

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



MECANISMOS FISIOLÓGICOS E EXPRESSÃO GÊNICA
RELACIONADO À TOLERÂNCIA À SECA EM PORTA-
ENXERTOS DE CITROS

DIANA MATOS NEVES

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

MARÇO DE 2011

DIANA MATOS NEVES

**Mecanismos fisiológicos e expressão gênica relacionado à
tolerância à seca em porta-enxertos de citros**

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: Genética e Biologia Molecular.

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

MARÇO DE 2011

Diana Matos Neves

**Mecanismos fisiológicos e expressão gênica relacionado à
tolerância à seca em porta-enxertos de citros**

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

Apresentação: 31 de março de 2011

Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz
UNICAMP

Prof. Dr. Eduardo Giradi
EMBRAPA

Prof. Dr. Alex-Alan F. Almeida
UESC

Prof. Dr. Abelmon da S. Gesteira
UESC – Orientador

“Eu sei de muito pouco. Mas tenho a meu favor tudo que não sei e, por ser um campo virgem, está livre de preconceitos. Tudo que não sei é a minha parte maior e melhor. É com ela que eu compreenderia tudo. Tudo o que eu não sei é que constitui a minha verdade.”

Clarice Lispector

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me permitido concluir essa jornada dando-me força e perseverança a cada dia.

Aos meus pais, Valtódio (*in memoriam*) e Odália. Em especial a minha Mãe que sempre me apoiou nos momentos difíceis sendo exemplo nas lutas, não fazendo desistir das batalhas, essa vitória é nossa!

Aos meus irmãos, Cristiana e Júnior, meus sobrinhos, Felipe e Júlia, meus cunhados Denilton e Juliana, sempre presentes, mesmo com a distância.

A meu grande amor Bruno, pela compreensão, amor, carinho e principalmente pelo companheirismo em todos os momentos.

Ao Dr. Abelmon da Silva Gesteira pela orientação e principalmente pela confiança e amizade.

A Dr.^a Amanda Mendes, muito mais que uma amiga, uma mãe. Uma pessoa mais que especial, pois sempre esteve presente, desde os tempos de IC, me auxiliando com intensas conversas, explicações, mesmo quando eu não entendia e ainda assim, não desistia. Eu só tenho a agradecer.

A Sandra Santa Rosa e Manuela que me acolheram com muito carinho, companheirismo e madrugadas na EMBRAPA Mandioca e Fruticultura para coleta de dados, compensadas com tardes de risadas e muitos lanches.

Ao Dr. Marcio Gilberto Cardoso Costa pelo auxílio e co-orientação durante o trabalho.

Ao Dr. Mauricio Coelho pelo auxílio nas análises fisiológicas, manipulação dos dados e importantes considerações durante o trabalho.

Ao Dr. Walter Soares pelo comprometimento com o trabalho e sugestões.

A EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, por facilitar a execução do experimento e pelo auxílio de seus funcionários.

A UESC e o Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização do mestrado.

A CAPES e o INCT pela concessão da bolsa.

A Danilo Tosta pelo auxílio na execução do trabalho.

A Luciana, Aurisangela, Tahise, Laiz, Jamilli, Lívia, Daiane, Cristina, Cristiano e Abel pela amizade e ajuda nos trabalhos de laboratório.

A Fabrícia, secretária do programa PPGGBM por está sempre disposta a nos ajudar.

Aos amigos de velhas jornadas e que mesmo traçando destinos diferentes temos dado apoio uns aos outros, em especial agradeço a Michelli, Paloma, Vilma, Eliene, Taline, Leandro e Wallace.

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

SUMÁRIO

EXTRATO.....	viii
ABSTRACT.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVO	4
1.1.1 GERAL	4
1.1.2 ESPECÍFICOS.....	4
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 CENÁRIO NACIONAL DA CITRICULTURA	5
2.2 PORTA-ENXERTO	6
2.3 DEFICIÊNCIA HÍDRICA E SUAS CONSEQUÊNCIAS	8
2.4 ÁCIDO ABSCÍSICO E SUA SINALIZAÇÃO	11
3 MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 MATERIAL VEGETAL E APLICAÇÃO DO DEFICIÊNCIA HÍDRICA ..	15
3.2 ÁREA FOLIAR TOTAL.....	18
3.3 RESISTÊNCIA ESTOMÁTICA.....	18
3.4 POTENCIAL HÍDRICO DA FOLHA.....	19
3.5 POTENCIAL OSMÓTICO FOLIAR.....	19
3.6 QUANTIFICAÇÃO DE SÓDIO E POTÁSSIO.....	Erro! Indicador não definido.
3.7 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA	20
3.8 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA	20
3.9 ANÁLISE DE qRT-PCR.....	21
3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	22
4 RESULTADOS	23
4.1 CONTEÚDO DE ÁGUA NO SOLO	23
4.2 PERDA DE ÁGUA E TAXA DE TRANSPIRAÇÃO.....	23
4.3 ÁREA FOLIAR TOTAL.....	25
4.4 RESISTÊNCIA ESTOMÁTICA.....	26
4.5 POTENCIAL HÍDRICO FOLIAR.....	28
4.6 POTENCIAL OSMÓTICO	29
4.7 QUANTIFICAÇÃO DE POTÁSSIO.....	30

4.8	QUANTIFICAÇÃO DE SÓDIO	31
4.9	CARACTERIZAÇÃO DAS NCEDs	32
4.10	ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO DOS GENES <i>NCEDs</i> E <i>OST1</i> DE LIMOEIRO 'CRAVO' E A TANGERINEIRA 'SUNKI MARAVILHA'	35
5	DISCUSSÃO	38
6	CONCLUSÃO	47
7	REFERÊNCIAS	48

EXTRATO

A citricultura representa uma importante cultura econômica e o Brasil é o principal produtor de laranja e exportador de suco concentrado mundial. Porém, um dos principais problemas que tem agravado a produção citrícola é a deficiência hídrica. Os estudos mais recentes têm focado principalmente na busca de cultivares mais tolerantes à falta de água, sobretudo em porta-enxertos. A deficiência hídrica promove alterações morfológicas, fisiológicas e moleculares nas plantas, cujas muitas respostas são desencadeadas principalmente em função da ativação da rota do fitormônio ácido abscísico (ABA). Dessa forma o presente trabalho teve como objetivo avaliar os mecanismos de tolerância à seca em citros por meio de expressão gênica diferencial de genes envolvidos na biossíntese e via de sinalização do ABA, em dois importantes porta-enxertos: limoeiro 'Cravo' e tangerineira 'Sunki Maravilha'. Neste sentido, avaliou-se diariamente o crescimento, a resistência estomática e a umidade de água no solo em plantas de limoeiro 'Cravo' e tangerineira 'Sunki Maravilha', submetidas ou não à deficiência hídrica (plantas controle). A partir dos dados de umidade de água no solo ($\theta\text{-m}^3\text{m}^{-3}$) foram definidos os pontos de coleta, a fração de água transpirável do solo - FTSW e a taxa de transpiração normalizada - NTR para as plantas controle mantidas em plena irrigação (Controle = 0,29 - 0,28 $\theta\text{-m}^3\text{m}^{-3}$) e sob deficiência hídrica (Fase 1 = 0,20 - 0,19, Fase 2 = 0,17 - 0,16 e Fase 3 = 0,15 - 0,14 $\theta\text{-m}^3\text{m}^{-3}$). Coletou-se material vegetal (folhas e raízes) para as análises de potencial hídrico foliar, potencial osmótico, quantificação de sódio e potássio e análise da expressão gênica diferencial dos genes da família da 9-cis-epoxicarotenóide (NCEDs). O conteúdo de água do solo apresentou um declínio relevante no limoeiro 'Cravo' e na tangerineira 'Sunki Maravilha' comparando plantas controle e sob deficiência hídrica, confirmando a relação entre a perda de água no solo e a taxa de transpiração. As taxas de crescimento dos dois genótipos avaliados apresentaram perfis distintos: (1) apesar do crescimento verificado em limoeiro 'Cravo', não foi observado diferença estatística significativa entre o crescimento das plantas controle e das plantas sob deficiência hídrica; (2) em relação à tangerineira 'Sunki Maravilha', as plantas controle apresentaram crescimento, enquanto as plantas sob deficiência hídrica não apresentaram em crescimento. Os porta-enxertos estudados apresentaram-se mais sensíveis à deficiência hídrica na fase 3, quando tomados os dados de FTSW e NTR, sendo que estes valores de FTSW e NTR estão provavelmente associadas à diferença no aumento da área foliar e na resistência estomática. Um dos primeiros sinais enviado pelas plantas submetidas à deficiência hídrica é o aumento nos níveis de ABA, promovendo o fechamento estomático, ratificando o aumento da resistência estomática na fase 3 das plantas sob deficiência hídrica em ambos os cultivares, controlando assim, a perda de água por transpiração. Como o ABA também atua na ativação de sinais que promovem a despolarização da membrana, observou-se uma redução significativa no potencial hídrico foliar na

fase 3 de ambos os cultivares. Em relação ao potencial osmótico da folha, não houve diferença estatística entre os tratamentos de ambos os cultivares, o que pode ter sido influenciado pelo fato folhas maduras manterem constante seu potencial osmótico. Da mesma forma, a idade avançada das folhas também influencia os valores de potássio, já que foram observados baixos valores de potássio na fase 3 do limoeiro 'Cravo' e na fase 2 da tangerineira 'Sunki Maravilha'. A diferença na quantificação do sódio observada entre os cultivares indica que, a alta concentração encontrada na tangerineira 'Sunki Maravilha' pode ter influenciado no perfil genético encontrado na fase 3. Pois, além de competir com o potássio, esse íon, quando em altas concentrações, podem inativar enzimas chaves nos processos fisiológicos como movimento estomático, ativação da fotossíntese, entre outros. Na análise *in silico* das sequências codificantes dos genes da família NCED observou-se grande similaridade entre *NCED2* e *NCED5*, que pode está relacionado ao fato desses genes apresentarem expressão de enzimas semelhantes, mas que atuam em locais diferentes. Na análise da expressão gênica diferencial dos genes relacionados a biossíntese (*NCEDs*) e sinalização (*OST1*) do ABA, observou-se que, em folhas do limoeiro 'Cravo' ocorreu maior expressão do gene *NCED5*, enquanto que nas folhas de tangerineira 'Sunki Maravilha' houve expressão uma pequena expressão do gene *NCED2* que estatisticamente não foi significativa. Em tecidos de raiz de limoeiro 'Cravo' observou-se maior expressão dos genes *NCED2*, *NCED3* e *NCED4*, enquanto que em tangerineira 'Sunki Maravilha', os genes *NCED2*, *NCED4* e *NCED5* foram superexpressos nas plantas submetidas à deficiência hídrica, quando comparadas às plantas controle. Em ambos os cultivares estudados foi observado que ocorreu maior expressão dos genes *NCEDs* e *OST1* na raiz, confirmando que a sinalização do ABA ocorre da raiz para a parte aérea. Coletivamente, os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que a superexpressão dos genes *NCED5* na folha e o *NCED3* na raiz do limoeiro 'Cravo', podem ser os responsáveis pelo aumento na síntese do ABA, apresentando-se então como fortes candidatos ao controle do mecanismo de tolerância à seca.

Palavras-chave: citros, déficit hídrico, expressão gênica, ABA e NCEDs,

ABSTRACT

Citrus is an important economic crop worldwide, and Brazil is the leader in producing and exporting orange juice. However, one major problem that has reduced the citrus production is the water deficit. Recent studies have focused mainly on the search for varieties more tolerant to drought, especially amongst rootstock varieties. The water deficit promotes morphological, physiological and molecular changes in plants; many of these changes are triggered through the abscisic acid (ABA) pathway activation. Here, we evaluate the mechanisms of drought tolerance in citrus by differential expression of genes involved in ABA biosynthesis and signaling pathway in two important rootstocks varieties: 'Rangpur' lime and 'Sunki Maravilha' tangerine. We evaluated daylily plant growth, te stomatal resistance and soil humidity in these two varieties submitted or not to water deficit. We define the harvesting times based on the soil humidity data (m^3m^{-3}): i) the fraction of transpirable soil water (FTSW); ii) normalized transpiration rate (NTR) to control plants maintained in full irrigation (Control = 0.29 to 0.28 m^3m^{-3}) and under water deficit (phase 1 = 0.20 to 0.19, phase 2 = 0.17 to 0.16, phase 3 = 0.15 to 0.14 m^3m^{-3}). We harvested plant leaves and roots for leaf water potential, osmotic potential, sodium and potassium quantifications and differential gene expression of of 9-cis-epoxycarotenoids (NCEDs) family. The soil water content showed a significant decline in 'Rangpur' line and 'Sunki Maravilha' tangerine when comparing with control plants under water deficit. These results confirmed the relationship between the water loss of soil and the transpiration rate. The growth rates of the two genotypes showed distinct profiles: (1) in 'Rangpur' line, there was no statistically significant difference between the growth of control plants and of plants under water deficit, (2) in 'Sunki Maravilha' tangerine, the control plants showed normal growth, while plants under water deficit didn't showed growth. The rootstocks were more sensitive to water deficit in the phase 3, based on data from FTSW and NTR, and these values were probably related to the difference in the increase in leaf area and stomatal resistance. One of the early signals sent by plants subjected to water deficit is the increase in the levels of ABA, promoting stomatal closure, confirming the increase in stomatal resistance in phase 3 of the plants under water deficit in both cultivars, thus controlling the water loss through transpiration. The ABA also acts as the activation of signals that promote membrane depolarization: we observed a significant reduction in leaf water potential in phase 3 of both cultivars. There was no statistical difference of the leaf osmotic potential between the different treatments in both cultivars. This result may be a function of the mature leaves of plants that maintain constant the osmotic potential. Similarly, the age of the leaves may also influenced the potassium quantification, since it was observed low levels of potassium in phase 3 of 'Rangpur' line and phase 2 of 'Sunki Maravilha' tangerine. The difference in the sodium quantification observed

among the cultivars indicates that the high concentrations found in the 'Sunki Maravilha' tangerine may have influenced the genetic profile found in phase 3. Therefore, because competing with potassium, sodium, when presents in high concentration can inactivate key enzymes of physiological processes such as stomatal movement, activation of photosynthesis, among others. On the *in silico* analysis of the coding sequences of NCED gene family we observed a great similarity between *NCED2* and *NCED5* which might be related to the fact that these genes present similar expression, but act in different locations. In the analysis of differential expression of genes involved in biosynthesis (NCEDs) and signaling (*OST1*) of ABA, we observed that in leaves of 'Rangpur' lime the *NCED5* expression was higher, whereas in the leaves of 'Sunki Maravilha' tangerine there was a small expression of *NCED2* (statistically not significant). In the roots tissues of 'Rangpur' lime showed a higher expression than *NCED2*, *NCED3* and *NCED4*, while in 'Sunki Maravilha' tangerine the *NCED2*, *NCED4* and *NCED5* were overexpressed in plants subjected to water deficit, when compared to control plants. In the both cultivars, we observed that *NCEDs* and *OST1* were more expressed in the root, confirming that the ABA signaling occurs from the root to the shoot. Finally, we showed that the overexpression of *NCED5* and *NCED3* in 'Rangpur' lime leaf and root may be responsible for the increased of ABA synthesis, and that consequently these two genes may be strong candidates to control the mechanism of tolerance to drought.

Key words: citrus, water deficit, gene expression, ABA, and NCEDs.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Via indireta da biossíntese do ácido abscísico (ABA) em plantas. Fonte de Seo e Koshiba (2002)..... 12
- Figura 2: Local de obtenção do material vegetal. A: Centro EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA. B: Viveiro de mudas. C: Plantas de limoeiro ‘Cravo’ e a tangerineira ‘Sunki Maravilha’ utilizadas nos experimentos..... 15
- Figura 3: Transplantação e restabelecimento dos porta-enxertos Limoeiro ‘Cravo’ e tangerineira ‘Sunki Maravilha’. (A) As plantas foram retiradas dos sacos plásticos, onde foram germinadas e permaneceram até o momento do transplantação. (B) Após a retirada de todo o substrato, com cuidado para não destruir a raiz, as plantas foram acondicionadas em vasos de 15L. (C) As plantas foram irrigadas até a saturação do solo. (D) Todos os indivíduos foram transferidos para novos vasos e, em seguida, levados dos para casa de vegetação..... 16
- Figura 4: Plantas do limoeiro ‘Cravo’ e da tangerineira ‘Sunki Maravilha’ acondicionadas em casa de vegetação, mantidas controladas a temperatura e umidade relativa do ar, para a implementação da deficiência hídrica. 17
- Figura 5: Teor de água no solo determinada a partir da curva de retenção de água no solo (cm^3/cm^3), determinado pela TDR, em plantas de Limoeiro ‘Cravo’ (LC) e tangerineira ‘Sunki Maravilha’ (SK), submetidas ou não a deficiência hídrica. 23
- Figura 6: Curva de resposta da taxa de transpiração normalizada (NTR) em função da fração de água transpirável no solo em plantas de limoeiro ‘Cravo’ (A) e da tangerineira ‘Sunki Maravilha’ (B) em diferentes fases da coleta (F1, F2 e F3)..... 25
- Figura 7: Área foliar das plantas controle (Cont) e sob deficiência hídrica (DH) de limoeiro ‘Cravo’ (LC) e da tangerineira ‘Sunki Maravilha’ (SK) durante o período do experimento. As médias seguidas por letras diferentes, para cada genótipo, apresentam diferenças estatísticas pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$). * indica que não houve diferença estatística entre os tratamentos e/ou genótipos. 26
- Figura 8: Resistência estomática (gs) em relação a fração de água transpirável do solo nas plantas sob deficiência hídrica (DH) do limoeiro ‘Cravo’ e da tangerineira ‘Sunki Maravilha’. 27
- Figura 9: Resistência estomática (gs) das plantas controle e sob deficiência hídrica (Fase 1, Fase 2 e Fase 3), no limoeiro ‘Cravo’ (LC) e na tangerineira ‘Sunki Maravilha’ (SK). Teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 28

Figura 10: Potencial hídrico foliar (ψ_{WF}) em plantas de limoeiro ‘Cravo’ e da tangerineira ‘Sunki Maravilha’, controle e sob deficiência hídrica (Fase 1, Fase 2 e Fase 3). As médias seguidas pelas mesmas letras, sendo maiúscula e minúscula em cada genótipo, não apresentam diferenças estatísticas pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).	29
Figura 11: Potencial osmótico foliar ($\psi_{\pi F}$) em plantas controle e plantas sob deficiência hídrica (Fase 1, Fase2 e Fase 3) do limoeiro ‘Cravo’ e da tangerineira ‘Sunki Maravilha’, * Não significativo.	30
Figura 12: Teor de potássio (K^+) nas folhas em plantas controle e plantas sob deficiência hídrica (Fase 1, Fase 2 e Fase 3), de tangerineira ‘Sunki Maravilha’ e de limoeiro ‘Cravo’.	31
Figura 13: Teor de sódio (Na^+) nas folhas em plantas Controle e sob deficiência hídrica da tangerineira ‘Sunki Maravilha’ e do limoeiro ‘Cravo’ durante o período de desidratação do solo.	32
Figura 14: Dendrograma de similaridade dos genes NCED. O dendrograma de similaridade foi construído usando o método de “Neighbor-Joining”, com “bootstrap” de 1000 replicações (valores de % estão descritos nos nós). As análises evolucionárias foram conduzidas usando o programa MEGA4.....	34
Figura 15 A e B: Expressão relativa em folhas (F) e expressão relativa em raiz (R), dos genes que codificam para as enzimas 9-cis-epoxicarotenoide deoxigenase (<i>NCED1</i> , <i>NCED2</i> , <i>NCED3</i> , <i>NCED4</i> E <i>NCED5</i>) e Open Stomatal (<i>OST1</i>) em plantas do limoeiro ‘Cravo’ controle e sob deficiência hídrica a partir de diferentes condições de umidade do solo. A expressão do gene da β -actina foi usada como normalizador. Os dados representam a média \pm SE (erro padrão) de três réplicas experimentais.	36
Figura 16 A e B: Expressão relativa em folhas (F) e expressão relativa em raiz (R), dos genes que codificam para as enzimas 9-cis-epoxicarotenoide deoxigenase (<i>NCED1</i> , <i>NCED2</i> , <i>NCED3</i> , <i>NCED4</i> E <i>NCED5</i>) e Open Stomatal (<i>OST1</i>) em plantas de tangerineira ‘Sunki Maravilha’, controle e sob deficiência hídrica em diferentes condições de umidade do solo. A expressão do gene da β -actina foi usada como normalizador. Os dados representam a média \pm SE (erro padrão) de três réplicas experimentais.	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências dos *primers* usados nos experimentos de qRT-PCR.... 22

Tabela 2: Genes *NCEDs* usados na construção do dendrograma de similaridade e números de acesso no GenBank. As duas letras iniciais no nome do gene correspondem a espécie. At: *Arabidopsis thaliana*; Cc: *Citrus clementina*; Cs: *C. sinensis*; Cu: *C. unshiu*; Le: *Lycopersicon esculentum*; St: *Solanum tuberosum*. 33

1 INTRODUÇÃO

As plantas cítricas têm seu centro de origem no Continente Asiático, e no território brasileiro encontraram condições favoráveis para o seu desenvolvimento (ABECITRUS, 2010). Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de frutas cítricas e exportador de suco de laranja concentrado (Neves e Jank, 2006). No país, cerca de 85% da produção de citros advém do Estado de São Paulo, na ordem de aproximadamente 1,5 milhão t (IAC, 2009). O nordeste brasileiro, detém, após o Estado de São Paulo, a citricultura de maior expressão, graças à liderança nesse setor dos Estados da Bahia e Sergipe, que destacam como maiores produtores dessa região do país (IBGE, 2009).

Em relação à citricultura, deve-se considerar a grande diversificação agroclimática do Brasil e suas condições particulares de cultivo, com uma multiplicidade de ambientes, nos quais se verifica a ocorrência de geadas, ocasionais ou frequentes, e estresses hídricos ou térmicos, implicando em múltiplas floradas com crescimento e maturação irregulares dos frutos (Cerqueira *et al.*, 2004).

Particularmente, o cenário da deficiência hídrica no solo, é encontrado na região nordeste e tem-se expandido significativamente para outras regiões do país. Ainda, é importante considerar que, em virtude das mudanças climáticas, globais há uma expectativa de que as deficiências hídricas tornem-se mais acentuadas ao longo do tempo, resultando em efeitos adversos na agricultura e limitação da produção mundial de alimentos (Mearns *et al.*, 1997).

Uma vez que a seca é um fator de estresse abiótico de extrema importância em várias regiões do Brasil e do mundo, muitas pesquisas têm sido conduzidas para averiguar o comportamento de plantas sob condições limitantes de disponibilidade hídrica do solo, simulando, dentro de certos limites, situações de deficiência hídrica que podem ser evidenciadas em campo. De modo geral, as respostas das plantas à seca variam de acordo com a espécie e com a intensidade e duração do estresse, podendo se manifestar em termos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos (Kramer e Boyer, 1995).

De acordo com Nogueira *et al.*, (2000), genótipos que apresentam diversidade nas respostas ao estresse hídrico constituem excelentes materiais para serem utilizados em programas de melhoramento genético de citros.

Vários parâmetros fisiológicos podem ser empregados na avaliação das respostas das espécies vegetais ao estresse hídrico, entre eles o potencial hídrico foliar, a condutância estomática e a transpiração. (Cerqueira *et al.*, 2004). A caracterização de variedades de citros permite que novos materiais sejam avaliados e posteriormente utilizados como copas, porta-enxertos e para realização de hibridação (Coelho *et al.*, 2001).

Seguindo em linhas de entendimento que as plantas estão sujeitas a muitos tipos de variações físicas do ambiente, é intrínseca a capacidade de desenvolverem diversos mecanismos bioquímicos e fisiológicos para responder e adaptar-se ao estresse e então adquirir tolerância. A identificação e isolamento de genes associados à tolerância a seca é de grande importância a fim de compreender melhor esta característica e aumentar a eficiência no desenvolvimento de variedades tolerantes a seca (Tuberosa e Salvi 2006, Sreenivasulu *et al.*, 2007).

As plantas tornam-se tolerantes ao estresse ambiental pelo metabolismo reprogramado e expressão gênica, ganhando um novo equilíbrio entre crescimento, desenvolvimento e sobrevivência. Nas duas últimas décadas, importantes avanços foram feitos para compreensão das mudanças transcricionais induzidas por restrições ambientais, e identificação de proteínas sinalizadoras e fatores de transcrição que regulam a expressão gênica induzida por estresse (Mazzucotelli *et al.*, 2008), resultando em um processo complexo, iniciado a partir da percepção do estresse e com alterações transcricionais específicas (Shinozaki *et al.*, 2006).

A demanda por água é determinada principalmente pela taxa de transpiração da planta. Nas respostas a deficiência hídrica no solo, pode ocorrer redução no potencial hídrico foliar a fim de criar um gradiente necessário para manter o fluxo de água proveniente do solo. Quando o potencial hídrico reduz a um valor igual ao potencial osmótico, os estômatos foliares se fecham para reduzir a transpiração (Kerbaui, 2004).

Estudos genéticos e bioquímicos apresentam o ácido abscísico (ABA) como o principal fitormônio envolvido nos mecanismos de resposta das plantas promovido por fatores abióticos, como a seca. Existem evidência genética e bioquímicas da 9-cis-epoxicarotenóide dioxigenase (NCED) é uma enzima chave na biossíntese do ABA, já que a clivagem oxidativa dos seus

precursores xantofílicos é fator limitante na rota biossintética deste hormônio (Wan e Li, 2006). O ABA atua no fechamento dos poros estomáticos devido ao aumento na concentração do íon Ca^{2+} e subsequente ativação dos canais iônicos situados na membrana plasmática (Hamilton *et al.*, 2000; Pei *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2001; Kohler *et al.*, 2002). Isto leva a despolarização das células-guarda, efluxo de K^+ , perda de turgor, aumentando o volume das células-guarda e promovendo o fechamento estomático (Blatt, 2000; MacRobbie, 2000; Schroeder *et al.*, 2001). O ABA também causa aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que atuam como sinalizadores intermediários no fechamento estomático (Pei *et al.*, 2000; Murata *et al.*, 2001; Schroeder *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001).

Estudos envolvendo deficiência hídrica e fisiologia de plantas cítricas são essenciais para ampliar os conhecimentos sobre os diferentes aspectos da produção e comportamento das plantas cítricas nesta condição. Poucos cultivares têm sido desenvolvidos com características de tolerância à seca. Dessa maneira, a biologia molecular assume papel-chave na identificação pontual de genes envolvidos nas respostas a deficiência hídrica, permitindo futuramente a identificação e a compreensão de rotas metabólicas envolvidas nas respostas fisiológicas à seca; além de permitir a transferência de genes de interesse para outros genótipos, utilizando-se de ferramentas de engenharia genética. A identificação de genes de importância econômica para a agricultura e que apresentem características nas plantas de tolerância a seca tem sido o alvo de muitos trabalhos, como os NCEDs, OST1, PP2C, entre outros.

Dessa forma, o presente estudo buscou verificar os efeitos da seca em cultivares de citros de tolerância contrastante, baseando-se em fatores fisiológicos e expressão diferencial de genes envolvidos na biossíntese do ABA, de modo a se fornecer resultados que possam contribuir para a elucidação dos mecanismos envolvidos na resposta de defesa em plantas, bem como para a identificação de diferentes genes envolvidos na tolerância à seca.

1.1 OBJETIVO

1.1.1 GERAL

Avaliar os mecanismos fisiológicos de tolerância à seca em citros por meio de expressão gênica diferencial de genes envolvidos na biossíntese e via de sinalização do ABA.

1.1.2 ESPECÍFICOS

- i. Submeter variedades porta-enxertos de citros de tolerância contrastante à seca (*Citrus limonia* Osb. cv. Santa Cruz tolerante e *C. sunki* cv. 'Sunki Maravilha' susceptível) em diferentes condições simuladas de estresse hídrico.
- ii. Avaliar os efeitos da deficiência hídrica no solo e no crescimento e desenvolvimento de cultivares de citros contrastantes em relação à tolerância à seca;
- iii. Analisar a expressão gênica, por meio do PCR em tempo real, de genes associados à síntese do ABA, nas folhas e raízes das plantas submetidas ao estresse hídrico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CENÁRIO NACIONAL DA CITRICULTURA

As plantas cítricas têm os seus frutos cultivados em aproximadamente 140 países, mas somente alguns deles são produtores. O Brasil destaca-se como um dos principais produtores de laranja e exportador do suco concentrado e congelado (SCCL) do mundo, por apresentar condições favoráveis para a citricultura, devido principalmente a grande diversidade de ecossistemas (Neves e Jank, 2006).

Apenas 20% da laranja produzida no país é destinada ao consumo *in natura*, sendo o restante comercializado para industrialização da fruta, principalmente para a produção de SCCL (Neves e Jank, 2006). Cerca de 90% do SCCL produzido no Brasil abastece o mercado externo, sendo a União Europeia a principal importadora (60%), seguida pelos países do Tratado Norte-Americano de Livre Comércio (NAFTA) (20%), que envolve o Canadá, México, Estados Unidos e o Chile como associado. O restante da produção é exportada para os países do Mercosul, Ásia e Oceania (ABECITRUS, 2010). O sistema agroindustrial cítrico brasileiro envolve diferentes segmentos como o de insumos, produção, indústria processadora, distribuição e consumo, eles que estabelecem uma cadeia produtiva que movimentam o mercado durante o ano e gera empregos diretos e indiretos (Neves e Jank, 2006).

A safra nacional de 2009/10 foi estimada com aproximadamente 318,6 milhões de caixas de 40,8 kg, em razão da extensa área cultivada. Porém, teve uma redução de 12,1% em relação à área plantada quando comparada com a safra 2008/09, que foi estimada em 620,1 mil ha (Caser, 2010). A extensão da área plantada com a citricultura supera, em grande parte, as áreas plantadas com outras culturas de fruteiras tropicais e subtropicais, como banana, maçã, manga, pêra, pêssego e mamão. Cerca de 60% do suco de frutas cítricas que circula no mercado mundial é brasileiro, em particular de laranjas e demais cítricos cultivados no país. Este importante sistema econômico é sustentado principalmente pela produção oriunda do estado de São Paulo (IBGE, 2010), mas outros estados também têm importante participação na citricultura brasileira, como: Bahia (6,0%), Sergipe (4,2%), Paraná (2,8%) e Rio Grande do

Sul (1,8%) (ABECITRUS, 2010). A Bahia é o segundo estado produtor do País, com safra obtida de 1.116.896 toneladas, sendo o Município de Rio Real um dos 20 maiores produtores de laranja do país. Esta significativa participação no cenário citrícola nacional, tanto em área cultivada como no bom nível tecnológico de seus pomares, é principalmente resultado do Programa Bahia Citros (IBGE, 2010). O Programa proposto pelo governo do estado da Bahia tem como objetivo de revitalizar a citricultura do estado, através da capacitação e financiamento de produtores.

2.2 PORTA-ENXERTO

O processo de enxertia resulta em uma associação entre dois indivíduos, geneticamente diferentes, cada qual com suas características, que devem passar a viver em estreito relacionamento, mutuamente benéfico, para que a nova planta seja produtiva e longeva (Pompeu Junior, 2005). O porta-enxerto induz na copa alterações no tamanho, precocidade de produção, maturação e peso dos frutos, coloração da casca e do suco, teor de açúcares, ácidos e outros componentes do suco, permanência dos frutos na planta e sua conservação após a colheita, fertilidade do pólen, absorção, síntese de nutrientes, transpiração e composição química das folhas, respostas a produtos de abscisão dos frutos e folhas, tolerância à salinidade, à seca, ao frio, a doenças e pragas (Mattos Jr. *et al.*, 2003).

Para estudos de porta-enxertos, é necessário conhecer o comportamento real de uma variedade de copa em um determinado porta-enxerto, e que os ensaios sejam feitos com porta-enxertos originados de sementes nucelares. As sementes da maioria das variedades cítricas apresentam entre inúmeras características, uma variável considerável de embriões nucelares formados pela diferenciação de células somáticas do núcleo (Pompeu, 2005). Esses embriões possuem o mesmo genoma da planta-mãe e, ao germinar, dão origem a plantas idênticas àquelas que forneceram as sementes (Moreira *et al.*, 2010).

As excepcionais características apresentadas pelo Limoeiro 'Cravo', como facilidade de formação das mudas, compatibilidade com todas as copas, produção precoce, altas produções de frutos de boa qualidade, e grande

resistência à seca, além da tolerância à tristeza, tornaram-no o preferido pelos viveiristas e citricultores para uso como porta-enxerto (Pompeu Junior, 2001). Na década de 1970, devido ao declínio dos Citros, uma doença que afeta plantas enxertadas em limoeiro 'Cravo', iniciou-se uma procura por diversificação de porta-enxertos tolerantes, liderada pela tangerina 'Cleópatra' (*Citrus reshni* hort. ex Tanaka), seguida por limão 'Volkameriano' (*C. volkameriana* V. Ten. e Pasq.), tangerina 'Sunki' (*C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka) e citrumelo 'Swingle' (*C. paradisi* Macfad. Cv. Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.). Esses porta-enxertos foram considerados tolerantes e foram então, utilizados na reconstrução da citricultura (Pompeu Junior, 2005). Posteriormente outros males passaram a atacar a lavoura de citros e para tentar controlar essa situação, novos porta-enxertos foram introduzidos. Assim, o surgimento de doenças como a Morte Súbita do Citros (MSC) acelerou o processo de diversificação de porta-enxertos. Em 2003, apenas 39,8% das mudas estavam enxertadas em limoeiro 'Cravo'. Atualmente, os porta-enxertos utilizados são: o limoeiro 'Cravo', citrumelo 'Swingle', tangerineira 'Sunki' e a tangerineira 'Cleópatra' (FUNDECITRUS, 2011).

O uso da tangerineira 'Sunki' como porta-enxerto começou a ser registrada em 1985, quando participou de 0,2% das mudas presentes nos viveiros, motivado pela sua resistência ao declínio dos citros e por induzir produções de frutos geralmente superiores aos produzidos pela tangerineira 'Cleópatra'. Duas novas seleções da tangerineira 'Sunki' foram obtidas pela Embrapa Mandioca e Fruticultura, doravante denominadas 'Tropical' e 'Maravilha'. Ambas têm quase 100% de poliembrionia nucelar, e número médio de 18 e 7 sementes por fruto, respectivamente. A tangerineira 'Sunki Tropical' ainda apresenta boa resistência à gomose de *Phytophthora* (Soares Filho *et al.*, 2002; 2003). A constatação de que as plantas enxertadas nesse porta-enxerto não são afetadas pela MSC, fez com que sua presença nos viveiros aumentasse para 5,1% em 2002 e 7,1% em 2003 (Pompeu Junior, 2005).

É importante que exista uma diversificação dos porta-enxertos utilizados na citricultura, principalmente devido a grande diversidade de ambientes, já que um porta-enxerto pode não apresentar um ótimo desenvolvimento em todos ambientes e em todas as variedades de copas, o que impossibilita a sua capacidade produtiva (Cerqueira *et al.*, 2004). O desenvolvimento de novos

porta-enxertos, capazes de substituir ou compor com o limoeiro 'Cravo' a base dos pomares cítricos brasileiros, todavia, não é uma tarefa fácil, dada às grandes dificuldades que se apresentam na execução de programas de melhoramento genético de citros. Dentre essas dificuldades, destacam-se, principalmente, a alta heterozigosidade, que gera 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* (Soares Filho *et al.*, 2003). É importante ressaltar que o limoeiro 'Cravo' apresenta boa tolerância à seca (Pompeu Junior, 2005), dentre as diversas características de interesse agrônomo já citado. Sendo a citricultura brasileira, com raras exceções, conduzida praticamente sem irrigação (Coletti, 2000), o desenvolvimento de porta-enxertos, capazes de acrescentar conjuntamente ou em substituição ao 'Cravo', deve ser direcionado na necessidade de uma melhor tolerância à seca.

2.3 DEFICIÊNCIA HÍDRICA E SUAS CONSEQUÊNCIAS

As perspectivas para as mudanças climáticas global têm ocorrido mais rápido do que o previsto, pois, os diferentes cenários disponíveis para mudança climática sugerem um aumento da aridez das regiões semiáridas do mundo e da região do Mediterrâneo, para um futuro próximo (Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas, 2010). Juntamente com a superpopulação, isto acarretará em superexploração dos recursos hídricos para a agricultura, aumentando as restrições para o crescimento vegetal, sobrevivência e o potencial de rendimento das culturas (Chaves *et al.*, 2003, 2009; Passioura, 2007).

A natureza séssil das plantas faz com que elas desenvolvam mecanismos de tolerância a diferentes variedades de estresses abióticos presente no ambiente. Um tipo comum de estresse abiótico encontrado em muitas áreas do planeta é a deficiência hídrica (Moore *et al.* 2008), o que, por sua vez, é um componente normal de alguns processos do ciclo de desenvolvimento das plantas, assim como o desenvolvimento das sementes na maioria das plantas superiores é necessário que no seu ciclo tenha um período de redução de

água. A deficiência hídrica na planta ocorre quando a taxa de transpiração excede a absorção de água e é um componente de várias e diferentes tensões - incluindo a seca, salinidade e baixa temperatura (Bray, 1997). A seca é definida como a falta de umidade disponível em algumas regiões que resulta em solos secos (Moore *et al.* 2008).

Tendo em vista que a seca é um estresse abiótico de extrema importância em várias regiões do Brasil e do mundo, muitas pesquisas têm sido conduzidas para verificar o comportamento de plantas sob condições limitantes de disponibilidade hídrica do solo, simulando, dentro de certos limites, situações de deficiência hídrica que podem ser evidenciadas em campo (Chaves *et al.*, 2009). De modo geral, as respostas das plantas à seca variam de acordo com a espécie e com a intensidade e duração do estresse, podendo se manifestar em termos morfológicos, fisiológicos e moleculares (Wangxia *et al.*, 2003).

Com relação às alterações morfológicas decorrentes da seca, a paralisação do crescimento da parte aérea é uma resposta primária, de forma que novas folhas deixam de ser emitidas ou observa-se maior abscisão foliar. Essas estratégias resultam em economia hídrica por diminuir a superfície de transpiração e aumentar a eficiência do uso da água (Damatta *et al.*, 2003). Entretanto, observa-se em condições de seca um estímulo no crescimento radicular (Pinheiro *et al.*, 2005), podendo este ser considerado um mecanismo de aclimatação ou tolerância à deficiência hídrica. O investimento no crescimento de raízes, em detrimento da parte aérea, favorece a exploração de uma maior área de solo em busca de água, cuja disponibilidade é maior em regiões mais profundas dos solos secos (Rodríguez-Gamir *et al.*, 2010).

Dentre as respostas fisiológicas, o aumento na resistência estomática é a estratégia mais eficiente para restringir ou reduzir as perdas de água pelas folhas via transpiração (Moore *et al.* 2008). Quando o grau de abertura estomática diminui, a perda de vapor d'água pela planta através da transpiração é reduzido ou limitado. Dentre os fatores que governam o mecanismo de abertura e fechamento estomático, existem aqueles inerentes à planta, como os efeitos do ácido abscísico (ABA), ou àqueles relacionados ao ambiente circundante, como os efeitos do potencial hídrico do solo, da temperatura e umidade relativa do ar, da radiação total incidente e da temperatura da folha (Damatta *et al.*, 2005).

De forma simplificada, o potencial hídrico na planta (Ψ_w) pode ser descrito pela equação: $\Psi_w = \Psi_s + \Psi_p$, onde 's' é a componente osmótica e 'p' a de pressão (Taiz e Zeiger, 2009). As mudanças do potencial hídrico nos tecidos são resultados, em grande parte, das variações dos componentes osmóticos. O ajustamento osmótico consiste na acumulação de solutos no interior das células sob condições de estresse (Damatta *et al.*, 2003), de maneira a conservar um gradiente de potencial hídrico necessário à manutenção do fluxo de água durante os períodos de seca, o que poderia contribuir para a manutenção da turgescência e, desse modo, mediar processos como crescimento e fotossíntese (Moinuddin e Khanna-Chopra, 2004).

A regulação homeostática dos ânions nas células-guardas, que regulam a abertura e fechamento dos estômatos, também são de grande importância. Compostos químicos como o K^+ e Na^+ são fatores importantes na proteção celular, osmorregulação e no movimento estomático. Já Negi *et al.* (2008), identificaram que mutantes de *Arabidopsis slac1*, apresentam aumento na concentração de K^+ e mantêm a carga celular balanceada e são deficientes no fechamento estomático. Dessa forma, a proteína SLAC1 (*slow anion channel associated 1*) pode participar no controle do fluxo de ânions através da membrana plasmática das células-guarda, proporcionando assim, um ponto de partida para futuros estudos sobre a natureza molecular dos transportadores de ânions envolvidos (Negi *et al.*, 2008).

Entre as respostas moleculares das plantas a deficiência hídrica, ressalta-se a capacidade de ativação de complexos enzimáticos, principalmente por alterações conformacionais na membrana celular, que iniciam uma cascata de eventos moleculares e que levam à indução da expressão de vários genes durante o estresse, acelerando a proteção às funções celulares no citoplasma, promovendo a absorção de água, controlando a acumulação de íons, caracterizando o ABA e, em adição, regulamentando a expressão gênica (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Alterações na conformação de membranas celulares, devido à perda de turgor, provocariam mudanças em canais de transporte ativados por pressão; modificações na conformação ou na justaposição de proteínas sensoriais, embebidas nas membranas celulares, ou alterações na continuidade entre a parede celular e a membrana plasmática (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2000). Devido à

perda de pressão da parede, complexos enzimáticos ativados pelas alterações mencionadas acima, iniciam uma cascata de eventos moleculares levando a indução da expressão de várias categorias de genes (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Mecanismos de resposta à seca podem, portanto, ser medidos em níveis metabólicos. Diferenças na tolerância ao estresse entre cultivares ou estádios de desenvolvimento podem resultar em expressão de genes diferenciados e envolvidos em qualquer etapa da resposta, desde a percepção do sinal até os mecanismos de transdução e regulação gênica (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Chinnusamy *et al.*, 2004). Entretanto, a expressão de um gene não garante que o produto específico promova a capacidade da planta em sobreviver ao estresse. Assim, uma melhor compreensão dos genes e produtos de sua expressão, envolvidos nas respostas das plantas a deficiência hídrica devem ser conduzidos.

2.4 ÁCIDO ABSCÍSIKO (ABA) E SUA SINALIZAÇÃO

O ABA é um composto sesquiterpenóide (estrutura de 15 carbonos) formado a partir da unidade C₅ comum dos terpenos, o isopentenil-pirofosfato (IPP), sintetizado parcialmente nos cloroplastídios e outros plastídios (Taiz e Zeiger, 2009). Pertence ao grupo dos fitormônios que são, estruturalmente, pequenas moléculas independentes e fundamentais na integração de respostas da planta a diversos estímulos ambientais. Essa complexidade é refletida pela contribuição da síntese, transporte e vias de sinalização dos hormônios e pela diversidade de interações entre eles para controlar o crescimento vegetativo (Taiz e Zeiger, 2009). Atualmente, com o avanço das pesquisas, principalmente na área da genética, muitos aspectos da biologia hormonal em plantas, têm sido elucidados (Santner e Estelle, 2009). As barreiras vencidas pela genética resultaram na identificação de muitas proteínas envolvidas na sinalização hormonal e as análises destas proteínas têm contribuído significativamente para os modelos atuais dos mecanismos de ação dos hormônios. Um resultado interessante é a recente identificação de receptores para os diferentes hormônios, em particular o ABA (Santner e Estelle, 2009).

O ABA é um fitormônio que apresenta respostas iniciais e fundamentais em diferentes processos de desenvolvimento da planta, o que inclui formação, dormência e germinação das sementes, resposta na defesa das plantas a diferentes estresses bióticos e abióticos, como a seca, frio e salinidade (Hugouviex *et al.*, 2001).

Duas possíveis rotas têm sido sugeridas para a biossíntese do ABA. Na via direta, o ABA é derivado de um composto farnezilpirofosfato (Seo e Koshiba, 2002). Pela via indireta (Figura 1), a biossíntese do ABA ocorre nos cloroplastos e em outros plastídios. Estudos recentes mostram que a via indireta inicia-se com o isopentenil-pirofosfato (IPP), e por meio de reações enzimáticas ocorridas na rota biossintética dos carotenóides, forma-se o carotenóide oxigenado violaxantina, catalisada pela enzima epoxidase da zeaxantina (ZEP). A elucidação de que a enzima ZEP é codificada pelo locus *ABA1*, identificado em *Arabidopsis* (Milborrow, 2001), a caracterização de mutantes deficientes em ABA e o isolamento de genes mutantes, demonstram que a via indireta ou via dos carotenóides é preferencialmente a via da síntese de ABA (Taiz e Zeiger, 2009).

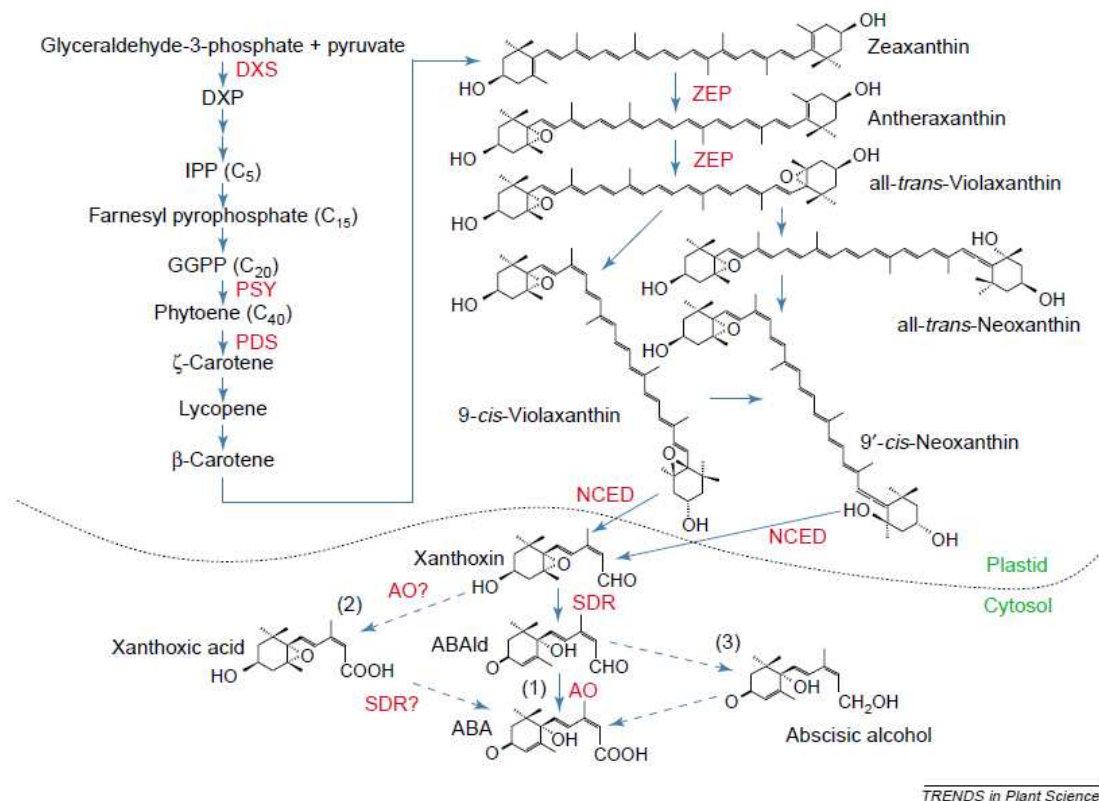


Figura 1: Via indireta da biossíntese do ácido abscísico (ABA) em plantas. Fonte de Seo e Koshiba (2002).

Estudos genômicos, particularmente tendo *Arabidopsis thaliana* como planta-modelo, tem permitido a identificação de componentes chaves na transdução de sinais do ABA, incluindo proteínas quinases, fosfatases, fatores de transcrição, fatores de processamento de RNA, proteínas de remodelação da cromatina e desacetilases de histonas. De modo geral, esses componentes medeiam a regulação epigenética, em especial os induzidos por estresse hídrico (Klingler *et al.*, 2010).

Altas concentrações de ABA em plantas sob deficiência hídrica é chave para uma cascata de alterações fisiológicas e genéticas. Este fitormônio apresenta na sua cadeia sintética uma enzima chave na clivagem oxidativa das xantofilas, 9'-cis-violaxantina e/ou 9'-cis-neoxantina, para produzir xantoxina, o precursor direto do ABA (Rodrigo *et al.*, 2006) (Figura 1). Esta etapa é catalisada pela dioxigenase do 9-cis-epoxicarotenóide (NCED). Um dos principais avanços para o entendimento da regulação da biossíntese do ABA se deu com a identificação do NCED, que ocorreu pela primeira vez durante a caracterização do mutante *viviparo14* (*vp14*) de milho (*Zea mays*), (Tan *et al.*, 1997; Seo e Koshiba., 2002). Posteriormente *notabilis*, um tomate mutante deficiente em ABA, também foi apresentado como sendo defeituoso no gene *Vp14* relatado (LeNCED1) (BURBIDGE *et al.*, 1999). O gene *NCED* foi clonado a partir de várias espécies como o feijão (*Phaseolus vulgaris*) (Qin e Zeevaart, 1999), abacate (*Persea americana*) (Chernys e Zeevaart 2000) e *Arabidopsis* (Neill, 1998; Iuchi, 2001; Seo e Koshiba, 2002). Em todas as espécies examinadas, NCED compreende uma família de genes homólogos. Após a clivagem da 9-cis-epoxicarotenóide nos plastídios, a xantoxina obtida é convertida para ABA no citosol. Estudos com *Phaseolus vulgaris*, confirmaram a expressão da NCED durante a deficiência hídrica, mostrando claramente a relação entre a expressão do mRNA (PvNCED1), os níveis da proteína NCED e os níveis de ABA em folhas e raízes desidratadas, indicando o papel regulatório do NCED na biossíntese do ABA durante a deficiência hídrica (Qin e Zeevaart, 1999).

Muitos fatores de transcrição envolvidos na sinalização do ABA têm sido identificados, incluindo o grupo das proteínas do tipo 2C fosfatases (PP2Cs),

consideradas as enzimas chaves nas vias de sinalização do ABA. Várias proteínas interagem com as PP2Cs, podendo destacar um grupo de proteínas SnRK2s (SNF1-RELATED PROTEIN KINASES2), que são objetos de muitos estudos. As proteínas, SnRK2.2, SnRK2.3 e SnRK2.6 também são conhecidas como OST1 (OPEN STOMATAL 1) (Vlad *et al.*, 2009; Fu *et al.*, 2009; Klingler *et al.*, 2010). As proteínas SnRK2s são ativadas mediante o ABA, e atuam regulando a abertura dos estômatos e induz a expressão gênica ao iniciar a transdução dos sinais do ABA nas células-guarda (Miyazono *et al.*, 2009; Nishimura *et al.*, 2010).

Entre as proteínas fosfatases destacam-se ABI1 e ABI2, que se comportam como reguladores negativos na ativação do ABA, e quando associadas com as proteínas quinases, atuam como reguladores positivos na sinalização do ABA, promovendo, assim, o fechamento estomático nas folhas das plantas (Fugii e Zhu, 2009). Alguns resultados têm sustentado a afirmativa de que as PP2Cs tem papel importante na etapa inicial da sinalização do ABA por meio da regulação e desfosforilação, ativada pelo OST1 (Fugii e Zhu, 2009; Vlad *et al.*, 2009). O OST1 apresenta diferentes mecanismos de resposta na sinalização do ABA. PARK *et al.* (2009), demonstraram que as proteínas PYR/PYL/RCARs (Pirabactina de Resistência 1, PYR/PYL e componentes regulatórios de receptores de ABA, RCARs) são requeridas em atividade normal das SnRK2 quinases. Em outro estudo, Mustilli, *et al.* (2002) demonstram que o *ost1* atua no intervalo entre a percepção do ABA e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Sendo assim, o *ost1* é um elemento essencial nas vias de sinalização de ABA mediando a regulação estomática nas plantas em resposta à seca.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL E APLICAÇÃO DA DEFICIÊNCIA HÍDRICA

O estudo foi realizado em condições de casa de vegetação na sede da Embrapa Mandioca e Fruticultura, município de Cruz das Almas, Recôncavo Baiano, nas coordenadas geográficas 12°40'39" de latitude sul e 39°06'23" de longitude oeste, com altitude de 226 m (Figura 2A). Os genótipos selecionados foram *Citrus limonia* Osb., (Limoeiro 'Cravo') e *C. sunki* (Tangerineira 'Sunki Maravilha'), em virtude da presença de características de interesse, especialmente quanto a tolerância à seca. As plantas foram obtidas pelo processo de poliembrionia, caracterizado pela presença de dois ou mais embriões em uma mesma semente. (Figura 2C).



Figura 2: Local de obtenção do material vegetal. A: Centro EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA. B: Viveiro de mudas. C: Plantas de limoeiro 'Cravo' e a tangerineira 'Sunki Maravilha' utilizadas nos experimentos.

O experimento iniciou-se com as plantas de 6 meses de idade, e com média de 15 a 20 folhas, que foram então acondicionadas em um telado apropriado no viveiro de mudas da EMBRAPA (Figura 2B). Primeiramente, os

indivíduos foram transplantados para vasos com capacidade de 15L, contendo substrato composto de Plantmax (Eucatex Agro.), areia lavada e argila na proporção de 2:1:1, respectivamente. A adubação foi aplicada via parte aérea. (Figura 3).



Figura 3: Transplantação e restabelecimento dos porta-enxertos Limoeiro ‘Cravo’ e tangerineira ‘Sunki Maravilha’. (A) As plantas foram retiradas dos sacos plásticos, onde foram germinadas e permaneceram até o momento do transplantação. (B) Após a retirada de todo o substrato, com cuidado para não destruir a raiz, as plantas foram acondicionadas em vasos de 15L. (C) As plantas foram irrigadas até a saturação do solo. (D) Todos os indivíduos foram transferidos para novos vasos e, em seguida, levados dos para casa de vegetação.

As plantas foram transferidas para casa de vegetação e mantidas com umidade e temperaturas do ar controladas (70 à 80% e 25 à 30 C°). Cada vaso, contendo apenas uma planta, foi irrigado para que o solo fosse mantido próximo a capacidade de campo até o momento de ser aplicado o tratamento de deficiência hídrica. Após 45 dias do transplante, as mudas foram divididas em dois grupos (i) **Tratamento Controle**, onde as plantas foram mantidas permanentemente irrigadas próximas a capacidade de campo e (ii) **Tratamento sob deficiência hídrica**, onde as plantas foram submetidas à suspensão completa da irrigação. A aplicação da deficiência hídrica teve duração de 40 dias, e os vasos foram tampados na parte superior com papel alumínio, para que fosse minimizada a perda de água por evaporação (Figura 4).



Figura 4: Plantas do limoeiro ‘Cravo’ e da tangerineira ‘Sunki Maravilha’ acondicionadas em casa de vegetação, mantidas controladas a temperatura e umidade relativa do ar, para a implementação da deficiência hídrica.

A deficiência hídrica ocorreu de forma progressiva em função do esgotamento da água remanescente no solo. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente ao acaso, com 1 tratamento controle com 4 repetições e o sob deficiência hídrica com 11 repetições. Foram feitos o monitoramento da umidade de água (m^3m^{-3}) no solo por meio da sonda TDR (reflectometria no domínio do tempo). Para o cálculo da transpiração das plantas ($\text{L m}^{-2} \text{folha dia}^{-1}$) foram utilizadas as diferenças de umidade do solo no início da manhã (θ_i) e final da tarde (θ_f), conhecidos o volume de solo explorado (V_s) e área foliar total da planta (m^2): $(\theta_i - \theta_f)V_s/AF$.

A relação entre transpiração e umidade do solo foi estimada para cada genótipo relacionando-se a taxa de transpiração normalizada (NTR) com a fração de água transpirável do solo (FTSW), de acordo com Sinclair e Ludlow (1986). A NTR foi calculada dividindo-se a taxa de transpiração diária de cada planta do grupo sob deficiência hídrica, pela taxa de transpiração média diária das plantas controle (Cont) para cada genótipo. A FTSW foi calculada segundo a equação:

$$\text{FTSW: } \frac{\text{umidade do dia} - \text{umidade final}}{\text{umidade inicial} - \text{umidade final}}$$

Com base nos dados da umidade do solo (m^3m^{-3}) foram determinados 3 momentos de coletas para obtenção das amostras de folhas e raiz do grupo das plantas sob deficiência hídrica. A fase 1 foi aquele do início da deficiência e que a umidade de água do solo estava entre 0,20-0,19 m^3m^{-3} , a fase 2, foi a condição intermediária da deficiência hídrica e a umidade de água do solo era de 0,17-0,16 m^3m^{-3} e a fase 3 foi a deficiência mais severa com a umidade de água do solo de 0,15-0,14 m^3m^{-3} . Para as plantas controle o valor de umidade de água no solo foi de 0,29-0,28 (m^3m^{-3}). Nesta ocasião o material vegetal, folha e raiz, foram destacados com uma lâmina de bisturi, envolvido com papel alumínio e imediatamente congelado com nitrogênio líquido até serem armazenadas no freezer -80°C , para posteriores análises.

3.2 ÁREA FOLIAR TOTAL

As plantas foram avaliadas após o período do transplântio, onde foi medida área foliar por planta, de todos os genótipos nos primeiros dias após a aplicação da deficiência hídrica. Posteriormente, foram selecionadas as folhas mais jovens em cada indivíduo, e diariamente, mediu-se o comprimento e a largura até estabelecer o seu crescimento e com o surgimento de novas folhas era feita a troca pela folha mais jovem e continuou-se as avaliações a partir desta data. Quando a planta não lançava novas folhas a taxa de crescimento era tida como 0 (zero). A área foliar foi determinada multiplicando-se o valor do comprimento pela largura. Esse resultado foi multiplicado por um fator de ajuste igual a 0,72, obtido em outros trabalhos (Delgado-Rojas, 2003).

3.3 RESISTÊNCIA ESTOMÁTICA

A resistência estomática da folha foi determinada por meio do porômetro portátil Porometer AP4 (Delta -T Devices). As medições foram realizadas sob condições de luz e CO_2 ambientes, diariamente, entre 09h30 e 12h30, durante todo o período da deficiência hídrica.

3.4 POTENCIAL HÍDRICO FOLIAR

O potencial hídrico foliar foi determinado entre 4h00 e 5h00, por meio de uma bomba de pressão do tipo Scholander (m670, Pms Instrument Co., Albany, USA). As folhas foram destacadas com o auxílio de uma lâmina de bisturi e imediatamente os dados foram coletados.

3.5 POTENCIAL OSMÓTICO FOLIAR

Para a determinação da osmolaridade total do tecido foliar, foram coletadas folhas do terço médio da parte aérea da planta, as quais foram maceradas em almofariz com pistilo. O extrato foliar foi filtrado e centrifugado em 14.000 g por 10 min a 4°C. Uma alíquota de 10 µL do sobrenadante foi utilizada para a determinação da osmolaridade do tecido, com um osmômetro de pressão de vapor Vapro 5520 (Wescor, Inc., Logan, USA).

O osmômetro foi calibrado previamente com soluções de NaCl com concentrações conhecidas (mmolkg⁻¹). Os valores obtidos em mmolkg⁻¹ foram convertidos em potencial osmótico, por meio da equação de Van't Hoff, através da fórmula:

$$\psi_s = -RTC$$

onde, o R é dada pela constante dos gases 0,00813; T é a temperatura em graus Kelvin e C é a concentração do extrato foliar em mmol/kg e convertida a moles.

O potencial osmótico foi corrigido (PO + 0,1 PO), pois ocorre uma diluição da água do compartimento apoplástico com o simplástico, assumindo 10% de água do apoplástico (Krammer, 1983; Moinuddin, 2004).

3.6 CONCENTRAÇÃO DE Na⁺ E K⁺

Na⁺ e o K⁺ foram determinados em amostras compostas de folhas, em cada tratamento das plantas sob deficiência hídrica e das plantas controle.

Após a secagem das folhas em estufa apropriada, foi utilizada 50mg de cada amostra para a digestão com uma mistura de ácido nítrico e ácido perclórico aquecidos gradualmente até 250°C, obtendo-se um extrato transparente. O extrato foi diluído em água pura na proporção de 1:100. A leitura da quantificação foi realizada no espectrofotômetro de chama (Fotômetro de chama B462 Micronal).

3.7 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

As sequências de nucleotídeos e aminoácidos dos NCEDs de espécies do gênero *Citrus* e de outros gêneros, foram obtidas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) a partir de busca por genes homólogos. A procura por homologia foi realizada usando o programa BLAST no site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), e o alinhamento múltiplo de sequências foi deduzido com o programa CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994). O dendrograma de similaridade foi gerado usando o método 'Neighbor-joining' (Saitou e Nei, 1987), incluído no CLUSTAL-W, e foi construído pelo programa MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007).

3.8 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA

Após as medidas de potencial hídrico foliar, o material vegetal a ser analisado (folhas e raízes) foi destacado, acondicionado em papel alumínio e imediatamente congelado em nitrogênio líquido (N₂) e armazenado em freezer -80°C.

As amostras de RNA total foram isoladas utilizando o Kit RNAqueous (Ambion, Inc.), seguindo as instruções do fabricante. A qualidade e a integridade do RNA extraído foram avaliadas por análise em gel de agarose a 1,5%. As amostras foram tratadas com DNase após o processo de extração, usando o Kit Turbo DNA-free (Ambion, Inc.) seguindo as instruções do fabricante (1µl de DNase). A ausência de contaminação com DNA genômico foi confirmada por PCR negativo, usando os primers para o gene da β-actina. A reação de transcrição reversa foi realizada usando o kit RETROscript (Ambion Inc.), seguindo as instruções do fabricante.

3.9 ANÁLISE DE qRT-PCR

A abundância dos transcritos de mRNA foi analisada por PCR em tempo-real, usando um ABI Prism 7500 e o programa “Sequence Detection System” (Applied Biosystem). O gene da β -actina (ACT) foi amplificado junto com o gene-alvo, como controle endógeno, para normalizar a expressão entre as diferentes amostras.

As reações de PCR em tempo real foram conduzidas em triplicata, em volume de reação de 20 μ L, contendo 75-100 ng de cDNA, 1 μ L de primer (F+R) na concentração de 500nM, 10 μ L de Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Fermentas, EUA) e aproximadamente 8 μ L de água Milli-Q esterilizada por autoclavagem. As condições de amplificação foram realizadas utilizando-se as seguintes etapas: (1) ativação da Taq DNA polimerase a 50°C por 2 min, (2) desnaturação inicial a 95°C por 10 min, (3) desnaturação a 94°C por 15 s, (4) anelamento a 60°C por 30 s e (5) extensão a 60°C por 1 min. As etapas 3 a 5 foram repetidas por 45 ciclos.

Para quantificação da expressão gênica, foi utilizado o método comparativo de Ct: $\Delta\Delta C_t$, com dados provenientes de pelo menos duas repetições biológicas. Reações controle desprovidas de cDNA (NTC) também foram utilizadas em todos os experimentos. O programa Dissociation Curve 1.0 (Applied Biosystems, EUA) foi usado para verificar que somente um único produto de PCR foi gerado pela amplificação dos transcritos. O teste t foi empregado a fim de comparar os valores de expressão entre os tratamentos controle e de estresse.

Os *primers* usados nos experimentos estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Sequências dos *primers* usados nos experimentos de qRT-PCR.

Primer	Sequência	Referência
β-actina	F: 5'-TTAACCCCAAGGCCAACAGA-3' R: 5'-TCCCTCATAGATTGGTACAGTATGGAC-3'	Malladi e Burns (2008)
NCED 1	F: 5'-GACCAGC AAGTGGTGTTC-3' R: 5'-AGAGGTGGAACAGGAGCAA-3'	Mouhaya (2008); Bassene et al. (2009)
NCED 2	F: 5'-GGTGCCAACCCATTATTCGA-3' R: 5'-GCCGTCACCGTCAAAGAAAT-3'	Kato et al. (2006); Bassene et al. (2009)
NCED 3	F: 5'-GGAGAATGAGGATGATGGC TAC-3', R: 5'-CTTTCGCGCTTATGAACGTG-3',	Augusti et al. (2007)
NCED 4	F: 5'-GCCATTATTTGTGCCAAGG-3', R: 5'-GATTTGGTGTGTTGGCATCC-3',	Augusti et al. (2007)
NCED 5	F: 5'-CTTCCCAACGAAGT CCATAG-3', R: 5'-GGATTCCATTGTGATTGCTG-3',	Augusti et al. (2007)
OST1	F: 5'-ATTGCTGAA CCACCATACC-3 R: 5'-TATACAATCTCCCCGCT GCT-3	

3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O delineamento experimental usado foi o, inteiramente casualizado. Duas parcelas foram representadas pelas plantas controle e sob deficiência hídrica. Após análise de variância, as médias foram comparadas por teste Tukey a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS

4.1 TEOR DE ÁGUA NO SOLO

A partir da análise do teor de água no solo entre as plantas controle e as plantas sob deficiência hídrica, foi observado que a diferença entre os tratamentos ocorreu a partir do 10º dia da aplicação da deficiência hídrica em ambos os genótipos de limoeiro 'Cravo' e da tangerineira 'Sunki Maravilha'. O teor de água no solo foi mantido em condições próximas da capacidade de campo nas plantas controle dos genótipos avaliados. Foi observa-se que a partir da curva de retenção de água no solo as plantas sob deficiência hídrica manteve-se constante no decorrer do tempo e essa perda foi considerada significativa a partir de 30 dias após a aplicação dos tratamentos. (Figura 5).

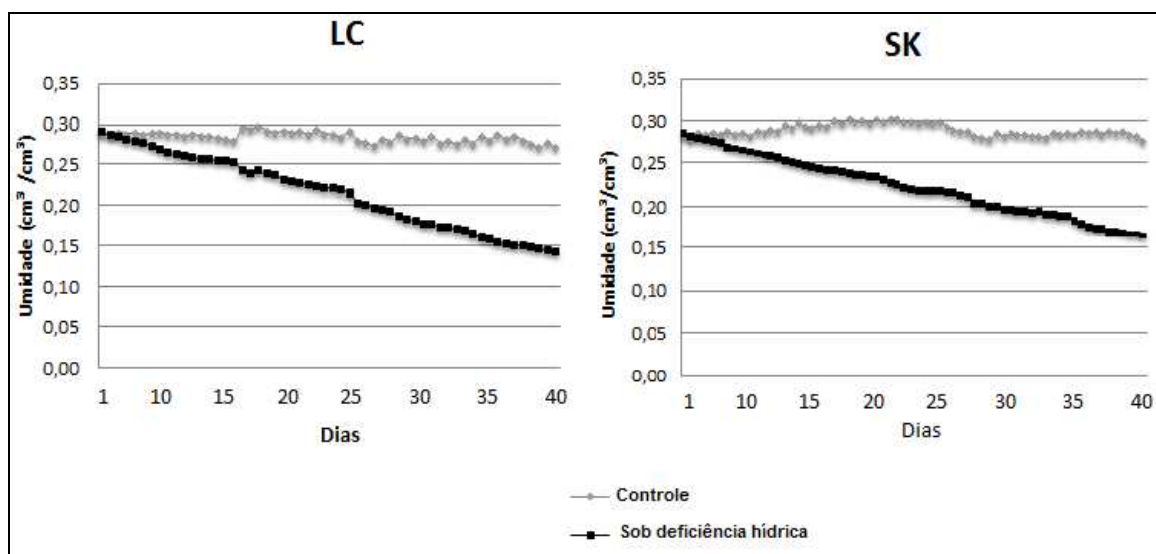


Figura 5: Teor de água no solo determinada a partir da curva de retenção de água no solo (cm^3/cm^3), determinado pela TDR, em plantas de Limoeiro 'Cravo' (LC) e tangerineira 'Sunki Maravilha' (SK), submetidas ou não a deficiência hídrica.

4.2 PERDA DE ÁGUA E TAXA DE TRANSPIRAÇÃO

A partir da perda do teor de água no solo, determinou-se os momentos da coleta dos dados fisiológicos e de expressão gênica. Determinou-se também a fração de água transpirável do solo (FTSW - *Fraction Transpirable Soil Water*) e a taxa de transpiração normalizada (NTR - *Normalized Transpiration Rate*) durante o período de aplicação da deficiência hídrica. Esse tipo de análise

permite uma melhor comparação no desempenho das respostas das plantas a deficiência hídrica.

Observou-se que o momento de virada, ou seja, quando as plantas, sob restrição hídrica, começaram a ter sua transpiração alterada, ocorreu em FTSW diferente para os genótipos avaliados. Plantas sob deficiência hídrica de limoeiro 'Cravo' apresentaram a FTSW e NTR reduzidas em aproximadamente 20% (FTSW de 0,19 e NTR de 0,24) (Figura 6A). Para a tangerineira 'Sunki Maravilha', no mesmo momento de umidade no solo, ocorreu redução significativa da FTSW e da NTR em torno de 30% (FTSW de 0,33 e NTR de 0,27) (Figura 6B).

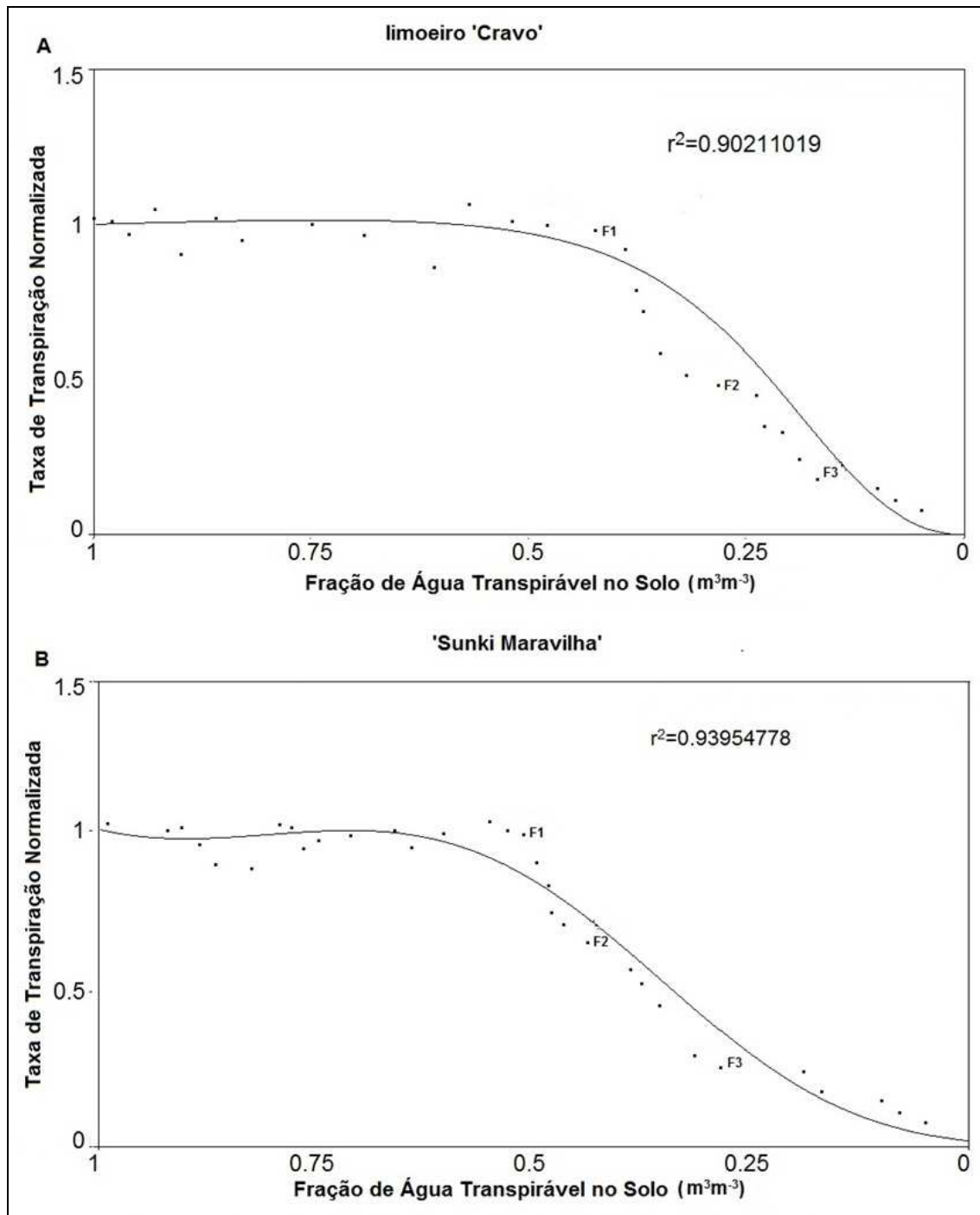


Figura 6: Curva de resposta da taxa de transpiração normalizada (NTR) em função da fração de água transpirável no solo em plantas de limoeiro 'Cravo' (A) e da tangerineira 'Sunki Maravilha' (B) em diferentes fases da coleta (F1, F2 e F3).

4.3 ÁREA FOLIAR TOTAL

Após 40 dias de deficiência hídrica, observou-se um aumento na área foliar total por plantas do limoeiro 'Cravo' em relação ao início do tratamento. Já para a tangerineira 'Sunki Maravilha' não houve o aumento na área foliar das

plantas sob deficiência hídrica. Observou-se que as plantas controle de limoeiro 'Cravo' apresentaram aproximadamente 0,12 m² de área foliar por planta ao final do experimento, enquanto que as plantas sob deficiência hídrica apresentaram aproximadamente 0,11 m² ao final do experimento. Já para as plantas da tangerineira 'Sunki Maravilha' foi observado um perfil diferente, pois as plantas controles tinham ao final do experimento 0,06 m² e as plantas submetidas à deficiência hídrica apresentaram 0,041 m² de área foliar média (Figura 7). Estatisticamente, o perfil das plantas do limoeiro 'Cravo' não apresentaram diferenças quando comparadas as plantas controle e as plantas sob deficiência hídrica ao final do experimento. Já para a tangerineira 'Sunki Maravilha', as plantas controle apresentaram com uma taxa de crescimento constante, diferente das plantas sob deficiência hídrica, diferindo estatisticamente.

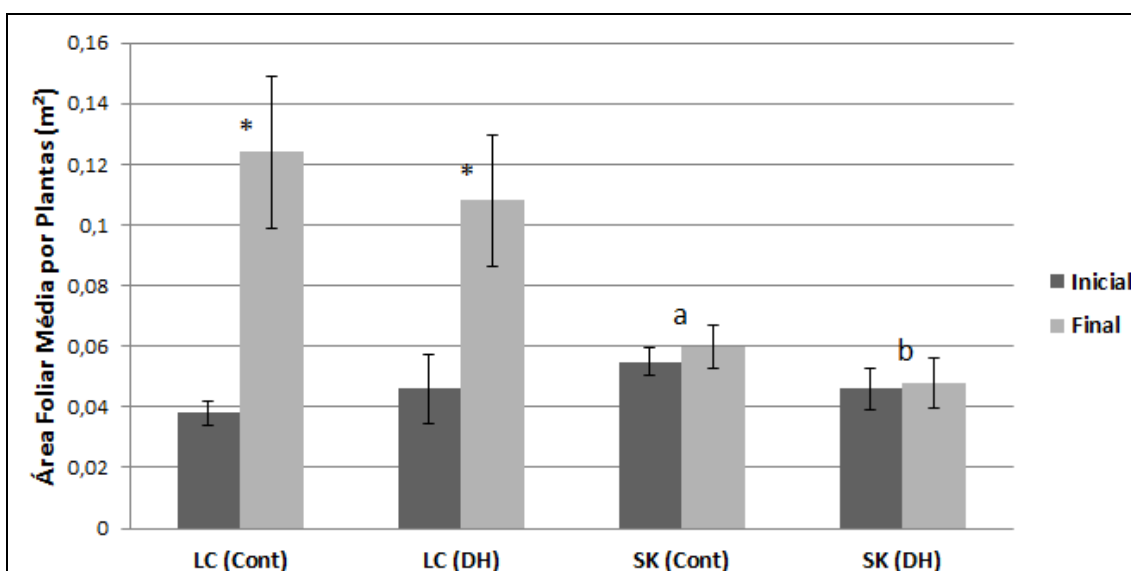


Figura 7: Área foliar das plantas controle (Cont) e sob deficiência hídrica (DH) de limoeiro 'Cravo' (LC) e da tangerineira 'Sunki Maravilha' (SK) durante o período do experimento. As médias seguidas por letras diferentes, para cada genótipo, apresentam diferenças estatísticas pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$). * indica que não houve diferença estatística entre os tratamentos e/ou genótipos.

4.4 RESISTÊNCIA ESTOMÁTICA (gs)

O aumento da gs ocorre como estratégia na economia de água, uma vez que quanto maior a resistência estomática menor é a tendência de transpiração (Irvine *et al.*, 1998). Observou-se que gs aumentou de forma gradativa durante

todo o período da deficiência e está relacionado aos dados de FTSW/NTR (Figura 8), pois à medida que esses fatores reduzem, gs tende a aumentar.

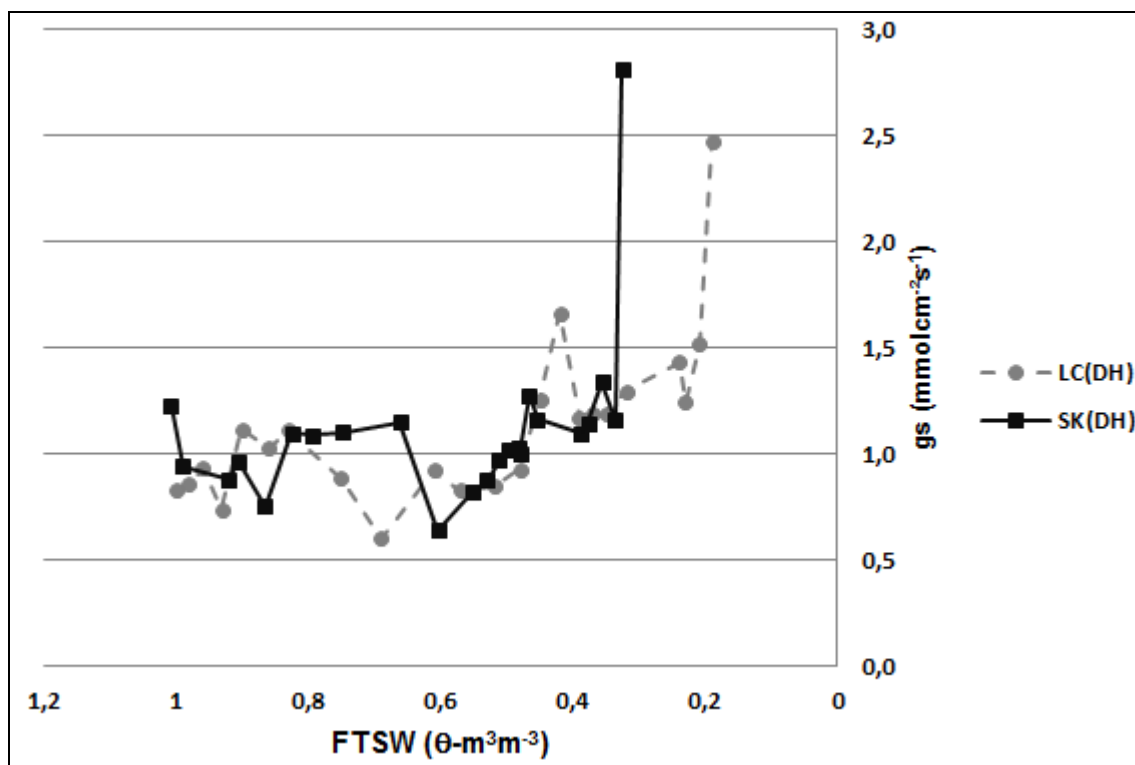


Figura 8: Resistência estomática (gs) em relação a fração de água transpirável do solo nas plantas sob deficiência hídrica (DH) do limoeiro 'Cravo' e da tangerineira 'Sunki Maravilha'.

Nos primeiros 30 dias de experimento montado, as plantas sob deficiência hídrica encontravam-se com os valores de gs semelhantes aos das plantas controle.

Comparando os tratamentos com as avaliações diárias de gs das plantas controle e sob deficiência hídrica (Figura 9), o limoeiro 'Cravo' apresentou na fase 1 com a gs média de $0,93 \text{ mmolcm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Observou-se que na fase 2, as plantas sob deficiência hídrica apresentaram um pequeno aumento de gs para $1,20 \text{ mmolcm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Já na fase 3, esse aumento foi mais significativo, chegando a $2,48 \text{ mmolcm}^{-2}\text{s}^{-1}$ o que caracteriza uma maior deficiência hídrica, quando comparado às plantas controle, que apresentaram no mesmo período um valor de gs médio de $0,98 \text{ mmolcm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Na avaliação da tangerineira 'Sunki Maravilha' foi observado, na fase 1, as folhas das plantas sob deficiência hídrica apresentaram valores de gs de $0,97 \text{ mmolcm}^{-2}\text{s}^{-1}$, semelhantes aos das plantas controle. A partir da fase 2, as plantas sob deficiência hídrica apresentaram valor médio de $1,15 \text{ mmolcm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Na fase 3 esse aumento

permaneceu nas plantas sob deficiência hídrica, apresentando resistência estomática de $2,81 \text{ mmol cm}^{-2}\text{s}^{-1}$.

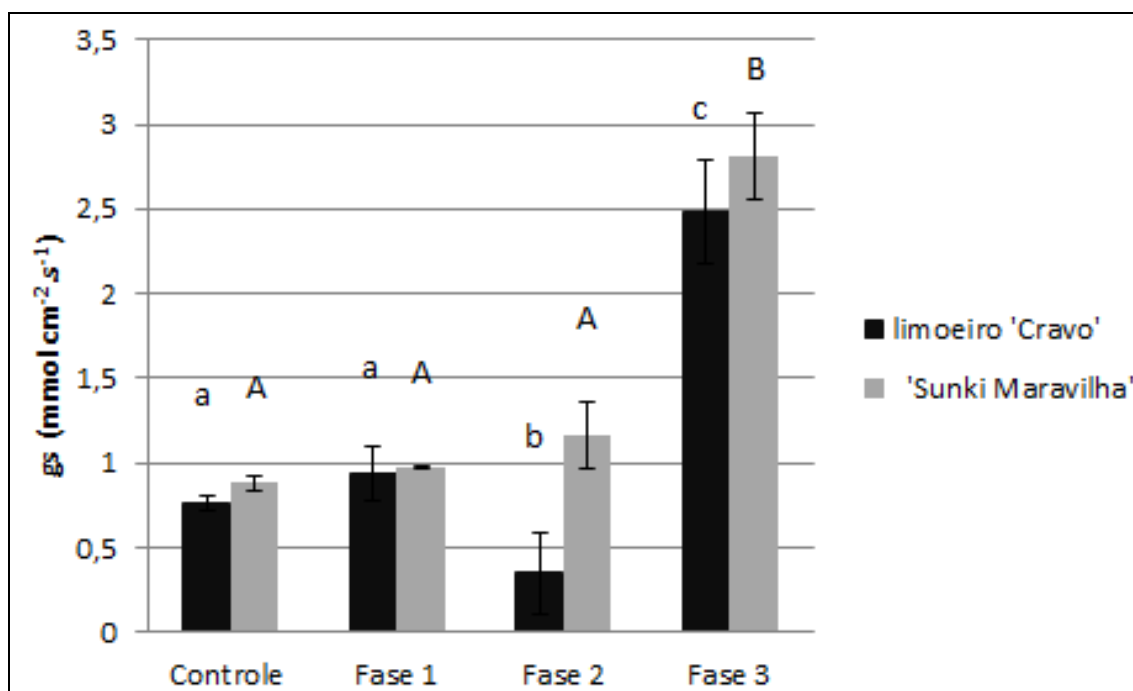


Figura 9: Resistência estomática (gs) das plantas controle e sob deficiência hídrica (Fase 1, Fase 2 e Fase 3), no limoeiro 'Cravo' (LC) e na tangerineira 'Sunki Maravilha' (SK). Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

4.5 POTENCIAL HÍDRICO FOLIAR (ψ_{WF})

Nas plantas controle de ambos os cultivares, o potencial hídrico foliar foi sempre superior a $-0,25 \text{ MPa}$. Estatisticamente, os potenciais hídricos encontrados nas fase 1 e 2 das plantas sob deficiência hídrica não foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) quando comparados às plantas controle. Na fase 3, os cultivares apresentaram valores de potencial hídrico diferentes ($p < 0,05$) estatisticamente de seus controles, sendo $-1,43 \text{ MPa}$ no limoeiro 'Cravo' e $-1,3 \text{ MPa}$ para tangerineira 'Sunki Maravilha' (Figura 10).

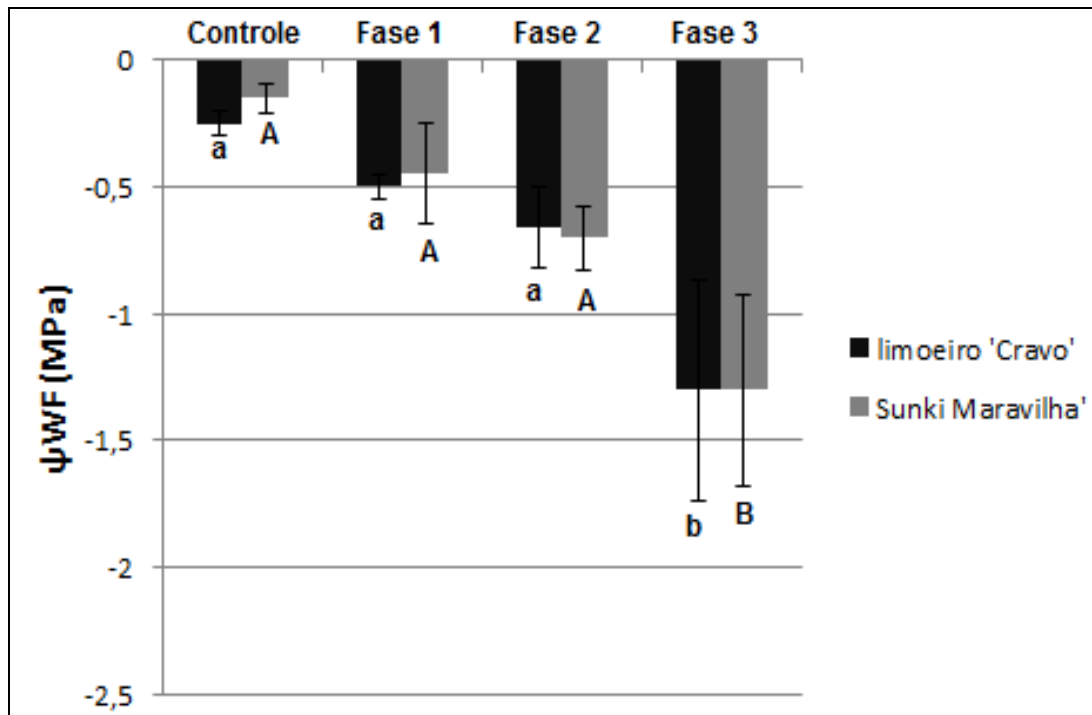


Figura 10: Potencial hídrico foliar (ψ_{WF}) em plantas de limoeiro 'Cravo' e da tangerineira 'Sunki Maravilha', controle e sob deficiência hídrica (Fase 1, Fase 2 e Fase 3). As médias seguidas pelas mesmas letras, sendo maiúscula e minúscula em cada genótipo, não apresentam diferenças estatísticas pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

4.6 POTENCIAL OSMÓTICO ($\psi_{\pi F}$)

Quando avaliado o potencial osmótico foliar, não observaram-se diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre as plantas avaliadas, nos diferentes tempos de coleta (Figura 11). Em média, as folhas das plantas de tangerineira 'Sunki Maravilha' apresentaram valores de potencial osmótico de $-1,86$ MPa, enquanto as plantas de limoeiro 'Cravo', esses valores médios foram de $-1,61$ MPa.

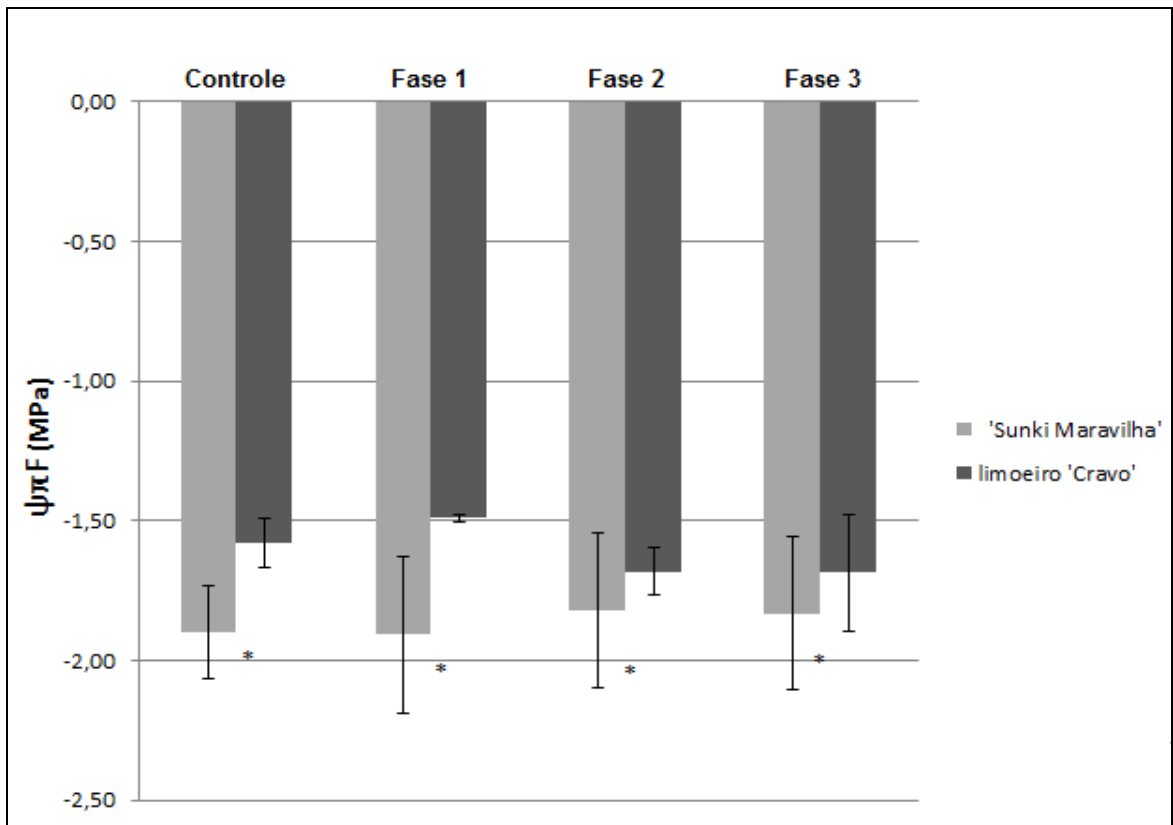


Figura 11: Potencial osmótico foliar ($\psi_{\pi F}$) em plantas controle e plantas sob deficiência hídrica (Fase 1, Fase 2 e Fase 3) do limoeiro 'Cravo' e da tangerineira 'Sunki Maravilha', * Não significativo.

4.7 TEOR DE K^+

Nas duas espécies avaliadas, observaram-se diferenças para os teores de K^+ nas folhas entre as plantas controle e as plantas sob deficiência hídrica. Os teores de K^+ determinados na tangerineira 'Sunki Maravilha' na fase 2 do estresse foi $12,7 \text{ g/kg}^{-1}$ de matéria seca, valor considerado baixo, e na fase 2 o teor de K^+ apresentou valor de $15,1 \text{ g/kg}^{-1}$, caracterizando por um aumento. Nas plantas de limoeiro 'Cravo' os teores de K^+ foram crescentes entre as fases 1 e 2, e na fase 3 ocorre redução, chegando a $18,6 \text{ g/kg}^{-1}$ (Figura 12).

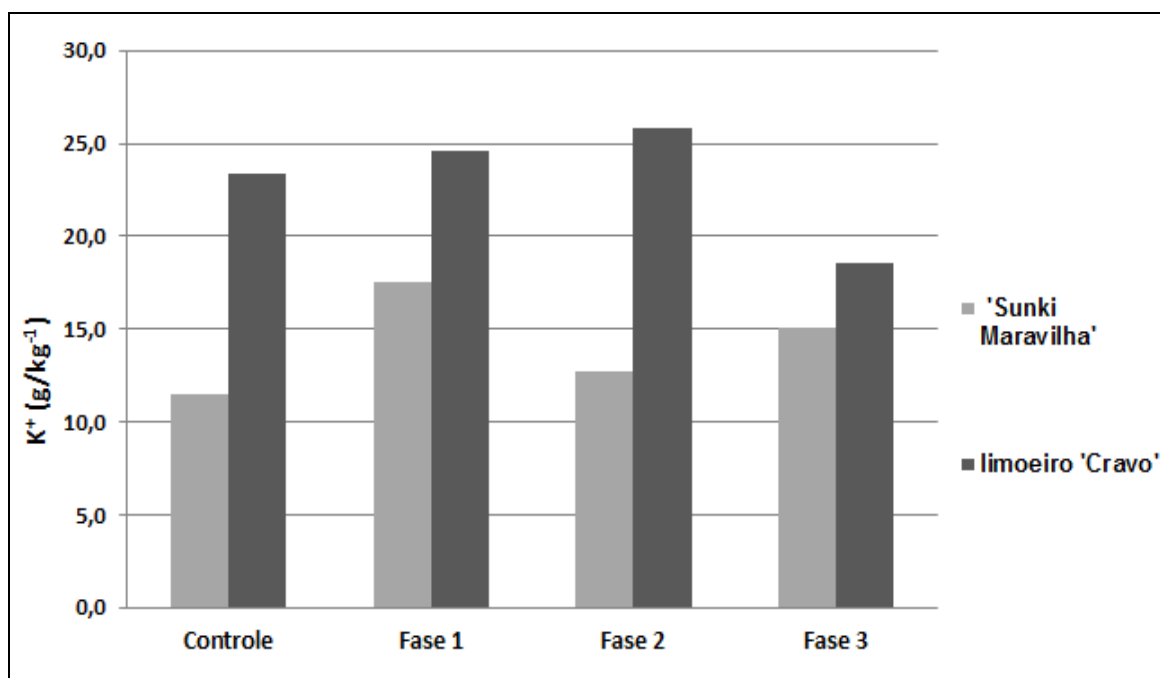


Figura 12: Teor de potássio (K^+) nas folhas em plantas controle e plantas sob deficiência hídrica (Fase 1, Fase 2 e Fase 3), de tangerineira 'Sunki Maravilha' e de limoeiro 'Cravo'.

4.8 TEOR DE Na^+

A comparação da concentração de Na^+ nas folhas, entre os genótipos estudados demonstra que houve diferença entre as plantas de limoeiro 'Cravo' e a tangerineira 'Sunki Maravilha', submetidas ou não a deficiência hídrica, no decorrer do tempo (Figura 13). Nas plantas controle do limoeiro 'Cravo', a concentração de Na^+ foi de $0,33 \text{ g/kg}^{-1}$ de matéria seca. Na fase 1, as plantas do limoeiro 'Cravo' apresentaram-se com $0,1 \text{ g/kg}^{-1}$ nas folhas, valor considerado baixo; já na fase 2 foi de $0,13 \text{ g/kg}^{-1}$ e na fase 3 os valores foram em torno de $0,29 \text{ g/kg}^{-1}$, o que caracterizou um aumento considerável de Na^+ em relação os outros tratamentos.

Na folhas das plantas da tangerineira 'Sunki Maravilha' foram observados que a concentração de Na^+ foi maior entre as plantas sob deficiência hídrica na fase 2, cuja concentração foi $3,11 \text{ g/kg}^{-1}$, sendo a maior encontrada entre os tratamentos. Já na fase 3, o valor foi de $1,19 \text{ g/kg}^{-1}$, caracterizando uma redução na concentração de Na^+ .

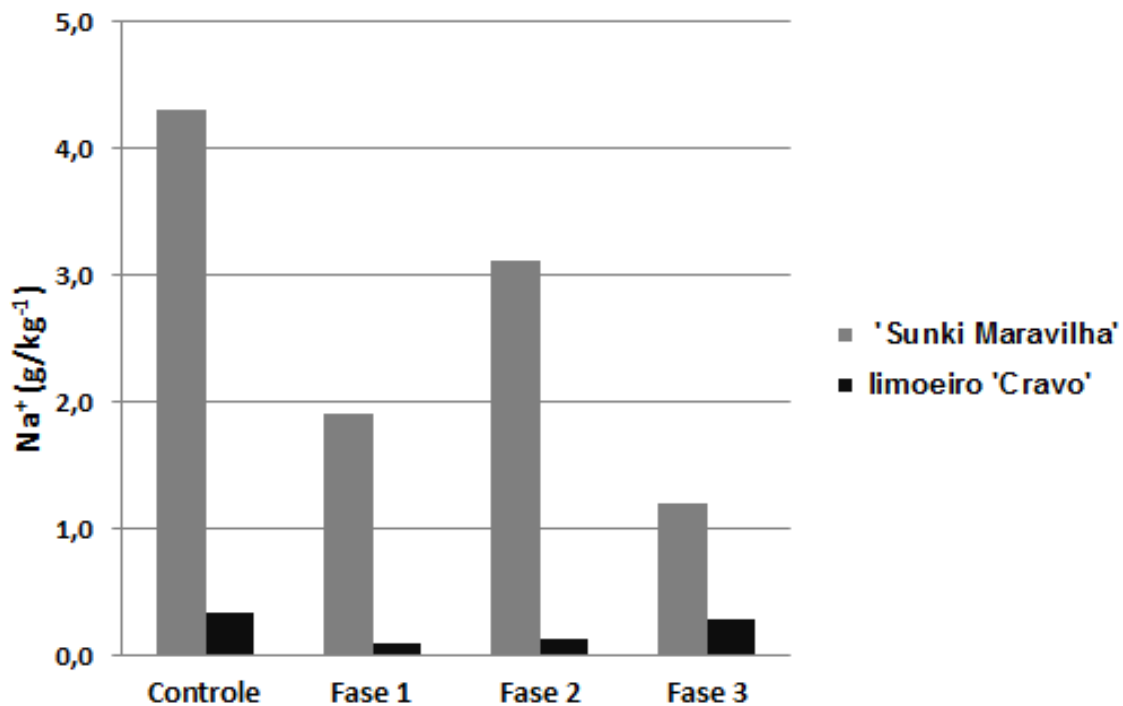


Figura 13: Teor de sódio (Na^+) nas folhas em plantas Controle e sob deficiência hídrica da tangerineira 'Sunki Maravilha' e do limoeiro 'Cravo' durante o período de desidratação do solo.

4.9 CARACTERIZAÇÃO DAS NCED1, 2, 3, 4 e 5.

A relação de similaridade entre as NCEDs de *Citrus* e de outras espécies (Tabela 1) foram investigadas mediante a comparação das sequências de nucleotídeos e o resultado pode ser verificado pelo dendrograma de similaridade gerado (Figura 14).

Tabela 2: Genes *NCEDs* usados na construção do dendrograma de similaridade e números de acesso no GenBank. As duas letras iniciais no nome do gene correspondem a espécie. At: *Arabidopsis thaliana*; Cc: *Citrus. clementina*; Cs: *C. sinensis*; Cu: *C. unshiu*; Le: *Lycopersicon esculentum*; St: *Solanum tuberosum*.

Nomes	Números de acesso no GenBank	Nomes	Números de acesso no GenBank
CuNCED1	AB219164.1	CcNCED3	DQ309332.1
CsNCED1	AB219165.1	CsNCED3	AB219177.1
AtNCED1	NM_116217.2	AtNCED3	NM_112304.2
CuNCED2	AB219169.1	LeNCED3	GQ222384.1
CiNCED2	AB219172.1	CcNCED4	DQ309330.1
CsNCED2	DQ028472.1	AtNCED4	NM_118036.2
AtNCED2	NM_117945.2	CcNCED5	DQ309329.1
StNCED2	AY662343.1	AtNCED5	NM_102749.2

Os resultados indicam que as *NCED*'s são agrupadas em ramos de acordo com os tipos já caracterizados. Porém, foi identificada uma maior proximidade da *NCED5* com a *NCED2* (Figura 14), confirmada pela alta identidade entre as duas sequências (Tabela 3). Enquanto *NCED2* e *NCED5* apresentam 99% de identidade entre suas sequências, de modo geral, a identidade média entre as demais *NCED*'s está entre 52 e 73%.

Outras análises moleculares foram realizadas com as sequências das *NCED*'s de *C. unshiu* e *C. clementina*. *NCED1* apresenta uma sequência codante de 1475 pb, codificando para uma proteína deduzida de 492 aminoácidos, 55,6 KDa e PI de 5,92. A sequência codante de *NCED2* possui 1712 pb, codificando para uma proteína deduzida de 571 aminoácidos, com 63,8 KDa e PI de 6,40. Já a proteína deduzida de *NCED3* possui 606 aminoácidos, com peso molecular de 67,0 KDa e PI de 6,37, e a sequência codante possui 1821 pb..*NCED4* apresenta uma sequência codante de 1812 pb, codificando para uma proteína deduzida de 603 aminoácidos, com peso molecular de 66,87 KDa e PI de 6,87. Finalmente, *NCED5* apresenta uma sequência codante de 1830 pb, codificando para uma proteína deduzida de 609 aminoácidos, com peso molecular de 67,8 KDa e PI de 6,30.

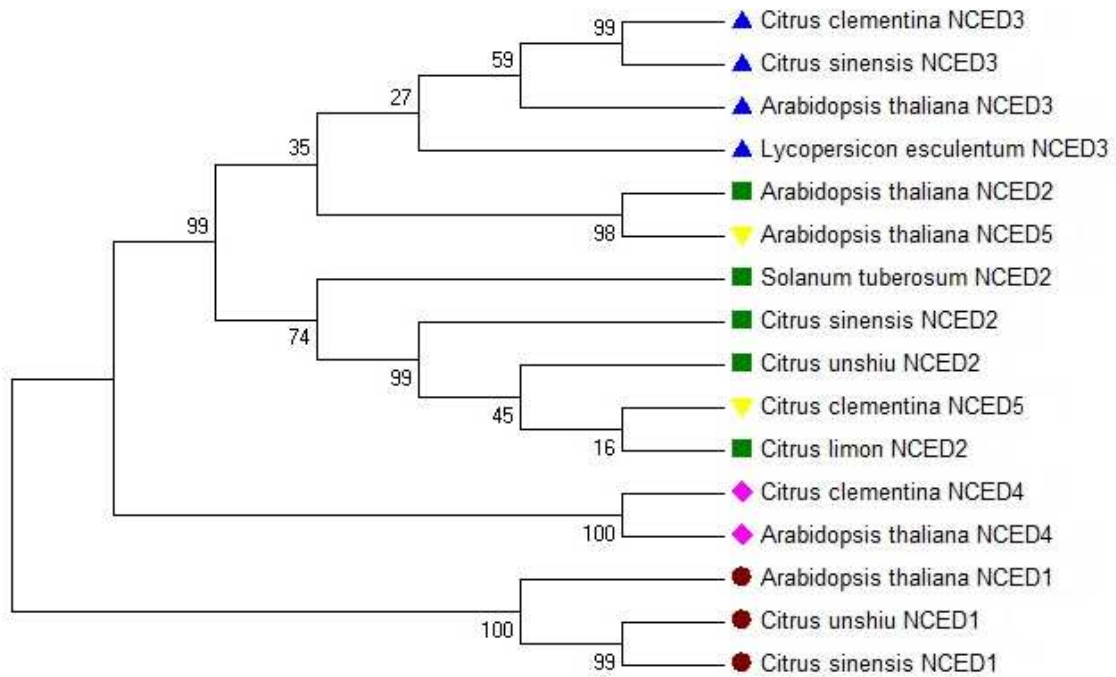


Figura 14: Dendrograma de similaridade dos genes NCED. O dendrograma de similaridade foi construído usando o método de “Neighbor-Joining”, com “bootstrap” de 1000 replicações (valores de % estão descritos nos nós). As análises evolucionárias foram conduzidas usando o programa MEGA4.

Tabela 3: Análises moleculares das seqüências de NCEDs usadas. Entre parênteses são indicados os números de acesso no GenBank.

Característica Molecular	NCED1 (AB219164)	NCED2 (AB219169)	NCED3 (DQ309332)	NCED4(DQ309330)	NCED5(DQ309329)
Comprimento total da sequência codificante (pb)	1475	1712	1821	1812	1830
Numero de aminoácidos	492	571	606	603	609
Peso Molecular (KDa)	55,6	63,8	67,0	66,5	67,8
Ponto isoelétrico (PI)	5.92	6.40	6.37	6.87	6.30
Porcentagem de identidade (%)	57 NCED2(AB219169) 55 NCED3(DQ309332) 58 NCED4(DQ309330) 57 NCED5(DQ309329)	72 NCED3(DQ309332) 53 NCED4(DQ309330) 99 NCED5(DQ309329)	55 NCED4(DQ309330) 73 NCED5(DQ309329)	52 NCED5(DQ309329)	

4.10 ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO DOS GENES *NCEDs* E *OST1* DE LIMOEIRO 'CRAVO' E A TANGERINEIRA 'SUNKI MARAVILHA'

O padrão de expressão dos genes *NCEDs* foi comparado entre si e entre os cultivares, nas plantas de limoeiro 'Cravo' e tangerineira 'Sunki Maravilha', controle e submetidas à deficiência hídrica.

Observa-se que as plantas do limoeiro 'Cravo' apresentaram, na fase 3, maior expressão dos genes *NCED5* nas folhas (Figura 15A) e dos genes *NCED2*, *NCED3*, *NCED4* na raiz (Figura 15B). O gene *NCED1* não foi expresso ou teve sua expressão reprimida em todas as condições de estresse, quando comparados às plantas controle. É importante ressaltar que houve aumento da expressão do gene *OST1*, em folhas de plantas de limoeiro 'Cravo' submetidas à deficiência hídrica. Na fase 3, a expressão de *OST1* foi semelhante à expressão das plantas controle. Já em raízes, a expressão do gene *OST1* em plantas submetidas à deficiência hídrica foi baixa, quando comparadas as plantas controle, superando essa relação apenas em condições extremas de restrição de água.

Nas análises de abundância de transcritos nas plantas da tangerineira 'Sunki Maravilha' foram evidenciados que, com a umidade do solo de 0,15-0,14 m³m⁻³, não ocorreu expressão de gene nas folhas (Figura 16A), enquanto que na raiz, os genes mais expressos foram *NCED2*, *NCED4* e *NCED5*. Em relação à expressão dos genes nas fases 1 e 2, foram reprimidas em todos os tecidos de ambos cultivares.

Para o *OST1* em folhas, verifica-se que, em relação às plantas controle, houve repressão nas fase 1 e 2, e na fase 3 a expressão do gene *OST1* foi pouco superior ao controle. Em raiz, o padrão de expressão do gene *OST1* foi bem semelhante ao encontrado nas folhas. Pode-se verificar ainda que o nível de expressão dos genes *NCED's* e *OST1* foi relativamente menor nas folhas do que nas raízes, de ambos os genótipos estudados.

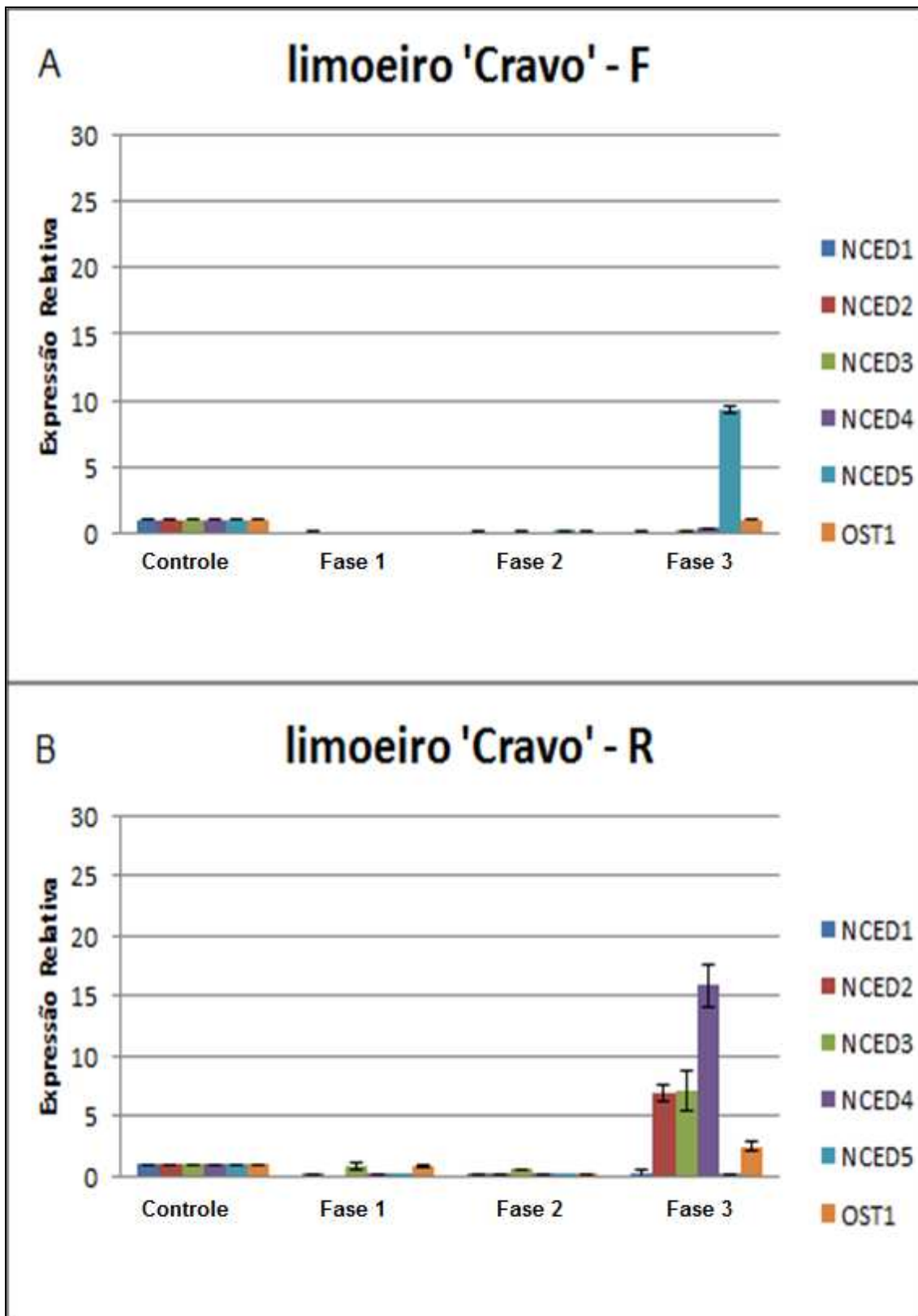


Figura 15 A e B: Expressão relativa em folhas (F) e expressão relativa em raiz (R), dos genes que codificam para as enzimas 9-cis-epoxicarotenoide deoxigenase (*NCED1*, *NCED2*, *NCED3*, *NCED4* E *NCED5*) e Open Stomatal (*OST1*) em plantas do limoeiro 'Cravo' controle e sob deficiência hídrica a partir de diferentes condições de umidade do solo. A expressão do gene da β -actina foi usada como normalizador. Os dados representam a média \pm SE (erro padrão) de três réplicas experimentais.

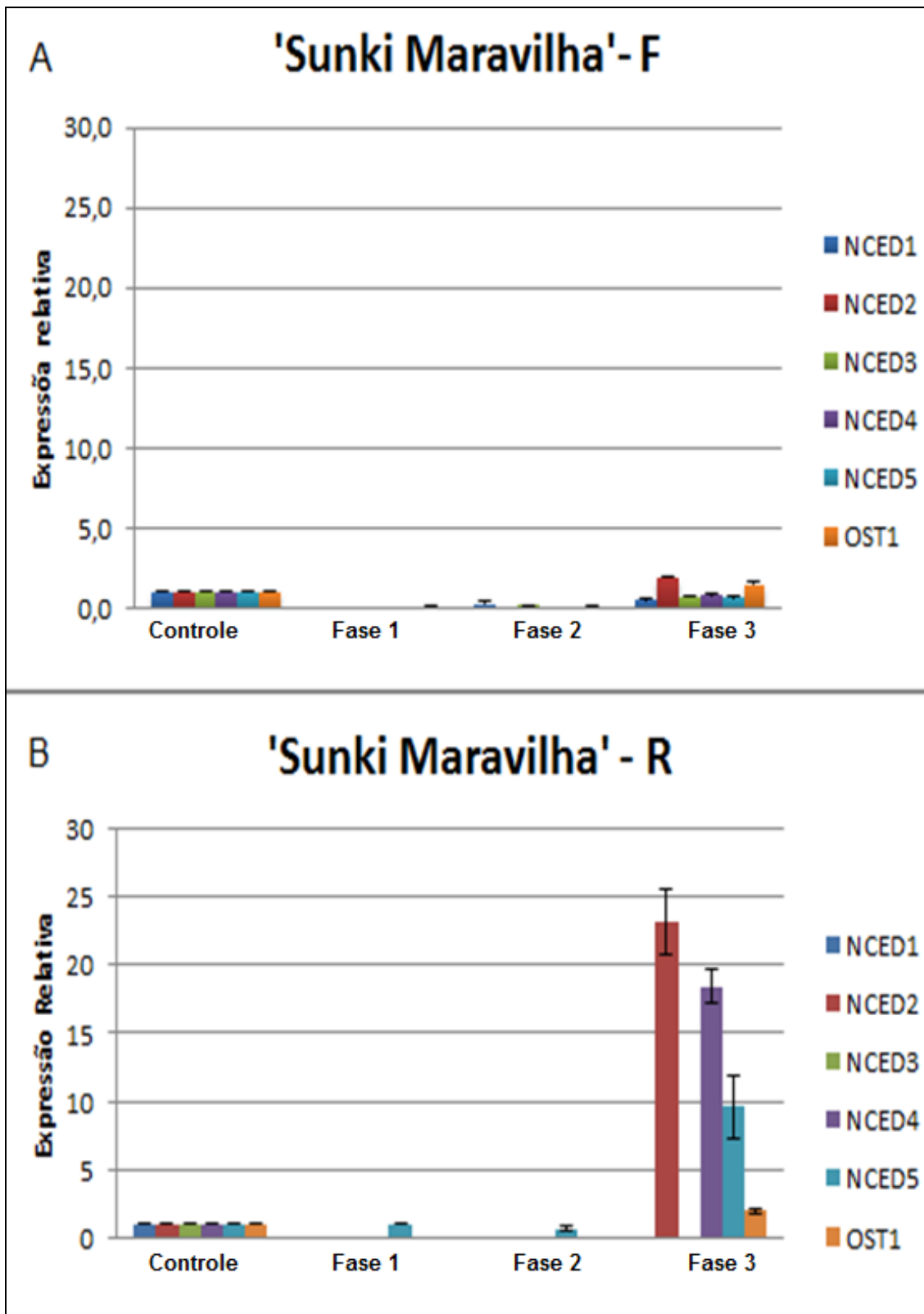


Figura 16 A e B: Expressão relativa em folhas (F) e expressão relativa em raiz (R), dos genes que codificam para as enzimas 9-cis-epoxicarotenoide deoxigenase (*NCED1*, *NCED2*, *NCED3*, *NCED4* E *NCED5*) e Open Stomatal (*OST1*) em plantas de tangerineira 'Sunki Maravilha', controle e sob deficiência hídrica em diferentes condições de umidade do solo. A expressão do gene da β -actina foi usada como normalizador. Os dados representam a média \pm SE (erro padrão) de três réplicas experimentais.

5 DISCUSSÃO

As plantas apresentam diferentes mecanismos de respostas aos diferentes tipos de estresses abióticos, e estes sinais interagem de modo que as combinações desses modificam a expressão gênica, o metabolismo, o crescimento e desenvolvimento e promovem uma melhor adaptação ao estresse (Zhu *et al.*, 2002). As primeiras alterações morfofisiológicas apresentadas pelas plantas, quando imposta a deficiência hídrica são redução da transpiração, fechamento estomático, ajustamento osmótico, entre outros (Taiz e Zeager, 2009).

De acordo com Ray e Sinclair, (1998) onde eles avaliaram a FTSW e a NTR em *Zea mays* e *Phaseolos vulgaris* em diferentes tamanhos de vasos e sob deficiência hídrica, foi observado que a redução de umidade no solo e avaliação de NTR e de FTSW foram pouco influenciadas pelo tamanho dos vasos, sendo este protocolo bastante adequado para comparar as respostas dos genótipos à deficiência hídrica do solo.

Quando comparado o teor de água no solo, entre as plantas de limoeiro 'Cravo' e a tangerineira 'Sunki Maravilha', submetidas ou não à deficiência hídrica, a variação entre os tratamentos torna-se notável (Figura 5). A fração transpirável de água no solo (FTSW) também variou entre os tratamentos e entre as espécies avaliadas. No conceito de FTSW, assume-se que o teor de água no solo utilizado pela planta para a transpiração varia entre o teor de água no solo na capacidade de campo, quando a transpiração é máxima, e o conteúdo de água no solo quando a transpiração da planta é igual a 10% da transpiração máxima. Este conceito parece ser o que mais se aproxima da realidade como indicador da quantidade real de água no solo que pode ser extraída pelas plantas para a transpiração (Santos e Carlesso, 1998).

A redução de FTSW entre os momentos iniciais e finais da deficiência hídrica é comum à maioria das culturas, onde mudanças fisiológicas nas plantas ocorrem para responder aos primeiros sinais da deficiência hídrica com a FTSW entre 0,2-0,5 (Sadras e Milroy, 1996). A redução do teor de água no solo promove diminuição na transpiração das plantas (Morillon e Chrispeels, 2001).

Os valores de NTR e FTSW das plantas dos genótipos avaliados sob deficiência hídrica estão provavelmente associados à diferença no aumento da área foliar e na resistência estomática. Durante todo o experimento, o monitoramento da área foliar dos genótipos constatou que as plantas de limoeiro 'Cravo' apresentavam crescimento em ambos os tratamentos, enquanto as plantas da tangerineira 'Sunki Maravilha', sob deficiência hídrica, não apresentaram crescimento (Figura 7). Esse comportamento foi observado em citros como sendo fator determinante na avaliação da taxa de transpiração (Rodríguez-Gamir *et al.*, 2010). Moya *et al.* (1999, 2003) demonstraram que em plantas de citros, em condições de deficiência hídrica, quando há remoção das folhas, a taxa de transpiração aumentou em proporção a quantidade de folhas removidas, não alterando a transpiração da planta por inteiro. Sendo assim, alteração na velocidade de absorção de água do solo pelas raízes das plantas está associada com a estreita relação entre a área foliar e a taxa de transpiração (Jorgensen *et al.*, 2011).

O fechamento estomático é uma das respostas iniciais das plantas à deficiência no solo, permitindo retenção da água para uma sobrevivência prolongada em condições de estresse hídrico (Farquhar e Sharkey, 1982). Os dados obtidos na avaliação de *gs* caracterizam a deficiência hídrica na fase 3 (Figura 8) como sendo a fase de maior carência de energia disponível. Rodríguez-Gamir *et al.* (2010), avaliaram porta-enxertos de citros (*Cleopata mandarin* e *Porcirus trifoliata*) e estes demonstraram que quando submetidos a deficiência hídrica apresentaram um sistema radicular bastante ativo em resposta a secagem do solo, devido aos sinais enviados das raízes para as folhas, induzindo o fechamento estomáticos e a redução da perda da água por transpiração. Tan *et al.* (2003) avaliaram plantas de *Arabidopsis* sob deficiência hídrica e confirmaram que uma das primeiras respostas das plantas a esse tipo de estresse é a inibição do crescimento pela redução da transpiração, causada por maior demanda de expressão de genes da família NCEs, influenciada principalmente por reduzidos potenciais hídricos.

O perfil apresentado pela expressão gênica explica porque NTR e FTSW apresentaram uma redução significativa na fase 3 do limoeiro 'Cravo' (FTSW de 0,19) do que na tangerineira 'Sunki Maravilha' (FTSW de 0,33). Mesmo nessas condições de deficiência hídrica, o limoeiro 'Cravo' apresentou

com características mais tolerantes, concordando com os dados da literatura citrícola onde, o limoeiro 'Cravo' já foi reportado como o porta-enxerto de maior tolerância à deficiência hídrica (Pompeu Junior, 2003).

Trabalhos recentes mostraram que os grandes influenciadores na redução da transpiração são os níveis hormonais, em especial o nível do fitormônio ABA, que tem como atividade principal regular a abertura e fechamento dos estômatos (Zhang *et al.*, 2007; Rodríguez-Gamir *et al.*, 2010), e isso ocorre por uma múltipla cascata de eventos bioquímicos nas células (Acharya e Asmann, 2009). Vários estudos também demonstram que os mecanismos de fechamento estomático pelo ABA é dado, entre outros fatores, por modificações nas condições iônicas e no pH das células (Chérel, 2004; Guerfel *et al.*, 2009). Isso sugere que, quando submetidas à deficiência hídrica, as plantas ativam respostas moleculares que atuam nos níveis de ABA, gerando a despolarização da membrana, promovendo então o fechamento dos estômatos e uma redução nos potenciais hídricos e osmóticos das plantas.

O potencial hídrico foliar é uma grandeza termodinâmica que determina a quantidade de água celular disponível no tecido para a realização de trabalho químico (Kramer e Boyer, 1995) e, quando determinado no período antemanhã, fornece uma medida indireta do potencial hídrico do solo no qual as plantas se encontram. Isto porque, neste período, as perdas de água por evapotranspiração são nulas, ou desprezíveis, devido à ausência de luz e a alta umidade (próximo a saturação) e, nessa situação, um equilíbrio no sistema solo:planta:atmosfera é alcançado (Taiz e Zeager, 2009). Quanto mais negativo for o valor de potencial hídrico, menor é a quantidade de água disponível para realização de trabalho químico, estimulando na planta uma série de respostas fisiológicas, moleculares e morfológicas que permitam uma maior economia hídrica. Isto ocorre no sentido de evitar ou atenuar os sintomas negativos da seca que culminam, em última análise, na paralisação do crescimento e diminuição da produção (Guerfel *et al.*, 2009).

A redução no potencial hídrico foliar, observada durante a condição de deficiência hídrica, nas plantas de limoeiro 'Cravo' e da tangerineira 'Sunki Maravilha' (Figura 10) pode ser considerado com um ajuste para uma melhor tolerância dos cultivares a condição de deficiência hídrica. Essa redução do potencial hídrico foliar coincide com os valores de resistência estomática, e os

dados de expressão dos genes, indicando importante correlação nos processos fisiológicos e moleculares das plantas quando submetidas a extremos estresses.

A deficiência hídrica acarretou alterações no potencial hídrico foliar em ambos genótipos e isso serve de subsídio para inferimos a respeito das alterações nas plantas sob deficiência hídrica comparando com a controle de cada genótipo. Apesar de não ter havido diferenças estatísticas ($p < 0,05$) nos dados de potencial osmóticos foliar (Figura 11), é importante considerar que, os valores encontrados na fase 3 para os cultivares avaliados foram, -1,86 MPa pra tangerineira 'Sunki Maravilha' e -1,64 MPa para o limoeiro 'Cravo'. Em estudos de deficiência hídrica com lima doce (*C. limettioides* Tanaka) foram constatado valores de potencial osmótico para as plantas estressadas de -2,4 MPa, valores consideravelmente relevantes, quando comparado com os valores normalmente encontrados para esta espécie (Kriedmann e Barrs, 1981; Bartels e Sunkar, 2005). Outra característica importante é o fato de que folhas jovens têm apresentado em alguns trabalhos, com menores indícios de mudanças no potencial osmótico. De acordo com Pérez-Pérez *et al.* (2009), ao comparar o potencial osmótico em folhas jovens e maduras em plantas submetidas a deficiência hídrica e controle, observou-se que nas folhas jovens o potencial osmótico foi menor, enquanto que nas folhas maduras sob deficiência hídrica o potencial osmótico foi maior que no controle.

Quando as plantas são submetidas a estresse hídrico, há tendência de alteração do seu metabolismo, e o ajuste osmótico é um dos mais frequentes mecanismos (Medina *et al.*, 2005). No ajustamento osmótico, o aumento na concentração de solutos ocorre independente das alterações no volume das células, resultantes da perda de água. Normalmente, no ajustamento osmótico são usados íons inorgânicos como o K^+ (Liu e Luan, 1998), ácidos orgânicos, açúcares, aminoácidos e outros (Chaves, 1991). Segundo Shabala (2003), o K^+ é o cátion inorgânico mais exigido pelas plantas. O seu requerimento para o ótimo crescimento das plantas está aproximadamente entre 2% a 5% na matéria seca, variando em função da espécie e do órgão analisado. Cerca de meia centena de enzimas são ativadas pelo K^+ , algumas delas especificamente. Daí sua participação em diversas fases do metabolismo como nas reações de fosforilação, síntese de carboidratos, respiração e síntese de

proteínas. Além disso, o nível de K^+ nas células-guarda regula a abertura e o fechamento dos estômatos. O transporte dos carboidratos, produzido na folha para outros órgãos, não se realiza de modo adequado quando a planta é carente em K^+ (Ferri, 1985). Observou-se na fase 2 de deficiência hídrica, que a tangerineira 'Sunki Maravilha' apresentou uma redução dos teores de K^+ seguido por um leve aumento na fase 3 da deficiência, o que caracteriza uma tentativa de ajuste iônico direcionado para um ajustamento osmótico (Figura 12). Nas plantas de limoeiro 'Cravo', o teor de K^+ aparece em crescente aumento nas fases 1 e 2 das plantas sob deficiência hídrica, com valores maiores do que nas plantas controle (Figura 12).

Apesar de os teores de K^+ encontrados na fase 3 da deficiência hídrica, serem menores no limoeiro 'Cravo', essa redução pode ser devido ao fato de que as folhas utilizadas na análise tenha sido folhas mais jovens. Assim como foi observado por Alves e Setter (2004), folhas maduras de mandioca (*Manihot esculenta*), sob deficiência hídrica, apresentaram maiores teores de K^+ quando submetidas a condições severas de estresse, e as diferenças entre a idade da folha foi fator determinante na quantificação do teor de K^+ . Pérez-Pérez *et al.* (2009) também relatou em seu trabalho, perfil diferenciado nos teores de K^+ quando comparou folhas maduras com folhas jovens de citros submetidas a deficiência hídrica, e observou que as folhas maduras apresentaram com teores maiores de K^+ . Sabe-se também que, frequentemente o K^+ é translocado das folhas velhas, em senescência, para as mais jovens e essa mudança é facilitada pela alta permeabilidade das membranas e pelo fato de que cerca de 70% do total de K^+ existente na planta permanece na forma iônica. A razão pela qual o K^+ é preferencialmente translocado para os tecidos mais jovens não é ainda completamente conhecida, ao contrário dos relacionamentos com a síntese de proteínas, taxa de crescimento, suprimento de citocina (Mäser *et al.*, 2002; Shabala, 2003) e na ativação do fechamento estomático (Mäser *et al.*, 2002). O K^+ é também conhecido por ser bastante solúvel e tem papel chave no início da osmoregulação nas células-guarda e conseqüentemente na turgescência (Shabala e Cuin, 2007). Sabendo-se dessa estreita relação do K^+ na produção de proteínas fica evidente que um dos fatores que influenciaram na expressão dos genes, na condição de deficiência

hídrica com 0,15-0,14 m³m⁻³ de umidade no solo, foi caracterizada pelas alterações nos teores de K⁺, que ocorreram nos genótipos avaliados.

Na avaliação dos teores de Na⁺ (Figura 13), os baixos valores observados nas plantas justifica-se pelo alto teor de K⁺, apesar do sódio competir com o K⁺ nos processos fisiológicos (Korndörfer, 2006). Fica evidente que os genótipos compensam seus valores de K⁺ equilibrando-os com os de Na⁺. Em um estudo realizado com *Jatropha curcas* observa-se que, sob condições de deficiência hídrica, os íons inorgânicos envolvidos no ajustamento osmótico são, K⁺ e Na⁺ e que, mesmo ocorrendo em baixas concentrações o Na⁺ mostrou expressivo no ajustamento osmótico (Silva *et al.*, 2010). O Na⁺, quando requerido pelas plantas, é absorvido na forma iônica. Sua principal função na nutrição mineral das plantas é substituir o K⁺ em determinadas funções fisiológicas (Korndörfer, 2006) e em altas concentrações pode inativar enzimas chaves (Mäser, *et al.*, 2002). Na maioria das espécies, porém, altas concentrações de Na⁺ podem acarretar em efeitos maléficos ao desenvolvimento e a produção das plantas, e por isso é desejável manter um equilíbrio entre os íons de K⁺ e de Na⁺, principalmente quando as plantas estão sob estresse hídrico. Os canais de Na⁺ e K⁺ nas membranas celulares promovem modificações no interior da célula promovendo alterações no ajustamento osmótico, sendo está uma das formas que as plantas tendem a responder ao estresse hídrico (Blumwald *et al.*, 2000). Partindo dos altos teores de Na⁺ encontrados nas plantas da tangerineira 'Sunki Maravilha' é possível inferir que, essa alta concentração interferiu na expressão dos genes nas folhas desse cultivar.

O ABA desempenha papel crucial nas respostas iniciais de aclimação das plantas aos diferentes estresses ambientais e a vários processos fisiológicos (Tan *et al.*, 1997; Seo e Koshiba., 2002 Rodrigo *et al.*, 2006). Essas respostas iniciais podem operar na regulação da biossíntese do ABA nos diferentes tecidos das plantas. O aumento nos níveis endógenos de ABA indica a necessidade de ativação da biossíntese de ABA para a indução e manutenção do fechamento estomático durante o estresse hídrico (Davies e Zhang, 1991; Sauter *et al.*, 2001; Schachtman e Goodger, 2008). Esforços tem sido feitos para a clonagem de genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese do ABA, além de estudos genéticos e bioquímicos demonstrando que a reação de clivagem das cis-epoxicarotenóides em xantofila é catalisada

pelos NCEDs, etapa crucial na regulação da biossíntese do ABA em plantas (Nambara e Marion-Poll, 2005; Rodrigo *et al.*, 2006). As enzimas dioxigenases dos carotenóides (CCD's), das quais fazem parte a família das NCEDs, pertencem a um grupo que produzem clivagens específicas em determinadas moléculas com formação de ligação dupla (Tan *et al.*, 2003). Diversos trabalhos têm focado na regulação dos genes NCEDs em resposta a deficiência hídrica. Esses estudos indicam que a reação de clivagem das NCEDs é uma etapa chave na regulação e na via de controle da síntese do ABA quando induzido pelo estresse hídrico (Quin e Zeevaart, 1999, Tan *et al.*, 2003).

No presente trabalho, avaliou-se a expressão comparativa de genes da família NCED em folhas e raízes de porta-enxerto de citros, limoeiro 'Cravo' e a tangerineira 'Sunki Maravilha', sob deficiência hídrica (Figura 15). Durante os experimentos, o gene *NCED1* apresentou-se reprimido ou não se constatava expressão, confirmando o que foi reportado por Iuchi *et al.* (2001), ao analisar diferentes genes da família NCED, estes autores observaram que em plantas de *A. thaliana* sob deficiência hídrica, a expressão do gene *NCED1* dependia da variedade avaliada e do nível do estresse.

Nas folhas dos genótipos estudados ocorreram a maior expressão do gene *NCED5* para o limoeiro 'Cravo' (Figura 15A), na fase 3 das plantas sob deficiência hídrica. É importante salientar que, em relação a todos os parâmetros fisiológicos avaliados nesse trabalho, a fase 3 das plantas sob deficiência hídrica apresentou-se como sendo o momento com respostas mais expressivas. Nesse caso, associado aos dados moleculares, foi o momento em que as plantas ativam seus mecanismos de defesa para uma maior resistência a deficiência hídrica. Portanto o gene *NCED5* em folhas do limoeiro 'Cravo' pode ser considerado como o gene responsável pelos mecanismos de tolerância a seca e pelos primeiros sinais para a biossíntese de ABA. A indução dos genes *NCEDs* decorrente do estresse hídrico também já foi relatada em *Zea mays*, *Lycopersicon esculentum*, *Arabidopsis thaliana* e *Phaseolus vulgaris* (Burbridge *et al.*, 1997; Tan *et al.*, 1997; Neill *et al.*, 1998; Qin e Zeevaart *et al.*, 1999; Iuchi *et al.*, 2000; Thompson *et al.*, 2000a; Bartels, 2005).

Na avaliação da expressão dos genes NCEDs, nas raízes dos genótipos avaliados, foi constatado que em plantas de limoeiro 'Cravo', houve maior expressão gênica de *NCED2*, *NCED3* e *NCED4* (Figura 15B) e para a

tangerineira 'Sunki' os genes mais expressos foram *NCED2*, *NCED4* e *NCED5* (Figura 16B). O perfil da expressão dos genes NCEDs nas raízes, confirma a hipótese de que a percepção e a indução dos sinais para defesa das plantas contra a deficiência hídrica, se dá a partir das raízes. Diversos trabalhos têm demonstrado que, em condições experimentais, onde o sistema radicular foi exposto à deficiência hídrica, sem alterar o estado hídrico nas folhas, sinais produzidos nas raízes induziram o fechamento estomático nas folhas (Neales *et al.*, 1989; Khalil e Grace, 1993; Stoll *et al.* 2000). O fechamento estomático foi associado com o aumento nos níveis de ABA no xilema, sugerindo que é na raiz a origem da sinalização para a parte aérea, regulando, assim, a abertura dos estômatos em resposta a deficiência hídrica (Ikegami *et al.*, 2009). Outra característica importante é que o gene *NCED3* foi expresso somente no limoeiro 'Cravo' e essa característica pode estar associada ao mecanismo de tolerância à seca e à síntese de ABA nesse cultivar. Já que, no trabalho de Agustí *et al.* (2007) foi observado que nas raízes de plantas de citros, o gene *NCED3* apresentou maiores índices de expressão em relação a deficiência hídrica e as maiores concentrações de ABA.

Em relação a alta identidade de sequência nucleotídica encontrada entre os genes *NCED2* e *NCED5* em citros, Tan *et al.* (2003) relataram que, em *Arabidopsis*, o gene *AtNCED5* apresenta alta homologia com outras NCED's, sugerindo que possam codificar enzimas com atividades semelhantes. Além disso, segundo estes autores, enquanto o gene *NCED2* foi direcionada para o estroma, o *NCED5* foi particionado exclusivamente na fração ligada aos tilacóides, sugerindo também diferentes locais de atuação destas enzimas.

A transdução de sinais do ABA envolve muitos genes e segundos mensageiros. As espécies reativas de oxigênio (ERO) foram descritas como segundos mensageiros essenciais na sinalização de ABA, pois o ABA induz o fechamento estomático envolvendo a produção de ERRO, que ativam o efluxo de K^+ e ânions, via membrana plasmática, aumentando principalmente o Ca^{2+} no citosol (Belin *et al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 2006). A proteína quinase OST1 é um elemento essencial na via de sinalização do ABA mediando a regulação estomática em resposta à seca. Estudos farmacológicos têm mostrado que o papel da enzima OST1 nas células-guarda consiste em atuar como regulador positivo por meio da fosforilação, promovendo o fechamento estomático,

induzido pelo ABA (Schroeder *et al.*, 2001; Mustilli *et al.*, 2002). Mustilli *et al.* (2002) observaram que, durante a deficiência hídrica, o OST1 atua no intervalo entre a percepção do ABA e a produção de ERO, pois o gene *OST1* está especificamente envolvido na sinalização do ABA (Geiger *et al.*, 2009). No presente trabalho, a maior expressão do gene *OST1* foi determinada nas raízes de ambos cultivares avaliados na fase 3. Ainda não se confirma a função do OST1 na raiz (Yoshida *et al.*, 2006), mas sabe-se que a translocação do ABA se dá especialmente via raiz parte aérea e que ocorre principalmente via xilema (Jiang e Hartung, 2008; Schachtman e Goodger, 2008). Mustilli *et al.* (2002), trabalhando com plantas de *Arabidopsis* transformadas e submetidas à deficiência hídrica, detectaram no sistema vascular das raízes, a presença do gene *OST1* sendo expresso quando as plantas foram submetidas à condição de deficiência hídrica.

6 CONCLUSÕES

Altos valores de sódio em plantas de tangerineira 'Sunki Maravilha' (3,11 g/Kg) comparado com os valores de sódio do limoeiro 'Cravo' (0,33 g/Kg) pode ter inativado enzimas chaves na sinalização do ABA.

De acordo com os dados de expressão é possível inferir que o limoeiro 'Cravo' apresentou maior expressão do gene NCED5 na folha e o NCED3 na raiz comparado com a tangerineira 'Sunki Maravilha', e estes podem ser os responsáveis pelo aumento na síntese do ABA, apresentando-se então como fortes candidatos ao controle do mecanismo de tolerância à seca pelo limoeiro 'Cravo'.

7 REFERÊNCIAS

ABECITRUS: disponível em: <http://www.abecitrus.com.br>. Acesso em 15 de outubro de 2010.

AGUSTÍ, J.; ZAPATER, M.; IGLESIAS, D.J.; CERCOS, M.; TADEO, F.R.; TALON, M. Differential expression of putative 9-cisepoxycarotenoid dioxygenases and abscisic acid accumulation in water-stressed vegetative and reproductive tissues of citrus. *Plant Science*. Vol.172, pp. 85-94. 2007.

ALVES, A.A.C.; SETTER, T.L. Abscisic acid accumulation and osmotic adjustment in cassava under water deficit. *Environmental and Experimental Botany*. Vol. 51. pp. 259-271. 2004.

BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews Plant Sciences*. Vol.24, pp.23–58. 2005.

BASSENE, J.B.; FROELICHER, Y.; DHUIQUE-MAYER, C.; MOUHAYA, W.; FERRER, R.M.; ANCILLO, G.; MORILLON, R, NAVARRO, L.; OLITRAULT, P. Non-additive phenotypic and transcriptomic inheritance in a citrus allotetraploid somatic hybrid between *C. reticulata* and *c. limon*.the case of pulp carotenoid biosynthesis pathway. *Plant Cell Reports*. Vol. 28, nº 11, pp. 1689-1697. 2009.

BELIN, C.; FRANCO, P-O.; BOURBOUSSE, C.; CHAIGNEPAIN, S.; SCHMITTER, J-M.; VAVASSEUR, A.; GIRAUDAT, J.; BARBIER-BRYGOO, H.; THOMINE, S. Identification of features regulating OST1 kinase activity and OST1 function in guard cells. *Plant Physiology*. Vol. 141, pp. 1316-1327. 2006.

BLATT, M.R. Ca²⁺ signaling and control of guard-cell volume in stomatal movements. *Current Opinion Plant Biology*. Vol.3, pp. 196–204. 2000.

BLUMWALD, E.; AHARON, G.S.; APSE, M.P. Sodium transport in plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 1465, pp. 140-151. 2000

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

BURBIDGE, A.; GRIEVER, T.M.; JACKSON, A.; THOMPSON, A.; MCCARTY, D.R.; TAYLOR, I.B. Characterization of the ABA-deficient tomato mutant notanili and its relationship with maize Vp14. *The Plant Journal*. Vol. 14, No. 4, pp. 427-431, 1999.

CAO, Y.J.; WEI, Q.; LIAO, Y.; SONG, H.L.; LI, X.; XIANG, C.B.; KUAI, B.K.. Ectopic overexpression of AtHDG11 in tall fescue resulted in enhanced tolerance to drought and salt stress. *Plant Cell Report*. Vol. 28, pp. 578-588. 2009.

CASER D.V. Previsões e estimativas das safras agrícolas do estado de São Paulo, ano agrícola 2010/11, intensão de plantio, levantamento final, ano agrícola 2009/10, setembro de 2010. *Informações Econômicas. - São Paulo*. Nº 11 : Vol. 40. 2010.

CERQUEIRA, E. C.; CASTRO NETO, M. T.; PEIXOTO, C. P.; SOARES FILHO, W. DOS S.; LEDO, C. A. S., OLIVEIRA, J. G. Respostas de porta-enxertos de citros ao déficit hídrico. *Revista Brasileira de Fruticultura*. Vol. 26, pp. 515-519, 2004.

CHAVES, M.M.; MAROCO, J., PEREIRA, J.S. Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*. Vol.30, pp. 239-264. 2003.

CHAVES, M.M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*. Vol. 103, pp. 551-560. 2009.

CHERNYS, J.T.; ZEEVAART, J.A.D. Characterization of the 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado. *Plant Physiology*. Vol. 124, pp. 343–353, 2000

CHINNUSAMY, V.; SCHUMAKER, K.; ZHU, J-K. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 55, n. 395, pp. 225-236, 2004.

COLETTI, C. Caracterização da irrigação de uma cultura citrícola com a utilização do TDR. 2000, 100f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola)- Faculdade de Engenharia Agrícola - Universidade Estadual de Campinas - São Paulo, Campinas, 2000.

COMINELLI, E.; GALBIATI, M.; TONELLI, C. Integration of water stress response. ***Plant Signaling e Behavior***. Vol. 3. Nº 8, pp. 556-557. 2008.

DaMATTA, F.M.; CHAVES, A.R.M.; PINHEIRO, H.A.; DUCATTI, C.; LOUREIRO, M.E. Drought tolerance of two field-grown clones of *Coffea canephora*. ***Plant Science***. Vol. 164, pp. 111-117. 2003.

DELGADO-ROJAS, J.S. *Avaliação do uso do fluxo de seiva e da variação do diâmetro do caule e de ramos na determinação das condições hídricas de citros, como base para o manejo de irrigação*. 2003. 110 f. Tese (Doutorado em Irrigação e Drenagem) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

FARQUHAR, G.D.; SHARKEY, T.D. Stomatal conductance and photosynthesis. ***Annual Review of Plant Physiology***. Vol.33, pp.317-345. 1982.

FERRI, M. G. ***Fisiologia vegetal 1***. 2.ed. São Paulo: EPU, 362 p. 1985.

FINKELSTEIN, R.R.; GAMPALA, S.L.; ROCK, C.D. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. ***The Plant Cell***. Vol. 14, pp. 815-845. 2002.

FNP CONSULTORIA e COMERCIO. Agriannual 2008: ***Anuário da Agricultura Brasileira***. São Paulo: Editora FNP, 502 p. 2008.

FUGII, H.; ZHU, J.K. Arabidopsis mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. ***PNAS***. Vol 106, pp. 8380-8385. 2009.

FU, D.; UAUY, C.; DISTELFELD, A.; BLECHL, A.; EPSTEIN, L.; CHEN, X.; SELA, H.; FAHIMA, T.; DUBCOVSKY, J. A kinase-START gene confers temperature-dependent resistance to wheat stripe rust. ***Science***. Vol. 323, pp. 1357-1360. 2009.

FUNDECITRUS. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br>. Acesso em 06 de fev. 2011.

GEIGER, D.; SCHERZER, S.; MUMM, P.; STANGE, A.; MARTEN, I.; BAUER, H.; ACHE, P.; MATSCHI, S.; LIESE, A.; AL-RASHEID, K.A.S.; ROMEIS, T.; NEDRICH, R. Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. **PNAS**. Vol. 106, nº 50, pp. 21425-21430. 2009.

GUERFEL, M.; BEIS, A.; ZOTOS, T.; BOUJNAH, D.; ZARROUK, M.; PATAKAS, A. Differences in abscisic acid concentration in roots and leaves of two Young Olive (*Olea europaea* L.) cultivars in response to water deficit. **Acta Physiologiae Plantarum**. Vol. 31, nº 4, pp. 825-831. 2009.

HAMILTON, D.A.; HILLS, A.; KÖHLER, B.; BLATT, M.R. Ca²¹ channels at the plasma membrane of stomatal guard cells are activated by hyperpolarization and abscisic acid. **PNAS**. Vol. 97, pp. 4967–4972. 2000.

HIRAYAMA, T.; SHINOZAKI, K. Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. **Trend In Plant Science**. Vol. 12 Nº. 8, pp. 343-351. 2007.

HUGOUVIEUX, V.; KWAK J.M.; SCHROEDER, J.I. An mRNA cap binding protein, ABH1, modulates early abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. **Cell**. Vol. 106, pp. 477-487. 2001.

IBGE: Disponível em: <http://www.ibge.gov.br> Acesso em 24 de janeiro de 2009.

IBGE: Disponível em: <http://www.ibge.gov.br> Acesso em 05 de dezembro de 2010.

ILJIM, W.S. Drought resistance in plants and physiological processes. **Annual Review Plant Physiology**. Vol. 3, pp. 341-363. 1957.

IKEGAMI, K.; OKAMOTO, M.; SEO, M.; KOSHIBA, T. Activation of abscisic acid biosynthesis in the leaves of *Arabidopsis thaliana* in response to water deficit. **Journal Plant Research**. Vol. 122, pp. 235-243. 2009.

IRVINE, J.; PERKS, M.P.; MAGNANI, F.; GRACE, J. The response of *Pinus sylvestris* to drought: stomatal control of transpiration and hydraulic conductance. ***Tree Physiology***. Vol. 18, pp. 393-402. 1998.

IUCHI, S.; KOBAYASHI, M.; TAJI, T.; NARAMOTO, M.; SEKI, M.; KATO, T.; TABATA, S.; KAKUBARI, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. ***The Plant Journal***. Vol. 24, pp.325-333. 2001.

JIANG, F.; HARTUNG, W. Long-distance signalling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal. ***Journal of Experimental Botany***. Vol. 59, No. 1, pp. 37–43, 2008.

JORGENSEN, S.T.; NTUNDU, W.H.; OUÉDRAOGO, M.; CHRISTIANSEN, J.L.; LIU, F. Effect of a short and severe intermittent drought on transpiration, seed yield, yield components, and harvest index in four landraces of Bambara groundnut. ***International Journal of Plant Production***. Vol. 5, nº1, pp. 25-36. 2011.

KATO, M.; MATSUMOTO, H.; IKOMA, Y.; OKUDA, H.; YANO, M. The role of carotenoid cleavage dioxygenases in the regulation of carotenoid profiles during maturation on citrus fruit. ***Journal of Experimental Botany***. Vol. 57, nº 10, pp. 2153-2164. 2006.

KERBAUY, G.B. ***Fisiologia vegetal***. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 452p. 2004.

KHALIL, A.A.M.; GRACE, J. Does xylem sap ABA control the stomatal behavior of water-stressed sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) seedlings? ***Journal Experimental Botany***. Vol. 44, pp.1127–113. 1993.

KLINGLER, P.J.; BATELLI, G.; ZHU, JK. ABA receptors: START of a new paradigm in phytohormone signaling. ***Journal of Experimental Botany***. Vol. 61, Nº 12, pp. 3199-3210. 2010.

KORNDÖRFER, G. H. Elementos Benéficos. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). Nutrição mineral de plantas. **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**. pp. 355-374. 2006.

KOHLER, B.; BLATT, M.R. Protein phosphorylation activates the guard cell Ca²⁺ channel and is a prerequisite for gating by abscisic acid. **Plant Journal**. Vol. 32, pp.185–194. 2002.

KRAMER, P.; BOYER, J.S. Water relations of plants and soils. **Academic Press**. 1-482.p. 1995.

KRIEDMANN, P.E.; BARRS, H.D. Citrus orchards. In: KOZLOWSKI, T.T. **Water deficits and plant growth**. Academic Press. Vol.6, pp. 325-418. 1981.

LIU, K.; LUAN, S. Voltage-dependent K⁺ channels as targets of osmosensing in guard cells. **The Plant Cell**. Vol.10. pp. 19957-1970. 1998.

MACROBBIE, E.A.C. ABA activates multiple Ca²⁺ fluxes in stomatal guard cells, triggering vacuolar K⁺(Rb⁺) release. **Plant Biology**. Vol. 97, pp. 12361–12368, 2000

MATTOS, JR.D.; DE NEGRI, D. J.; FIGUEIREDO, J.O. **Lima ácida Tahiti**. Campinas: Instituto Agrônomo. Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros “Sylvio Moreira”. Campinas, 2003.

MA, Y.; SZOSTKIEWICZ, I.; KORTE, A.; MOES, D.; YANG, Y.; CHRISTMANN, A.; GRILL, E. Regulators of PP2C Phosphatase Activity Function as Abscisic Acid Sensors. **Science**. Vol.324. pp. 1064-1067. 2009.

MÄSER, P.; GIERTH, M.; SCHROEDER, J.I. Molecular mechanisms of potassium and sodium uptake in plants. **Plant and Soil**. Vol 247, pp. 43-54. 2002.

MAZZUCOTELLI, E.; MASTRANGELO, A.M.; CROSATTI, C.; GUERRA, D.; STANCA, A.M.; CATTIVELLI, L. Abiotic stress response in plants: When post-transcriptional and post-translational regulation control transcription. **Plant Science**. Vol. 174, N° 4, pp. 420-431. 2008.

McCOURT, P.; CREELMAN R. The ABA receptors – we report you decide. **Plant Biology**. Vol. 11, pp. 474-478. 2008.

MEARNS, L.O.; ROSENZWEIG, C.; GOLDBERG, R. Mean and variance change in climate scenarios: methods, agricultural applications, and measures of uncertainty. **Klumer Academic Publishers**. Vol. 35, pp. 367-396. 1997.

MEDINA, C.L.; MACHADO, E.C.; RENA, A.B.; SIQUEIRA, D.L. de. Fisiologia dos citros. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC. p.147-195. 2005.

MILBORROW, B.V. The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. **Journal of Experimental Botany**. Vol 52, Nº 359, pp. 1145-1164. 2001.

MIYAZONO, K.; MIYAKAWA, T.; SAWANO, Y.; KUBOTA, K.; KANG, HJ.; ASANO, A.; MIYAUCHI, Y.; TAKAHASHI, M.; ZHI, Y.; FUJITA, Y.; YOSHIDA, T.; KODAIRA, K.S., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; TANOKURA M. Structural basis of abscisic acid signalling. **Nature**. Vol 462, pp. 609-614. 2009.

MOINUDDIN. KHANNA-CHOPRA, R. Osmotic Adjustment in Chickpea in Relation to Seed Yield and Yield Parameters. **Crop Science Society of America**. Vol. 44, pp. 449-455, 2004.

MOORE, JP.; VICRÉ-GIBOUIN, M.; FARRANT, J.M.; DRIOUICH, A. Adaptations of higher plant cell walls to water loss: drought end desiccation. **Physiologia Plantarum**. Vol.134, pp. 237-245. 2008.

MOREIRA, R.A.; RAMOS, J.D.; CRUZ, M.C.M. Caracterização de frutos e poliembrionia em sementes de 'flying dragon' e de híbridos de porta-enxerto de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Vol.32, nº 2, pp.486-492. 2010.

MOYA, J.L.; PRIMO-MILLO, E.; TALON, M. Morphological factors determining salt tolerance in citrus seedlings: the shoot to root ratio modulates passive root uptake of chloride ions and their accumulation in leaves. **Plant Cell Environmental**. Vol. 22, pp.1425–1433. 1999.

MOYA, J.L.; GOMEZ-CADENAS, A.; PRIMO-MILLO, E.; TALON, M. Chloride absorption in salt-sensitive Carrizo citrange and salt-tolerant Cleopatra mandarin citrus rootstocks is linked to water use. **Journal Experimental Botany**. Vol.54, pp. 825–833. 2003.

MURATA, Y.; PEI, Z.M.; MORI, I.C.; SCHROEDER, J.I. Abscisic acid activation of plasma membrane Ca^{2+} channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in the *abi1-1* and *abi1-2* protein phosphatase 2c mutants. **Plant Cell**. Vol. 13, pp. 2513-2523. 2001.

MUSTILLI, A.C.; MERLOT, S.; VAVASSEUR, A.; FENZI, F.; GIRAUDAT, J. Arabidopsis ost1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. **Plant Cell**. Vol. 14, pp. 3089-3099. 2002.

NAMBARA, E.; MARION-POLL, A. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. **Annual Review of Plant Biology**. Vol. 56, pp. 165-185. 2005.

NEALES, T.F.; MASIA, A.; ZHANG, J.; DAVIES, W.J. The effects of partially drying part of the root system of *Helianthus annuus* on the abscisic acid content of the roots, xylem sap and leaves. **Journal Experimental Botany**. Vol. 40, pp.1113–1120. 1989.

NEILL, S.J.; BURNETT, E.C.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J.T. Cloning of a wilt-responsive cDNA in an *Arabidopsis thaliana* suspension culture cDNA library that encodes a putative 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase. **Journal of Experimental Botany**. Vol. 49, nº 328, pp. 1893-1894. 1998.

NEGI, J.; MATSUDA, O.; NAGASAWA, T.; OBA, Y.; TAKAHASHI, H.; KAWAI-YAMADA, M.; UCHIMIYA, H.; HASHIMOTO, M.; IBA K. CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. **Nature**. Vol. 452, pp. 483-486. 2008.

NEVES, M. F.; JANK, M. S. Perspectivas da cadeia produtiva da laranja no Brasil: A agenda 2015. **PENSA/USP/ICONE**, São Paulo, 2006.

NILSON, S.E.; ASSMANN, S.M. The control of transpiration. Insights from Arabidopsis. **Plant Physiology**. Vol. 143, pp. 19-27. 2007

NISHIMURA, N.; HITOMI, K.; ARVAI, S.A.; RAMBO, P.R.; HITOMI, C.; CUTLER, R.S.; SCHROEDER, L.J.; GETZOFF D.E. Structural mechanism of Abscisic Acid Binding and Signaling by Dimeric PYR1. **Science**. Vol. 326. pp. 1373-1379. 2009.

NISHIMURA, N.; SARKESHIK, A.; NITO, K.; PARK, SY.; WANG, A.; CARVALHO, C.P.; LEE, S.; CADELL, F.D.; CUTLER, R.S.; CHORY, J.; YATES, R.J., SCHROEDER, L.J. PYR/PYL/RCAR family members are major *in-vivo* ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in Arabidopsis. **The Plant Journal**. Vol. 61. pp. 290-299. 2010.

NOGUEIRA, R.J.M.C.; SANTOS, R.C. dos. Alterações fisiológicas no amendoim submetido ao estresse hídrico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. Vol. 4, p. 41-45. 2000.

PAINEL INTERGOVERNAMENTAL DAS MUDANÇAS CLIMÁTICAS. 2010. <http://www.ipcc.ch>. Acesso 04 de julho de 2010.

PARK, SY.; FUNG, P.; NISHIMURA, N.; JENSEN, R.D.; FUJII, H.; ZHAO, Y.; LUMBA, S.; SANTAGO, J.; RODRIGUES, A.; CHOW, F.T.; ALFRED, E.S.; BONETTA, D.; FINKELSTEIN, R.; PROVART, J.N.; DESVEAUX, D.; RODRIGUEZ, L.P.; MCCOURT, P.; ZHU, JK.; SCHROEDER, I.J.; VOLKMAN, F.BRIAN.; CUTLER, R.S. Abscisic acid inhibits type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL family of START Proteins. **Science**. Vol 324. PP 1068-1071. 2009.

PASSIOURA, J. The drought environment: physical, biological and agricultural perspectives. **Journal of Experimental Botany**. Vol. 58, pp. 113-117. 2007.

PEI, Z-M.; MURATA, Y.; BENNING, G.; THOMINE, S.; KLUSENER, B.; ALLEN, G.J.; GRILL, E.; SCHROEDER, J.I. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells. **Nature**. Vol. 406, pp. 731–734. 2000.

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**. Vol. 122, pp. 83-90. 2009.

PINHEIRO, H.A.; DAMATTA, F.M.; CHAVES, A.R.M.; LOUREIRO, M.E.; DUCATTI, C. Drought Tolerance is Associated with Rooting Depth and Stomatal Control of Water Use in Clones of *Coffea canephora*. **Annals of Botany**. Vol. 96, pp. 101-108, 2005.

POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. **Citros**. Centro APTA Citros Sylvio Moreira, (IAC). 2005. Capítulo 4. 62-104.

POMPEU JUNIOR, J. Rootstocks and scions in the citriculture of the São Paulo State. **INT. CONG. CITRUS NURSERYMEN**. Nº 6, pp. 75-82. 2001.

QIN, X.; ZEEVAART, J.A.D. The 9-*cis*epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. **PNAS**. 96, 15354–15361, 1999.

RODRIGO, M-J.; ALQUEZAR, B.; ZACARIAS, L. Cloning and characterization of two 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase genes, differentially regulated during fruit maturation and under stress conditions, from Orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Journal of Experimental Botany**. Vol. 57, No. 3, pp. 633-643, 2006.

RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A. A. Agroclimatologia e o cultivo de citros. **Citricultura Brasileira**. Campinas: Fundação Cargill. pp. 153-195. 1991.

RODRÍGUEZ-GAMIR, J.; PRIMO-MILLO, E.; FORNER, B. J.; FORNER-GINER, A. M. Citrus rootstock responses to water stress. **Scientia Horticulturae**. Vol. 126, pp. 95-102. 2010.

SAAVEDRA X., MODREGO A., RODRIGUEZ D., GONZALEZ-GARCIA P.M., SANZL., NICOLÁS G., E LORENZO O. The nuclear interactor pyl8/rcar3 of the

Fagus sylvatica FSPP2C1 is a positive regulator of aba signaling in seeds and stress. ***Plant Physiology Preview***. (2009).

SADRAS, V.O., MILROY, S.P. Soil-water thresholds for the responses of leaf expansion and gas exchange: A review. ***Field Crops Research***. 47: 253-266. 1996.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. ***Molecular Biology and Evolution***. v. 4, p. 406- 425. 1987.

SAMBROOK, J. e RUSSEL, D. ***Molecular Cloning: a laboratory manual***. New York: Cold Spring harbor Laboratory Press. 1989.

(A)SANTIAGO J., RODRIGUES A., SAEZ A., RUBIO S., ANTONI R., DUPEUX F., PARK SY., MÁRQUEZ A.J., CUTLER R.S. e RODRIGUEZ L.P. Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs. ***The Plant Journal***. Vol. 60, pp 575-588. 2009.

(B) SANTIAGO J., DUPEUX F., ROUND A., ANTONI R., PARK SY., JAMIN M., CUTLER R.S., RODRIGUEZ L.P. e MÁRQUEZ A.J. The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. ***Nature***. Vol 462, pp. 665-668. 2009.

SANTNER, A.; ESTELLE M. Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. ***Nature***. Vol 459, pp. 1071-1078. 2009.

SANTOS, R.F.; CARLESSO, R. Déficit hídrico e os processos morfológicos e fisiológicos das plantas. ***Ver. Bras. de Engenharia Agrícola e Ambiental***, Vol.. 2, Nº 3, pp. 287-294, 1998.

SAUTER, A.; DAVIES, W.J.; HARTUNG, W. The long-distance abscisic acid signal in the droughted plant: the fate of the hormone on its way from root to shoot. ***Journal of Experimental Botany***. Vol. 52, pp.1991–1997. 2001.

SENTELHAS, P. C. Agrometeorologia dos citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Eds.) ***Citros***. Campinas: 2005. Cap. 11

SEO, M. E KOSHIBA, T. Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. **TRENDS in Plant Science**. Vol. 7 No. 1. pp. 41-48. 2002.

SHABALA S. Regulation of potassium transport em leaves: from molecular to tissue level. **Annals of Botany**. Vol. 92. pp. 627-634. 2003.

SHABALA, S., CUIN, T.A. Potassium transport and plant salt tolerance. **Plant Physiology**. Vol. 133, 651-669. 2007.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Vol. 58, No. 2, pp. 221–227, 2007

SILVA, E.N.; FERREIRA-SILVA, S.L.; VIÉGAS, R.A.; SILVEIRA, J.A.G. The role of organic and inorganic solutes in the osmotic adjustment of drought-stressed *Jatropha curcas* plants. **Environmental and Experimental Botany**. 69. 279-285. 2010.

SOARES FILHO, W.S.; DIANANTINO, M.S.A.S.; MOITINHO, E.D.B.; SOBRINHO, A.P.C.; PASSOS, O.S.. Tropical, uma nova seleção de tangerina Sunki. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Vol.24, pp.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**. Vol.25, pp.268-271, 2003.

SOARES FILHO, W. dos S.; VILARINHOS, A. D.; ALVES, A. A. C.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; OLIVEIRA, A. A. R.; SOUZA, A. das S.; LEDO, C. A. da S.; CRUZ, J. L.; SOUZA, L. D.; CASTRO NETO, M. T de; GUERRA FILHO, M. dos S.; PASSOS, O. S.; MEISSNER FILHO, P. E. Programa de melhoramento genético de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura: obtenção de híbridos, 2003. 35 p. (**Documentos, 106**).

SCHACHTMAN, D.P.; GOODGER, J.Q.D. Chemical root to shoot signaling under drought. **Trends in Plant Science**. Vol.13, No.6, pp. 281-287. 2008.

SCHROEDER, J.I.; ALLEN, G.J.; HUGOUVIEUX, V.; KWAK J.M.; WANER, D. Guard cell signal transduction. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**. Vol. 52, pp. 627–658, 2001.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. **Current Opinion in Plant Biology**, vol. 3, pp. 217-223, 2000.

SREENIVASULU, N.; SOPORY, S.K.; KISHOR, K. Deciphering the regulatory mechanisms of abiotic stress tolerance in plants by genomic approaches. **Gene**. Vol. 388, pp. 1-13. 2007.

STOLL, M.; LOVEYS, B.; DRY, P. Hormonal changes induced by partial root-zone drying of irrigated grapevine. **Journal Experimental Botany**. 51:1627–1634. 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4ª edição. Porto Alegre: Artmed. 719 p., 2009.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**. v. 24, p. 1596 - 1599. 2007.

TAN, B.C.; SCHWARTZ, S.H.; ZEEVAART, J.A.D.; MCCARTY, D.R. Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. **PNAS**. Vol. 94, pp. 12235–12240, 1997.

TAN, B-C.; JOSEPH, L.M.; DENG, W-T.; LIU, L.; LI, Q-B.; CLINE, K.; MCCARTY, D.R. Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-cis epoxycarotenoid dioxygenase gene family. **The Plant Journal**. Vol. 35, pp. 44-56. 2003.

THOMPSON, J.; HIGGINS, D.; GIBSON, T. Clustal-W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,

position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. v. 22, p. 4673 - 4680. 1994.

TUBEROSA, R.; SALVI, S. Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. **Trends in Plant Science**. Vol. 11, N° 8, pp. 405-412. 2006.

VLAD, F.; RUBIO, S.; RODRIGUES, A.; SIRICHANDRA, C.; BELIN, C.; ROBERT, N.; LEUNG, J.; RODRIGUEZ, L.P.; LAURIÈRE, C.; MERLOT, S. protein phosphatases 2C regulate the activation of the Snf1-related kinase OST1 by Abscisic Acid in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**. pp 1-15. 2009.

YOSHIDA, R.; UMEZAWA, T.; MIZOGUCHI, T.; TAKAHASHI, S.; TAKAHASHI, F.; SHINOZAKI, K. The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in *Arabidopsis*. **The Journal of Biological Chemistry**. Vol. 281, n° 8, pp. 5310-5318. 2006.

XIONG, L.; ZHU, J.K. Regulation of abscisic acid biosynthesis. **Plant Physiology**. Vol. 133, pp. 29-36. 2003.

WAN, X-R.; LI, L. Regulation of ABA level and water-stress tolerance of *Arabidopsis* by ectopic expression of a peanut 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. Vol. 347, N° 4, pp. 1030-1038. 2006.

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

WESTGATE, M.E.; BOYER, J.S. Osmotic adjustment and the inhibition of leaf, root, stem and silk growth at low water potentials in maize. **Planta**. Vol. 164, pp. 540-549. 1985.

ZHANG, X.; ZHANG, L.; DONG, F.; GAO, J.; GALBRAITH, D.W.; SONG, C-P. Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. **Plant Physiology**. Vol. 126, pp. 1438–1448. 2001.

ZHU, J.K. Salt and drought stress signal transduction in plants. ***Annual Review Plant Biology***. Vol. 53, pp. 247–273. 2002.