetros de F₀, F_m e F_v/F_m não diferiram significativamente entre as variedades avaliadas. Provavelmente esses resultados se devem as condições moderadas de deficiência hídrica impostas no presente estudo.

Cruz et al. (2009), em estudos de fluorescência da clorofila *a* em folhas de tangerineira 'Ponkan' e limeira ácida 'Tahiti', observaram uma redução da eficiência quântica potencial do fotossistema II (F_v/F_m) em plantas submetidas a deficiência hídrica (potencial hídrico foliar de -3,22 MPa para 'Tahiti' e -3,9 MPa para 'Ponkan') e uma recuperação quando em condição de reidratação, corroborando com os nossos resultados. Segundo esses autores, essa observação pode caracterizar danos que supõe estar

relacionados à redução da concentração intercelular de CO₂, em razão do fechamento estomático, além do aumento na peroxidação lipídica.

Ao contrário de 'Cravo', plantas enxertadas sobre 'Sunki Tropical' e 'Flying Dragon' apresentaram um acentuado declínio em Ψ_0 e Ψ^{TLP} , juntamente com um aumento significativo de ε , sob condições de deficiência hídrica (Tabela 4). A redução de Ψ_0 indica a ocorrência de ajuste osmótico (AO), enquanto o aumento de ε demonstra um ajuste na rigidez das paredes celulares nestas variedades. Sabe-se que o AO melhora o estado hídrico das plantas sob condições de deficiência hídrica, permitindo a continuidade de absorção de água pela planta em potenciais de água mais baixos no solo, favorecendo a manutenção da turgescência celular, necessário para a abertura estomática, sustentação da fotossíntese e do crescimento (Rodríguez-Gamir et al., 2010). Alguns autores sugerem que a planta ao realizar o AO se aclimata aquela condição imposta, servindo dessa forma, como critério de tolerância (Medina et al., 1999; 2005). Mecanismos de ajustamento da rigidez das paredes celulares foram empregados por 'Sunki Tropical' e 'Flying Dragon' como estratégias para manutenção da turgescência foliar em condições de deficiência hídrica, já que quando as paredes celulares tornam-se menos elásticas, o potencial hídrico foliar é reduzido mais rapidamente para um dado declínio no conteúdo relativo de água (RWC) foliar (Lenz et al. 2006). Elevados valores de ε e baixos valores de Ψ_0 são indicativos de processo de "hardening" e podem representar mecanismos fundamentais de adaptação à seca em laranja doce enxertada nestas variedades porta-enxerto. Por outro lado, a ausência de alterações nestes parâmetros em plantas enxertadas sobre 'Cravo' sugere que o ajuste da elasticidade das paredes celulares é um importante mecanismo de adaptação à seca induzido por esta variedade porta-enxerto. Visto que ε controla os valores de RWC^{TLP} (Savé et al., 1995), tecidos mais elásticos requerem uma maior desidratação a fim de atingirem o ponto de perda de turgor, conforme pôde ser observado em 'Cravo', que apresentou um menor valor de RWC^{TLP} em comparação com as demais variedades. Além disso, tecidos mais elásticos tendem a reduzir as flutuações no turgor e potencial hídrico foliar durante o curso da desidratação, auxiliando a amenizar os

efeitos das variações de curto prazo do conteúdo de água nas plantas (DaMatta et al., 2003).

Pérez-Pérez et al. (2009) em estudos com plantas de Limão 'Fino 49' de 13 anos de idade não observaram diferenças significativas nos parâmetros de RWC^{TLP} , Ψ_0 , Ψ^{TLP} , ε e AO em folhas maduras e imaturas de plantas submetidas a deficiência hídrica (potencial hídrico foliar de $\sim -2,0$ MPa) sob condições de campo. Entretanto, alterações significativas destes parâmetros foram observados pelos autores em plantas submetidas a estresse salino. Já Rodríguez-Gamir et al. (2010), avaliando respostas dos porta-enxertos *Poncirus trifoliata* (PT), tangerineira 'Cleópatra' (CM), Forner-Alcaide 5 (FA-5) e laranjeiras Valência enxertadas sobre esses três porta-enxertos (V/PT, V/CM e V/FA-5), observaram redução significativa nos valores de Ψ_0 , e consequente ajuste osmótico, apenas em plantas de CM, FA-5, V/PT e V/FA5 submetidas à deficiência hídrica (potencial hídrico foliar $> -3,0$ MPa). Esses resultados corroboram com aqueles relatados por García-Sánchez et al (2007), que observaram a ocorrência de ajuste osmótico apenas em pé-francos de 'Cleópatra', e não de trifoliata, quando submetidos a condições de déficit hídrico (potencial hídrico foliar entre $-2,5$ e $-3,0$ MPa). Portanto, esses resultados reforçam as observações de que a combinação copa/porta-enxerto altera o comportamento das plantas frente a deficiência hídrica.

Alguns autores sugerem que o declínio de Ψ_0 (MPa) em folhas de plantas estressadas pode ser o resultado do acúmulo de solutos, tais como prolina e açúcares solúveis, e de certos íons inorgânicos, que permitem manter uma turgescência foliar positiva, necessária para abertura estomática e manutenção das trocas gasosas (García- Sánchez et al , 2007; Pérez-Peréz et al, 2009). Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que um aumento nas concentrações de soluto responsáveis pelo AO foi proporcionado pelo processo passivo de perda de água, conforme redução nos valores de TRA observada sob condições de deficiência hídrica.

Os estresses bióticos e abióticos causam efeitos citotóxicos por meio do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS). O acúmulo de ROS provoca estresse oxidativo, que afeta negativamente o crescimento, desenvolvimento e/ou a produtividade (Mittler, 2002; Soares; Machado,

2007). Como mecanismo de defesa contra ROS, as plantas possuem um sistema antioxidante para minimizar o efeito do estresse oxidativo, aumentando a atividade de enzimas antioxidantes que protegem os tecidos vegetais. SOD, CAT, APX, GPX, PPO e PAL são enzimas integrantes desse sistema (Apel; Hirt, 2004; Scandalios, 2005; Soares; Machado, 2007). Tem-se evidenciado que a adição de H₂O₂ em tecidos foliares ou sua indução endógena age como um sinal de indução para a expressão de genes referentes à catalase, peroxidase do ascorbato, peroxidase do guaiacol e peroxidase de glutathione (Soares; Machado, 2007).

O acúmulo de H₂O₂ foi avaliado pela técnica de coloração histoquímica com DAB-HCl (Figura 11). Comparando-se o escurecimento dos tecidos entre as variedades estudadas e o regime hídrico, observa-se que 'Flying Dragon' produziu mais H₂O₂ do que as demais variedades, tanto em condições controle como de deficiência hídrica. Por outro lado, discos foliares de 'Cravo' e 'Sunki Tropical' apresentaram uma coloração levemente mais intensa na condição de deficiência hídrica. Esses resultados indicam a severidade do estresse oxidativo, que variou de acordo com a variedade e regime hídricos, sendo 'Cravo' e 'Sunki Tropical' mais tolerantes ao estresse oxidativo do que 'Flying Dragon'.

Quando as enzimas antioxidantes não atuam de forma eficiente na eliminação das ROS geradas, a peroxidação lipídica se torna mais evidente, sendo este o principal sintoma atribuído ao dano oxidativo, frequentemente utilizada como um indicador de dano às membranas celulares (Hernandez et al., 2002). As variedades 'Cravo' e 'Sunki Tropical' aumentaram o conteúdo de substâncias que reagem com o ácido Tiobarbitúrico (TBARS) na condição de deficiência hídrica, mais conseguiram reduzi-lo na condição de rehidratação. Em contraste, 'Flying Dragon', apresentou um aumento da peroxidação lipídica tanto em condições de deficiência hídrica como em condições de pós-efeito. Esses dados são consistentes com os resultados obtidos de acúmulo de peróxido nos tecidos.

Deuner et al. (2011), utilizando plantas de 8 meses de idade de café (Catuaí IAC 99) submetidas a restrição de água no solo, observaram que sobre estresse moderado (-2,0 MPa) as plantas apresentaram mecanismos sincronizados de enzimas antioxidantes e preservação da integridade das

membranas. Com a persistência do estresse, houve um desequilíbrio entre produção e remoção de H_2O_2 até um ponto crítico, quando o potencial de água caiu para -2,5 MPa, gerando um aumento da concentração de H_2O_2 , com efeito deletério sobre a peroxidação dos lipídios.

A SOD atua como uma primeira barreira enzimática contra o estresse oxidativo, por converter o $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 (Hossain et al., 2009). Foram observadas diferenças significativas na atividade de SOD entre os diferentes regimes hídricos, quando comparadas ao controle de 'Cravo', independente da variedade estudada. Em 'Flying Dragon', notou-se uma maior atividade da enzima quando esta estava submetida a deficiência hídrica, indicando que a alta atividade da SOD contribuiu para o maior acúmulo de H_2O_2 e peroxidação lipídica observada nesta variedade.

Após dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 pela SOD, outras enzimas são acionadas para eliminar o peróxido de hidrogênio, como a catalase (CAT), transformando H_2O_2 em água e O_2 (Neto et al., 2012). Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a atividade da CAT não foi induzida sob condições de deficiência hídrica nas diferentes variedades. Entretanto, a observação de que a atividade de CAT foi significativamente menor em 'Flying Dragon' do que nas demais variedades sugere uma das prováveis causas do maior acúmulo de H_2O_2 e peroxidação lipídica nesta variedade, já que esta enzima é considerada uma das mais eficientes no processo de remoção de H_2O_2 (Gill; Tuteja, 2010).

As peroxidases do ascorbato (APX) e do guaiacol (GPX), assim como a CAT, também operam na remoção do H_2O_2 (Perl-Treves; Perl, 2002) com auxílio de agentes redutores. Os resultados obtidos demonstram que a APX não contribuiu como mecanismo antioxidativo, ao contrário de GPX, que contribuiu como mecanismo antioxidante na maioria das variedades, com exceção de 'Cravo' sob deficiência hídrica. Em 'Flying Dragon', a atividade de GPX foi maior como mecanismo de remoção de H_2O_2 em condições de deficiência hídrica, quando comparado ao controle de 'Cravo', sugerindo que essa enzima tenha sido utilizada como mecanismo antioxidativo.

Lei et al. (2006), usando mudas de *Populus przewalskii* Maximowicz expostas a três diferentes regimes hídricos (100, 50, e 25 % da capacidade do campo) em casa de vegetação, observaram que as plantas aumentaram

significativamente os níveis de ácido abscísico, radical superóxido e H_2O_2 como mensageiros secundários em condição de deficiência hídrica, de modo a induzir todo o conjunto de sistemas antioxidantes, aumentando a atividades das enzimas SOD, APX e GPX.

As enzimas PPO e PAL são importantes nos processos de lignificação, deposição de suberina e oxidação de compostos fenólicos (Schwan-Estrada; Stangarlin; Pascholati, 2008), podendo sofrer variações em suas atividades devido a estresses abióticos. A PAL é uma enzima chave na via dos fenilpropanóides (Schwan-Estrada; Stangarlin; Pascholati, 2008), principal rota responsável pela síntese de compostos fenólicos em plantas (Taiz; Zeiger, 2006). A ação da PPO está relacionada com a formação de ligações cruzadas entre grupos fenólicos em proteínas de parede, pectinas e outros polímeros de parede, unindo-os de maneira complexa (Taiz; Zeiger, 2009). Não foram observadas diferenças significativas na atividade de PPO entre as variedades e regimes hídricos avaliados. Entretanto, a atividade da PAL aumentou sob condições de deficiência hídrica em 'Cravo' e 'Flying Dragon', quando comparadas ao controle de 'Cravo'. Esses resultados sugerem um possível envolvimento dessa enzima na formação de parede celular, e possivelmente no enrijecimento da parede em 'Flying Dragon', nas condições avaliadas, corroborando com os dados obtidos de ϵ (Tabela 4).

No presente trabalho, avaliou-se também a expressão de alguns genes envolvidos nas vias de combate ao estresse oxidativo, de modo a verificar a contribuição de cada um para as atividades enzimáticas observadas. De modo geral, observou-se uma correlação entre a expressão gênica de SOD, CAT, APX e GPX e os respectivos dados de atividade enzimática, indicando que os genes avaliados contribuem para a atividade dessas enzimas. Por exemplo, a indução na expressão gênica de SOD e GPX na variedade 'Flying Dragon' sob deficiência hídrica correlacionou com a indução na atividade de suas respectivas enzimas. Para os casos em que não houve correlação entre a expressão gênica e atividade enzimática, os resultados sugerem a ocorrência de mecanismos de regulação pós-transcricional da expressão gênica, como observado para PPO.

7. CONCLUSÃO

- As variedades 'Sunki Tropical' e 'Flying Dragon' induzem ajustes osmótico e da rigidez das paredes celulares como mecanismos de adaptação à deficiência hídrica, enquanto que 'Cravo' utiliza como estratégia a manutenção da elasticidade dos tecidos sob deficiência hídrica;
- 'Cravo' e 'Sunki Tropical' possuem uma maior capacidade no controle de estresse oxidativo em condições de deficiência hídrica do que 'Flying Dragon', sugerindo que o sistema antioxidante desempenha um importante papel na tolerância à seca das variedades porta-enxerto;
- A maior capacidade de controle do estresse oxidativo sob deficiência hídrica observada em 'Cravo' e 'Sunki Tropical' correlaciona-se com as menores atividades de SOD e maiores atividades de CAT em comparação com 'Flying Dragon', que utiliza GPX como sistema antioxidante;

8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AHUJA, I.; et al. Plant molecular stress responses face climate change. ***Trends in Plant Science***, v.15, p. 664-674, 2010.
- ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. ***Journal Experimental Botany***, v.53, p.1331-1341, 2002.
- ALVARENGA, T. C. et al., Polifenoloxidase: uma enzima intrigante. Ciência & Tecnologia: FATEC-JB, ***Jaboticabal***, v. 3, p. 83-93, 2011.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. ***Annual Review of Plant Biology***, v. 55, p. 373–99, 2004.
- ASADA, K. The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. ***Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology***. v. 50, p. 601–639, 1999.
- ASADA, K. e TAKAHASHI, M. “Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis,” in Photoinhibition: Topics of Photosynthesis, D. J. Kyle, C. B. Osmond, and C. J. Arntzen. ***Elsevier***, v.9, p. 227–287, 1987.
- ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. ***Plant Physiology***, v. 141, p. 391-396, 2006.
- AZEVEDO, R. A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation in leaves and roots of wild-type and catalase mutant of barley. ***Physiologia Plantarum***, v. 104, p. 280-292, 1998.
- AULER, P. A. M.; FIORI-TUTIDA, A. C. G.; TAZIMA, Z. H. Comportamento da laranjeira ‘valência’ sobre seis porta-enxertos no Noroeste do Paraná. ***Revista Brasileira de Fruticultura***, v. 30, p. 229-234, 2008

BASSANEZI, R. B.; et al. Spatial and temporal analyses of Citrus Sudden Death as a tool to generate hypotheses concerning its etiology. ***Phytopathology***, v. 93, p.502-512, 2003.

BASSANEZI, R.B.; GIMENES-FERNANDES, N.; MASSARI, C.A. Resultados do levantamento detalhado da morte súbita dos citros na região afetada: junho a setembro de 2002. Araraquara: ***Fundecitrus***, v.9 (Relatório), 2002.

BELASQUE JUNIOR, J.; et al. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. ***Tropical Plant Pathology***, v. 34, p.137-145, 2009.

BERTOLDE, F.Z.; et al. Physiological and biochemical responses of Theobroma cacao L. genotypes to flooding. ***Photosynthetica***, v. 50, p. 447-457, 2012

BOSCARIOL-CAMARGO, R. L.; et al. In silico analysis of ESTs from roots of Rangpur lime (Citrus limonia Osbeck) under water stress. ***Genetics and Molecular Biology***, v. 30, p. 906-916, 2007.

BOVÉ, J.M.; et al. Several Liberibacter and Phytoplasma species are individually associated with HLB. ***Proceedings of the International Research Conference on Huanglongbing***, P.152-155, 2008.

BRAVO, I.M.; GALLARDO, E. Comportamiento del naranjo 'valencia' sobre trece patrones em Lara, Venezuela I. Crecimiento. ***Agronomia Tropical***, v.44, p.619-628, 1994a.

BRAY, E. A. Molecular Responses to Water Deficit. ***Plant Physiology***, v. 103, p. 1035-1040, 1993.

BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES. J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stress. In: BUCHANAN BB, GRUISSEM W, JONES RL (eds). Biochemistry e Molecular Biology of Plants. ***American Society of Plant Physiologists***, 2000.

BRAY, E.A. Plant responses to water deficit. ***Trends in Plant Science***. v. 2, p. 48-54. 1997.

BRITO , M. E. B.; et al. Comportamento fisiológico de combinações copa/porta-enxerto de citros sob estresse hídrico. ***Revista Brasileira de Ciências Agrárias***, v.7, p.857-865, 2012

CALIXTO, M.C.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; PAVAN, A. Seleção de plantas de toranja (C. grandis (L.) Osb.) tolerantes a Phytophthora sp. para uso na hibridação somática. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE

MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2, 2003, Porto Seguro. Anais.Cruz das Almas: **Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas**, p. 1-6, 2003.

CAMERON, J.W.; FROST, H.B. Genetics, breeding and nucellar embryony. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J. (Ed.) **The citrus industry. Berkeley: University of California Press**, v.2, p.325-370,1968.

CANTAGALLO, F. S.; et al. Micropropagação de citrumelo 'swingle' pelo cultivo in vitro de gemas axilares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, p. 136-138, 2005.

CANTUARIAS-AVILÉS, T.; et al. Horticultural performance of 'Folha Murcha' sweet orange onto twelve rootstocks. **Scientia Horticulturae**, v.129 p.259–265, 2011.

CARLOS, E.F.; STUCHI, E.S.; DONADIO, L.C. Porta-enxertos para a citricultura paulista. Jaboticabal: **Funep**, v. 1, p. 47,1997.

CARVALHO, K.; DE CAMPOS, M.K.; PEREIRA, L. F.; VIEIRA, L.G. Reference gene selection for real-time quantitative polymerase chain reaction normalization in "Swingle" citrumelo under drought stress. **Anal Biochemistry**, v.402, p. 197–199, 2010.

CARVEZAN, A. **Caracterização funcional dos gêneros de ascorbato peroxidase de arroz (*Oryza sativa* L.) nas interações entre estresse oxidativo e estresses abióticos**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre,2008.

CAVALCANTI, L.S.; BRUNELLI, K.R.; STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO R.M.; PASCHOLATI, S.F.; DE RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R. da S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, cap. 4, p. 81-123,2005

CERQUEIRA, E. C.; et al. Respostas de porta-enxertos de citros ao déficit hídrico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, p. 515-519, 2004.

CITROLIMA, 2013. Disponível em: <http://www.citrolima.com.br/portaenxertos/portaenxertos.htm>. Acessado em 10 de outubro de 2013.

COELHO-FILHO, M.A.; et al. Relações entre a transpiração máxima, área foliar e evapotranspiração de referência em pomar jovem de lima-ácida-Tahiti. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, v.12, p.265-274, 2004.

CRUZ, M. C. M., SIQUEIRA, D. L., SALOMÃO, L. C. C.,CECON, P. R. Fluorescência da clorofila a em folhas de tangerineira 'Ponkan' e limeira ácida

'Tahiti' submetidas ao estresse hídrico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, p. 896-901, 2009.

DaMATTA, F.M.; et al. Drought tolerance of two field-grown clones of *Coffea canephora*. **Plant Science**, v. 164, p. 111-117, 2003.

DAT, J. et al. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, p. 779-795, 2000.

DEUNER, S. et al. Stomatal behavior and components of the antioxidativo system in coffee plants under water stress. **Scientia Agricola**, v.68, p.77-85, 2011.

DONATO, S.L.R. et al. Respostas de combinações de variedades copa e porta-enxerto de citros à deficiência hídrica. **Nota Científica**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.42, p.1507-1510, 2007.

DOUPIS, G.; et al. Water relations, physiological behavior and antioxidant defence mechanism of olive plants subjected to different irrigation regimes. **Scientia Horticulturae**, v.153 p.150-156, 2013.

DUBEY, R. S. Metal Toxicity, Oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, cap. 9, p. 178-203, 2010.

DUENHAS, L.H.; et al. A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. **Analytical Biochemistry**, v.231, p. 237-246, 1995.

DUENHAS, L.H.; VILLAS BÔAS, R.L.; SOUZA, C.M.P.; RAGOZO, C.R.A.; BÜLL, L.T. Fertirrigação com diferentes doses de NPK e seus efeitos sobre a produção e qualidade de frutos de laranja (*Citrus sinensis* O.) 'Valência'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, p.214-18, 2002.

ESPINOZA-NUÑEZ, E.; et al. Performance of 'Tahiti' lime on twelve rootstocks under irrigated and non-irrigated conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 129, p. 227-231, 2011.

FAO, 2012. Food Agriculture Organization of the United Nations, disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>. Acessado em 02 de maio de 2012.

FIGUEIREDO, J.O. DE. Variedades copa de valor comercial. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A.A. (Ed.) **Citricultura Brasileira**, v.1, p. 228-264, 1991.

FOYER, C.H., NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signalling: a metabolic link between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*, v. 17, p. 1866–1875, 2005.

FUNDECITRUS, 2013. Fundo de Defesa da Citricultura, disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/>. Acessado em 10 de outubro de 2013.

GARCIA-SANCHEZ, F., RUBIO, F., MARTINEZ, V. Abiotic stresses: salinity and drought. In: Gonzalez-Fontes, A., Garate, A., Bonilla, I. (Eds.), *Agricultural Sciences: Topics in Modern Agriculture*, 2010.

GARCIA-SANCHEZ, F., SYVERTSEN, J.P., GIMENO, V., BOTIA, P., PEREZ-PEREZ, J.G. Responses to flooding and drought stress by two citrus rootstock seedlings with different water use efficiency. *Physiologia Plantarum*, v. 130, p. 532–542, 2007.

GIANOPOLITIS, C.N., RIES, S.K.: Superoxide dismutase. 1. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, v.59, p. 309–314, 1977.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.48, p.909-930, 2010.

GRATÃO, P. L., POLLE, A., LEA, P. J. & AZEVEDO, R. A. Making the life of heavy metal stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*, v. 32, p. 481-494, 2005.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. *Oxford: Clarendon Press*, v. 4, 2006.

HAVIR E. A.; MCHALE N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology*, v. 84, p. 450–455, 1987.

HERNÁNDEZ, J. A.; ALMANSA, M. S. Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves. *Physiologia Plantarum*, v. 115, p. 251-257, 2002.

HOSSAIN, Z.; et al. Modulation of the antioxidant system in citrus under waterlogging and subsequent drainage. *Journal of Plant Physiology*, v. 166 p.1391-1404, 2009.

IBGE: Disponível em: <http://www.ibge.gov.br> Acesso em 10 de janeiro de 2014

JONES, H.G.; CORLETT, J.E. Current topics in drought physiology. *Journal of Agricultural Science*, v.119, p.291-296, 1992.

- KOIDE R.T., ROBICHAUX R.H., MORSE S.R. & SMITH C.M. Plant water status, hydraulic resistance and capacitance. *Plant Physiological Ecology*, p. 161–183, 2000
- KUWABARA, T. & KATOH, Y. Involvement of the binuclear copper site in the proteolytic activity of polyphenol oxidase. *Plant and Cell Physiology*, v. 40, p. 1029-1035, 1999.
- LABOREM, E.G.; WAGNER, M.; REYES, F. Proline concentration as an indicator of water deficit in three citrus rootstocks. *Fruits*, v.46, p.259-264,1991.
- LASCANO, H. R.; et al. Antioxidant system response of different wheat cultivars under drought: field and in vitro studies. *Australian Journal of Plant Physiology*, v. 28, p. 1095–1102, 2001.
- LEI, Y.; YIN, C.; LI, C. Differences in some morphological, physiological, and biochemical responses to drought stress in two contrasting populations of *Populus przewalskii*. *Physiologia Plantarum*, v.127, p.82–191. 2006
- LEITE JUNIOR, R.P. Cultivares de copa e porta enxerto. In: CARVALHO, S.L.C. (Coord). A citricultura no Paraná. Londrina: *Iapar*, p. 91-116, 1992.
- LENZ, T.I.; WRIGHT, I.J.; WESTOBY, M. Interrelations among pressure-volume curve traits across species and water availability gradients. *Physiologia Plantarum*, v. 127, p. 423-433, 2006.
- LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura. São Paulo: *Instituto Plantarum de Estudos da Flora*, p. 672, 2006.
- MAFRA, V; et al. Reference Genes for Accurate transcript normalization in *Citrus* genotypes under different experimental conditions. *Plos One*, v. 7, p. 1-11, 2012.
- MACHADO, E.C.; MEDINA, C.L. Teor de água no substrato de crescimento e fotossíntese em laranja 'Valência'. *Bragantia*, v. 58, p. 217-226, 1999.
- MACHADO, M.A.; et al. Citros. Campinas: Instituto Agronômico; *FUNDAG*, p. 223-277, 2005.
- MADHUSUDHAN, R.; ISHIKAWA, T.; SAWA, Y.; SHIGEOKA, S. e SHIBATA, H. "Characterization of an ascorbate peroxidase in plastids of tobacco BY-2 cells," *Physiologia Plantarum*, v. 117, p. 550–557, 2003.
- MAGALHÃES FILHO, J.R.; et al. Deficiência hídrica, trocas gasosas e crescimento de raízes em laranja 'Valência' sobre dois tipos de porta-enxerto. *Bragantia*, v.67, p.75-82, 2008.

- MAGALHÃES FILHO, J.R.; et al. Deficiência hídrica, trocas gasosas e crescimento de raízes em laranjeira 'Valência' sobre dois tipos de porta-enxerto. **Bragantia**, v.67, p.75-82, 2008.
- MARTINS, J.D. et al. Potencial hídrico foliar em milho submetido ao déficit hídrico. **Irriga**, v. 15, p. 324-334, 2010.
- MARTINS, L. L. & MOURATO, M. P. Alterações no metabolismo de plantas em meios contaminados por metais pesados: stresse oxidativo. **Revista Agros**, v. 8. 2008.
- MATOS, M. M. A cultura do pinhão-manso (*Jatropha curcas*) no Brasil. **MAPA**, p. 29, 2007.
- MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D. DE; PIO, R. S.; POMPEU JUNIOR, J. Citros. Campinas: **Instituto Agrônomo e Fundag**, p.929, 2005.
- MEDINA, C.L.; RENA, A.B; SIQUEIRA, D.L.; MACHADO, E.C. Fisiologia dos citros. In: MATTOS JÚNIOR et al. (Ed.). Citros. Campinas: **Instituto Agrônomo e Fundag**, p. 147-195. 2005.
- MELONI, D.A., M.A. OLIVA, C.A. MARTINEZ, J. CAMBRAIA, Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 49, p. 69-76, 2003.
- MENDONÇA, S. C ; GUERRA, N. B. Métodos físicos e químicos empregados no controle do escurecimento enzimático de vegetais. **Boletim SBCTA**, v. 37, p. 113-116, 2003.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in **Plant Science**, v. 7, p. 405-410,2002.
- MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, v.9, p.490-498, 2004.
- MOLLER, I. M. Plant mitochondria and oxidative stress. Electron transport, NADPH turnover and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 561–591, 2001.
- MOREIRA, C.S.; PIO, R.M.. Melhoramento de citros. In:RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU, J. JUNIOR;AMBRÓSIO AMARO,A.A. (Org.). Citricultura Brasileira. Campinas: **Fundação Cargill**. v. 1, p. 116-152. 1991.
- MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; DONADIO, L.C.; Citros. In: BRUCKER C.H. (Ed.) Melhoramento de fruteiras tropicais. Viçosa: Universidade de Federal de Viçosa. p. 177-224. 2008

- MULLER, G.W. ;et al. Morte Súbita dos Citros: Uma Nova Doença na Citricultura Brasileira. Laranja, **Cordeirópolis**, v. 23,p. 371-386, 2002.
- MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v.59, p. 651–681, 2008.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v.22, p.1068-1072, 1981.
- NAKAZAWA, A., NOZUE, M. & YASUDA, H. Expression pattern and gene structure of phenylalanine ammonia-lyase in Pharbitis nil. **Journal of Plant Research**, v. 114, p. 323-328, 2001.
- NEVES, M. F.; JANK, M. S. Perspectivas da cadeia produtiva da laranja noBrasil: **A agenda 2015**. PENSA/USP/ICONE, São Paulo, 2006.
- NEVES, M.F.; KALAKI, R.B.; TROMBIN, V.G. (Org.). O Retrato da Citricultura Brasileira. Ribeirão Preto: **CitrusBR**, p.137, 2010.
- NOGUEIRA, R. J. M. C.; MORAES, J. A. P. V.; BURITY, H. A. Alterações na resistência à difusão de vapor das folhas e relações hídricas em aceroleira submetidas a déficit de água. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13,p. 75-87, 2001.
- OLIVEIRA, J.T.A.; et al. Atividades peroxidásica e β -1,3 glucanásica elicítadas por agentes bióticos causadores de doenças e pelo estresse hídrico em feijão-de-corda [Vigna unguiculata (L.) Walp.]. **Anais: V Reunião Nacional de pesquisa de Caupi-V RENAC**, p. 19-23, 2001.
- OLIVEIRA, T. M.; et al. Analysis of the NAC transcription factor gene family in citrus reveals a novel member involved in multiple abiotic stress responses. **Tree Genetics & Genomes**. v. 7, p. 1123–1134, 2011.
- ORTOLANI, A.A.; PEDRO JUNIOR, M.J.; ALFONSI, R.R. Agroclimatologia e o cultivo de citros. In: RODRIGUEZ, O. et al. (Ed.). Citricultura brasileira. **Fundação Cargill**, v. 2, p.153-195, 1991.
- PANG, C. H. e WANG, B. S. “Oxidative stress and salt tolerance in plants,” in Progress in Botany, U. Lüttge, W. Beyschlag, and J.Murata. **Springer**, p. 231–245, 2008.
- PASCHOLATI S. F.; NICHOLSON, R. L; BUTLER L. G. Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin accumulation in wounded maize mesocotyls. **Journal of Phytopathology**, v.115, p. 165±172, 1986.

- PASSOS, O.S., FILHO, W. DOS S.S., SOBRINHO, A.P. DA C. Classificação Botânica. In: Filho, H.P.S., Magalhães, A.F.de J., Coelho, Y. da S. (Ed.) Citros – 500 Perguntas 500 Respostas, **Embrapa**, p. 15 – 18. 2005
- PÉREZ-PÉREZ, J.G.; ROBLES, J.M.; TROVAR, J.C.; BOTÍA, P. Response to drought and salt stress of lemon 'Fino 49' under field conditions: Water relations, osmotic adjustment and gas Exchange. **Scientia Horticulturae**, v. 122, p. 83-90, 2009.
- PERL-TREVES, R.; PERL, A. Oxidative stress: an introduction. **Oxidative Stress in Plants**, 2002.
- PIERRE, C.S. et al. Phenotyping transgenic wheat for drought resistance. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 1799–1808, 2012.
- POMPEU JUNIOR, J. & BLUMER, S. Citrumelos como porta-enxertos para a laranjeira Valência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 105-107, 2011.
- POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. **Citros**. Centro APTA Citros Sylvio Moreira, cap. 4, p. 62-104, 2005.
- POMPEU JÚNIOR, J. Porta-enxertos. In: RODRIGUES, O., VIEGAS, F. (Eds.) **Citricultura Brasileira**. Fundação Cargill,. 2 ed., v.1, p. 492, 1991.
- POMPEU JUNIOR, J. Rootstocks and scions in the citriculture of the São Paulo State. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRUS NURSERYMEN, 6., 2001, Ribeirão Preto. Proceedings. Bebedouro: **Estação Experimental de Citricultura**, p. 75-82, 2001.
- REGUERA, M.; PELEG, Z.; BLUMWALD, E. Targeting metabolic pathways for genetic engineering abiotic stress-tolerance in crops. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1819, p. 186–194, 2012.
- REHEM, B. C.; ALMEIDA, A-A. F.; SANTOS, I. C.; GOMES, F. P.; PIROVANI, C. P.; ROMERO, P.; BOTÍA, P. Daily and seasonal patterns of leaf water relations and gas exchange of regulated deficit-irrigated almond trees under semiarid conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 56, p. 158-173, 2011.
- RESENDE, M.L.V., SALGADO, S.M.L. & CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 123-130, 2003.
- RIBEIRO, S. M. R.; et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, p. 133-149, 2005.

- RODRÍGUEZ-GAMIR, J.; et al. Relationships between xylem anatomy, root hydraulic conductivity, leaf/root ratio and transpiration in citrus trees on different rootstocks. **Physiology Plant**, v. 139, p. 159–169, 2011.
- RODRÍGUEZ-GAMIR, J.; PRIMO-MILLO, E.; FORNER, B. J.; FORNERGINER, A. M. Citrus rootstock responses to water stress. **Scientia Horticulturae**, v. 126, p. 95-102, 2010.
- SACK L., MARAÑÓN T. & GRUBB P.J. The functional morphology of plant juveniles tolerant of deep shade plus drought in three mediterranean-climate mixed forests of southern Spain. **Plant Ecology**, v. 168, 2003.
- SAIBO, N.J.M.; LOURENÇO, T.; OLIVEIRA, M.M. Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stress. **Annals of Botany**, v. 103, p. 609-623, 2009.
- SARMA, A. D.; SREELAKSHMI, Y.; SHARMA, R. Differential expression and properties of phenylalanine ammonia-lyase isoforms in tomato leaves. **Phytochemistry**, v. 49, p.2233-2243, 1998.
- SAVÉ, R.; et al. Changes in leaf osmotic and elastic properties and canopy structure of strawberries under mild water stress. **Horticultural Science**, v.28, p.925–927, 1993.
- SAVÉ, R. et al., Some physiological and morphological characteristics of citrus plants for drought resistance. **Plant Science**, v.110, p.167-172, 1995.
- SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 995-1014, 2005.
- SCHÄFER, G.; BASTIANEL, M.; DORNELLES, A.L.C. Porta-enxertos utilizados na citricultura. **Ciência Rural**, v.31,p.723-733, 2001.
- SCHINOR, E.H.; et al.Organogênese in vitro a partir de diferentes regiões do epicótilo de Citrus sp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, p.463-466, 2006.
- SCHINOR, E.H.; et al. Caracterização agronômica e molecular de acessos de Citrus Sunki do Banco de Germoplasma de Citros do Centro APTA Citros Sylvio Moreira. **Citrus Research & Technology**, v. 32, p. 27-37, 2011.
- SENTELHAS, P. C. Agrometeorologia dos citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Eds.) **Citros**, cap. 11. 2005.
- SHAO, H.; et al. Water-deficit stress induced anatomical changes in higher plants. **Comptes Rendus Biologies**,v. 331, p. 215-225, 2008.

- SHARMA, P.; JHA, A.B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*. p. 26, 2012.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, v. 58, p. 221–227, 2007.
- SMART, R. E.; BINGHAM, G. E.; Rapid Estimates of Relative Water Content *Plant Physiology*, v. 53, p. 258-260, 1974.
- SOARES FILHO W.S.; et al. ‘Tropical’: uma nova seleção de tangerina ‘Sunki’. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 24, p. 127-132, 2002.
- SOARES FILHO, W.S.; SOBRINHO, A.P.C.; PASSOS, O.S.; MOITINHO, E.D.B Maravilha, uma nova seleção de tangerina Sunki. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.25, p.268-271, 2003.
- SOARES, A.M.S.; MACHADO, O.L.T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. *Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas*, v. 1, p. 9-19. 2007.
- SOUZA, L.D. et al. Avaliação de plantas cítricas, em diferentes profundidades de plantio, em Latossolo Amarelo dos Tabuleiros Costeiros. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.26, p.241-244, 2004.
- SWINGLE W. T. P. C. REECE. The botany of Citrus and its wild relatives. In W. Reuther, H. J. Webber, and L. D. Batchelor [eds.], The citrus industry, vol. 1, *History, world distribution, botany, and varieties*, p. 190–430, 1967.
- TAIZ, L. ; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 848p. 2009.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 3.ed. Porto Alegre, Artmed,. 719p. 2004.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 3 ed. São Paulo: Artmed, 720p. 2003.
- TIVERON, A.P. *Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil*. Dissertação de Mestrado, Escola Superior ‘Luiz de Queiroz’, Piracicaba – SP, 2010.
- TOUCHETTE, B.W. et al. Drought tolerance versus drought avoidance: a comparison of plant–water relations in herbaceous wetland plants subjected to water withdrawal and repletion. *Wetlands*, v.27, p.656–667, 2007.

USDA, 2013. United States Department of Agriculture, disponível em: <http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>. Acessado em 10 de outubro de 2013

VAN BREUSEGEM, F., VRANOVÁ, E., DAT, J.F., INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science*, v. 161, p. 405–414, 2001.

VERSLUES, P. E.; et al. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal*, v. 45, p. 523–539, 2006.

VRANOVÁ, E., INZÉ, D., BREUSEGEM, F.V. Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, v. 372, p. 1227-1236, 2002.

WANG, W.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, v. 218, p. 1–14, 2003.

YELENOSKY, G. Accumulation of free proline in citrus leaves during cold hardening of young trees in controlled temperature regimes. *Plant Physiology*, v.64, p.425-427, 1979.

YUE, B.; et al. Genetic basis of drought resistance at reproductive stage in rice: separation of drought tolerance from drought avoidance. *Genetics*, v.172, p. 1213–1228, 2006.

ZULIAN, A.; DÖRR, A. C.; ALMEIDA, S. C.; CITRICULTURA E AGRONEGÓCIO COOPERATIVO NO BRASIL. *Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental* (e-ISSN: 2236-1170) v. 1, p. 2290-2306, 2013.