

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal



Tese

**Respostas fisiológicas e moleculares de pessegueiro cv. Chimarrita enxertado
sobre diferentes portaenxertos submetidos ao déficit hídrico**

Leticia Neutzling Rickes

Pelotas, 2015

Leticia Neutzling Rickes

**Respostas fisiológicas e moleculares de pessegueiro cv. Chimarrita enxertado
sobre diferentes portaenxertos submetidos ao déficit hídrico**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Fisiologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Valmor João Bianchi

Coorientadores: Prof. Dr. Luciano do Amarante

Prof. Dr. Marcos Antonio Bacarin

Catálogo na fonte

Gabriela Machado Lopes CRB: 10/184

R539r Rickes, Leticia Neutzling

Respostas fisiológicas e moleculares de pessegueiro cv. Chimmarrita enxertado sobre diferentes portaenxertos submetidos ao déficit hídrico / Leticia Neutzling Rickes; Valmor João Bianchi, orientador; Luciano do Amarante e Marcos Antonio Bacarin, co-orientadores. Pelotas, 2015.

106 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. *Prunus persica* 2. Estresse abiótico. 3. Trocas gasosas 4. RT-qPCR I. Bianchi, Valmor João, orient II. Título.

CDD : 634.25

Leticia Neutzling Rickes

**Respostas fisiológicas e moleculares de pessegueiro cv. Chimarrita enxertado
sobre diferentes portaenxertos submetidos ao déficit hídrico**

Tese aprovada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Fisiologia Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 24/09/2015

Banca examinadora:

Prof. Dr. Valmor João Bianchi (orientador) - UFPel

Prof. Dr. Sidnei Deuner - UFPel

Prof. Dr. Paulo Celso de Mello Farias -UFPel

Dr^a. Caroline Marques Castro – Embrapa ClimaTemperado

Prof. Dr^a. Emanuela Garbin Martinazzo (Suplente) – FURG

*“Minhas imperfeições e fracassos são
como uma bênção de Deus, assim como o meu sucesso e
meus talentos, e eu os coloco ambos aos seus pés”.*

(Ghandi)

Agradecimentos

Três anos e meio se passaram e foram muitas as pessoas que contribuíram na conclusão desta etapa. Agradeço em PRIMEIRO lugar à Deus, que sempre atendeu às minhas orações, me guiando e mostrando o melhor caminho para as minhas decisões, por me dar saúde e sabedoria para poder completar essa etapa na minha vida!!!!

À Universidade Federal de Pelotas, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal (PPGFV), por me permitir cursar e concluir o Mestrado e agora, o Doutorado.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À todos os grandes professores do PPG em Fisiologia Vegetal, pelos conhecimentos transmitidos e adquiridos no meio acadêmico, bem como por enriquecer os já existentes.

Em especial, ao meu orientador Prof. Dr. Valmor João Bianchi pela credibilidade em me orientar e pelos exemplos de dedicação e profissionalismo, pela agradável convivência ao longo do tempo, pela competência os quais aprecio com respeito e admiração, e por me incentivar e ensinar a seguir em frente, mesmo quando há obstáculos.

Aos meus coorientadores Prof. Dr. Marcos Antonio Bacarin e Luciano do Amarante.

À Dra. Letícia Benitez, pela disposição em ajudar sempre, pela enriquecedora troca de conhecimentos, pois aprendi muito contigo, o que proporcionou construirmos uma bela amizade!

À Elsa Kuhn Klumb, amiga que “ganhei” para a vida toda. Obrigada pela ajuda e companhia nos nossos experimentos naqueles dias escaldantes na casa de vegetação em meados de dezembro, janeiro e fevereiro. Pela grande troca de conhecimentos, pessoa que admiro pela grande inteligência e humildade. E também

pela companhia para um happy hour, após dias cansativos no laboratório, pelos conselhos, por me escutar nos momentos difíceis, tenho imensa gratidão!

Aos amigos Anderson Feijó (Bitoca) e Rauny Oliveira, meninos com um imenso coração e também capacitados de uma grande inteligência! Sempre disponíveis para ajudar quando necessário. Meus grandes amigos que tenho imenso carinho e respeito. Torço muito por vocês!

Aos estagiários Iran e Wagner, pela grande ajuda em carregar os meus vasos com as plantas, mega pesados. Fica o meu muito obrigada e torço muito pelo sucesso de vocês, pois merecem!

À todos os colegas do PPG em Fisiologia Vegetal, que desafiaram entrar no mundo encantador da Pós-Graduação, tenho imensa admiração por todos.

Ao pessoal do LCTP, obrigada pela convivência agradável diariamente, pela ajuda nos dias de limpeza do laboratório, pela organização no uso de equipamentos, pela troca de reagentes. Enfim, adorei fazer parte desta equipe!

À minha irmã, Marcele Rickes, que certamente está orgulhosa por esta conquista.

Ao meu namorado, Flávio Ferreira, pelo apoio incondicional, sempre tentando elevar a minha autoestima, pois sempre acreditou no meu potencial (na maioria das vezes, mais do que eu). Sempre disponível para o que der e vier. Obrigada pelo amor, carinho e compreensão que sempre tivestes comigo! Sou muito grata por tudo!

Às minhas amigas “antigas”, desde o Ensino Médio, Aruana, Carol e Camila, obrigada pelas conversas e apoio de sempre. Estaremos sempre juntas, acompanhando o sucesso uma da outra.

E por fim, a todos aqueles que embora não tiveram os seus nomes citados, contribuíram de alguma maneira para que este dia se tornasse realidade.

AGRADEÇO!

Resumo

RICKES, Leticia Neutzling. **Respostas fisiológicas e moleculares de pessegueiro cv. Chimarrita enxertado sobre diferentes portaenxertos submetidos ao déficit hídrico**. 2015. 106f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS, 2015.

A fruticultura é um importante componente do agronegócio brasileiro, assumindo destaque cada vez maior no Rio do Grande do Sul, principalmente na região Sul deste Estado. Esta região se destaca por ser a maior detentora da produção de pêssegos do Brasil, porém ainda apresenta a menor produtividade média dos pomares, quando comparado a outros Estados. Isso se deve principalmente pelas condições edafoclimáticas da região, onde há presença de solos com horizonte 'A' pouco profundo e com problema de drenagem, que dependendo do período do ano, podem sofrer situações de déficit hídrico em períodos críticos para a cultura, prejudicando o desenvolvimento e a produtividade da mesma. A restrição hídrica afeta diretamente o metabolismo das plantas, como por exemplo, a diminuição da taxa assimilatória líquida, o fechamento estomático, a utilização e partição de carboidratos e em nível molecular, a expressão de genes relacionados ao déficit hídrico. Desta forma, este trabalho visou caracterizar respostas diferenciais à nível fisiológico e molecular em plantas do gênero *Prunus persica* enxertadas sobre diferentes portaenxertos submetidas ao déficit hídrico, a fim de auxiliar na escolha de genótipos mais tolerantes à essa condição hídrica. O trabalho foi dividido em três experimentos, no primeiro, foram avaliados os parâmetros das trocas gasosas da cultivar copa Chimarrita enxertada sobre cinco diferentes portaenxertos (Tsukuba 1, Tsukuba 2, Tsukuba 3, Aldrighi 1 e Seleção UFPel 0402) submetidos ao déficit hídrico, com esquema fatorial: 2 x 8, sendo duas condições hídricas (controle e déficit hídrico) e oito dias de avaliação (0, 1^o, 2^o, 3^o, 4^o, 6^o, 7^o e 9^o, sendo os dois últimos, período de recuperação: 24h e 72h, respectivamente). As diferentes combinações de portaenxertos com a cultivar copa Chimarrita, demonstraram comportamento fisiológico diferencial para a tolerância inicial ao déficit hídrico. A combinação 'Chimarrita'/Aldrighi 1' apresentou-se com uma maior de tolerância inicial ao déficit hídrico. A redução da taxa assimilatória líquida perante o déficit hídrico não está relacionada principalmente à limitação estomática, sugerindo-se que ocorrem também limitações não estomáticas. No segundo experimento, objetivou-se analisar genes normalizadores para estudos de expressão gênica através da técnica de RT-qPCR em folhas de 'Chimarrita', enxertadas sobre 'Aldrighi 1' e 'Tsukuba 2' submetidos ao déficit hídrico por um período de nove dias. Não houve influência das diferentes combinações 'Chimarrita'/portaenxertos para expressão dos genes normalizadores nas condições impostas do presente estudo, sendo os genes *TUA* e *CYP2* considerados os mais adequados mediante as condições impostas. Por outro lado, os genes *Ef-1α* e *ACT* foram os menos indicados para as mesmas condições. No terceiro experimento, objetivou-se verificar através da técnica de RT-qPCR a expressão de sete genes-chave envolvidos no processo de resposta ao déficit hídrico em folhas de pessegueiro cultivar copa 'Chimarrita' enxertadas sobre os portaenxertos 'Aldrighi 1' e 'Tsukuba 2'. Os resultados demonstraram que houve indução de resposta diferencial da combinação

'Chimarrita'/portaenxertos em relação à expressão dos genes envolvidos no metabolismo do ajustamento osmótico, tais como, *SDH*, *SIP1* *GTL* e *P5SC*. O gene *S6PDH*, apresentou expressão bastante pronunciada e similar para ambas as combinações copa/portaenxertos no quarto dia de estresse, evidenciando a participação e importância do sorbitol no ajustamento osmótico para uma possível tolerância ao déficit hídrico. No entanto, expressão dos genes relacionados ao metabolismo de sorbitol e de prolina, podem ser utilizados como marcadores moleculares para tolerância ao déficit hídrico em portaenxertos de *Prunus persica*.

Palavras-chave: *Prunus persica*, estresse abiótico, trocas gasosas, RT-qPCR.

Abstract

RICKES, Leticia Neutzling. **Physiological and molecular responses of peach tree cv. Chimarrita grafted on different rootstocks submitted to water deficit.** 2015. 106f. Thesis (Doctoral) - Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2015.

Fruit growing is an important component of Brazilian agribusiness, assuming increasing prominence in the Rio Grande do Sul, mainly in the southern region of this state. This region stands out as the largest holder of the production of peaches in Brazil, but also has the lowest average productivity of the orchards when compared to other states. This is mainly the soil and climatic conditions of the region, where there is presence of soils with horizon 'A' superficial and with drainage problem, which depending on the time of year, may suffer water stress situations at critical periods for culture, impairing development and productivity of the same. Water restriction intake directly affects the metabolism of plants, such as the decrease in net assimilation rate, stomatal closure, use and carbohydrates partition and molecular level the expression of genes related to drought. Therefore, this study aimed to characterize differential responses to physiological and molecular level in the genus *Prunus persica* plants, grafted on different rootstocks subjected to water stress in order support choose the most tolerant to this condition water. The work was divided into three experiments, the first evaluated the parameters of gas exchange of the cultivar cup Chimarrita grafted on five different rootstocks (Tsukuba 1, Tsukuba 2, Tsukuba 3, Aldrighi 1 and Seleção UFPel 0402) submitted to water deficit, with factorial design: 2 x 8, two water conditions (control and water deficit) and eight days of evaluations (0, 1, 2, 3, 4, 6, 7 and 9, the latter two, recovery time: 24 hours and 72 hours respectively). The different combinations of rootstocks with the cultivar cup Chimarrita demonstrated physiological performance differential for initial tolerance to water deficit. The combination 'Chimarrita'/Aldrighi 1 'presented with an initial greater tolerance to water deficit. The reduced net assimilation rate before the water deficit is not related mainly to stomatal limitation, suggesting that also occur not stomatal limitations. The second experiment aimed to analyze normalizing genes for gene expression studies by RT- qPCR technique in leaves 'Chimarrita' grafted on 'Aldrighi 1' and 'Tsukuba 2' and subjected to water stress for a period of nine days. There was no influence of different combinations 'Chimarrita'/rootstocks for normalizing gene expression of the imposed conditions of this study, and the *TUA* and *CYP2* genes considered best suited by the conditions imposed. However, the *EF-1 α* gene and the *ACT* less suitable for the same conditions. In the third experiment aimed to verify through RT- qPCR technique the expression of seven key genes involved in the response process to water deficit in peach leaves cultivar cup 'Chimarrita' grafted on rootstocks 'Aldrighi 1' and 'Tsukuba 2'. The results showed induction differential response of the combination 'Chimarrita'/rootstocks compared to the expression of genes involved in the metabolism of the osmotic adjustment, such as *SDH*, *SIP1*, *GTL* and *P5SC*. The *S6PDH* gene, presented quite pronounced and similar expression for both compounds canopy/rootstocks on the fourth day of stress, suggesting a participation and importance of sorbitol in osmotic adjustment for possible tolerance to water

deficit. However, expression of genes related to the metabolism of sorbitol and proline, can be used as molecular markers for tolerance to water deficit in rootstocks of *Prunus persica*.

Keywords: *Prunus persica*, abiotic stress, gas exchange, RT-qPCR.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1. Representação esquemática dos genes envolvidos nas respostas à tolerância ao déficit hídrico. Produtos gênicos são classificados em dois grupos, o primeiro inclui proteínas de provável tolerância ao estresse (proteínas funcionais), o segundo grupo contém fatores protéicos envolvidos na regulação de tradução de sinais e expressão gênica de provável função na resposta ao estresse (proteínas regulatórias). **9**

CAPÍTULO 1

Figura 1. Taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E) e concentração intercelular de CO_2 (C_i) de plantas de pessegueiro cultivar copa 'Chimarrita' enxertada sobre o portaenxerto 'Tsukuba 1', submetidas ao déficit hídrico por seis dias. Setas indicam período de recuperação (7=24h e 9=72h respectivamente). Médias comparadas dentro de cada dia, sendo que os asteriscos indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($n = 4$). Barra indica erro padrão da média.....**26**

Figura 2. Taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E) e concentração intercelular de CO_2 (C_i) de plantas de pessegueiro cultivar copa 'Chimarrita' enxertada sobre o portaenxerto 'Tsukuba 2', submetidas ao déficit hídrico por seis dias. Setas indicam período de recuperação (7=24h e 9=72h respectivamente). Médias comparadas dentro de cada dia, sendo que os asteriscos indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($n = 4$). Barra indica erro padrão da média.**26**

Figura 3. Taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E) e concentração intercelular de CO_2 (C_i) de plantas de pessegueiro cultivar copa

'Chimarrita' enxertada sobre o portaenxerto 'Tsukuba 3', submetidas ao déficit hídrico por seis dias. Setas indicam período de recuperação (7=24h e 9=72h respectivamente). Médias comparadas dentro de cada dia, sendo que os asteriscos indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (n = 4). Barra indica erro padrão da média.....27

Figura 4. Taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E) e concentração intercelular de CO_2 (C_i) de plantas de pessegueiro cultivar copa 'Chimarrita' enxertada sobre o portaenxerto 'Aldrighi 1', submetidas ao déficit hídrico por seis dias. Setas indicam período de recuperação (7=24h e 9=72h respectivamente). Médias comparadas dentro de cada dia, sendo que os asteriscos indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (n = 4). Barra indica erro padrão da média.....27

Figura 5. Taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E) e concentração intercelular de CO_2 (C_i) de plantas de pessegueiro cultivar copa 'Chimarrita' enxertada sobre o portaenxerto 'Seleção UFPel 0402', submetidas ao déficit hídrico por seis dias. Setas indicam período de recuperação (7=24h e 9=72h respectivamente). Médias comparadas dentro de cada dia, sendo que os asteriscos indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (n = 4). Barra indica erro padrão da média.28

CAPÍTULO 2

Figura 1. Eficiência e especificidade de oito genes de referência em folhas de pessegueiro cultivar Chimarrita enxertada sobre o portaenxerto 'Aldrighi 1', submetidos ao déficit hídrico por diferentes períodos.....47

Figura 2. Eficiência e especificidade de oito genes de referência em folhas de pessegueiro cultivar Chimarrita enxertada sobre o portaenxerto 'Tsukuba 2', submetidos ao déficit hídrico por diferentes períodos.....48

Figura 3. Estabilidade média de expressão de oito genes de referência de acordo com os algoritmos (A) Método Comparativo ΔC_T , (B) Bestkeeper, (C) NormFinder, (D) geNorm e (E) RefFinder-Ranking, em folhas de pessegueiro cultivar copa ‘Chimarrita’ enxertada sobre o portaenxerto ‘Aldrighi1’ submetidos ao déficit hídrico.51

Figura 4. Estabilidade média de expressão de oito genes de referência de acordo com os algoritmos (A) Método Comparativo ΔC_T , (B) Bestkeeper, (C) NormFinder, (D) geNorm e (E) RefFinder-Ranking, em folhas de pessegueiro cultivar copa ‘Chimarrita’ enxertada sobre o portaenxerto ‘Tsukuba 2’ submetidos ao déficit hídrico.....52

CAPÍTULO 3

Figura 1. Eficiência e especificidade dos sete *primers* testados em folhas de pessegueiro cultivar copa ‘Chimarrita’ enxertada sobre o portaenxerto ‘Aldrighi 1’ submetidos ao déficit hídrico por diferentes períodos.71

Figura 2. Eficiência e especificidade dos sete *primers* testados em folhas de pessegueiro cultivar copa ‘Chimarrita’ enxertada sobre o portaenxerto ‘Tsukuba 2’ submetidos ao déficit hídrico por diferentes períodos.....72

Figura 3. Expressão relativa dos genes *ACC oxidase*, *SOT1*, *SDH*, *GTL*, *P5CS*, *SIP1* e *S6PDH* em folhas de pessegueiro cultivar copa ‘Chimarrita’ enxertadas sobre os portaenxertos ‘Aldrighi 1’ e ‘Tsukuba 2’ submetidos ao déficit hídrico. As barras indicam erro padrão (n=3).75

Lista de Tabelas

INTRODUÇÃO GERAL

Tabela 1. Características da cultivar copa ‘Chimarrita’ e dos cinco portaenxertos utilizados no presente estudo.4

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Descrição dos oito genes de referência testados nas reações de RT-qPCR em plantas de pessegueiro sob déficit hídrico.44

Tabela 2. Média (\bar{X}), Coeficiente de Variação (CV%) e Desvio Padrão (DP) de oito genes de referência testados em folhas de pessegueiro cultivar copa ‘Chimarrita’ enxertadas sobre o portaenxerto ‘Aldrighi 1’ e ‘Tsukuba 2’ respectivamente, submetidos ao déficit hídrico.....49

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Descrição da sequência nucleotídica de sete genes testados nas reações de RT-qPCR em plantas de pessegueiro sob déficit hídrico.70

Sumário

| | |
|---------------------------------|----|
| Introdução Geral..... | 1 |
| Referências Bibliográficas..... | 11 |

Capítulo 1 - Déficit hídrico afeta as trocas gasosas em plantas de pessegueiro cultivar Chimarrita enxertada sobre diferentes portaenxertos

| | |
|----------------------------------|----|
| INTRODUÇÃO | 19 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 22 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 23 |
| CONCLUSÕES | 31 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 32 |

Capítulo 2 - Genes de referência para estudos de expressão gênica em plantas de *Prunus persica* sob déficit hídrico

| | |
|----------------------------------|----|
| INTRODUÇÃO | 37 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 39 |
| RESULTADOS | 45 |
| DISCUSSÃO | 52 |
| CONCLUSÕES | 56 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 58 |

Capítulo 3 – Resposta diferencial na expressão de genes potencialmente envolvidos no mecanismo de tolerância ao déficit hídrico em plantas da cv. Chimarrita (*Prunus persica*) enxertada sobre dois portaenxertos

| | |
|----------------------------------|----|
| INTRODUÇÃO | 63 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 66 |
| RESULTADOS | 73 |
| DISCUSSÃO | 76 |
| CONCLUSÕES | 82 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 83 |

Considerações Finais.....91

INTRODUÇÃO GERAL

A cultura do pessegueiro

O pessegueiro (*Prunus persica* L.), pertence à divisão *Magnoliophyta*, classe *Magnoliopsida*, ordem *Rosales*, família *Rosaceae*, subfamília *Prunoidea*, gênero *Prunus*. Dentro do gênero *Prunus*, existe uma grande diversidade de espécies que pertencem à subfamília *Prunoideae* da família *Rosaceae* (REHDER, 1940). Muitas espécies deste gênero são economicamente importantes, como por exemplo, os damasqueiros, cerejeiras, pessegueiros, nectarineiras e ameixeiras, devido seus frutos serem muito apreciados (LEE, WEN, 2001). Por outro lado, várias espécies de *Prunus* [*P. dulcis* DA Webb; *P. persica* (L.) Batsch; *P. cerasifera* Ehrh; *P. domestica*.; *P. insititia* L.; e os seus híbridos, etc.] tem grande importância para uso como portaenxertos, principalmente por serem mais adaptados a diversas condições ambientais, a pragas e doenças do solo.

No ano de 2012, a produção de pêssegos e nectarinas tiveram grande destaque dentre as frutíferas de clima temperado em nível mundial, ultrapassando 210 milhões de toneladas, segundo dados da FAOSTAT (2015), evidenciando a importância econômica no mercado mundial de frutas. Em 2013, a produção de pêssegos no Brasil foi de 217.706 toneladas. Dentre os Estados brasileiros, o Rio Grande do Sul (RS) se destaca por ser o principal produtor, com aproximadamente 137 mil toneladas, em uma área de 13.164 hectares, seguido dos Estados de São Paulo (26.84 toneladas), Santa Catarina (21.985 toneladas) e Minas Gerais (20.139 toneladas) (IBGE, 2015).

No RS, o principal pólo de produção é a metade sul do Estado, onde a persicultura é realizada principalmente em pequenas propriedades de agricultura familiar, constituindo uma excelente alternativa para fixar mão de obra no campo, gerando renda e emprego (TERRA et al., 2014). Sendo que no município de Pelotas/RS, a cultura do pessegueiro tem se direcionado principalmente à produção de pêssegos para atender a indústria regional de doces e conservas (ROCHA et al., 2007).

O sucesso na exploração de um pomar de pessegueiro depende de muitos fatores, dentre eles a sua localização, cuja instalação requer um cuidadoso exame

das condições ambientais, como clima, solo e topografia. Há necessidade de um bom sistema radicular profundo para suportar curtos períodos de déficit hídrico, pois períodos de déficit hídrico prolongados, principalmente no final da primavera e início do verão, podem trazer consideráveis prejuízos, tornando-se imprescindível o uso do sistema de irrigação no sentido de fornecer à cultura um adequado suprimento de água para que se obtenha frutos de melhor qualidade e menores riscos de prejuízos causados por pragas e doenças (HERTER et al., 2003, TIMM et al., 2007).

A importância da cultura do pessegueiro no RS contrasta com o fato de que não se utilizam portaenxertos selecionados e adaptados às diferentes condições edafoclimáticas de cultivo, tolerantes a pragas e doenças, com capacidade de induzir a cultivar copa precocidade de produção, porte reduzido e eficiência na produção de frutas de qualidade (HOFFMANN et al., 2003). Diante disso, há necessidade de maiores pesquisas juntamente com programas de melhoramento genético, visando o desenvolvimento de cultivares copa e de portaenxertos que, quando combinados, otimizem a produção mediante as diferentes condições edafoclimáticas.

Portaenxertos

A fruticultura moderna baseia-se na utilização de portaenxertos, possibilitando o cultivo de inúmeras cultivares copa e espécies nos mais variados climas e regiões. Portanto, o seu uso em fruticultura pode influenciar na adaptabilidade de uma cultura às condições edáficas de uma região e, conseqüentemente, nas características vegeto-produtivas da copa (PICOLOTTO, 2009).

Segundo Hartmann et al. (2002), o uso de portaenxertos tem grande importância no cultivo de espécies frutíferas, visto que estes podem interferir no desenvolvimento e vigor da copa, na precocidade de produção, na quantidade e qualidade da produção, no adiantamento ou atraso da maturação dos frutos, na resistência a pragas e doenças do solo, bem como na capacidade de adaptação às condições edafoclimáticas desfavoráveis.

A utilização de portaenxertos na cultura do pessegueiro, dentre outros fatores, visa possibilitar o cultivo em locais em que as condições edafoclimáticas e fitossanitárias sejam limitantes ao desempenho produtivo do pomar, por fatores tais

como: solos infestados com fitonematóides (*Meloidogyne* spp.), fungos (*Armillaria*, *Rosellinia*, *Phytophthora*), bactérias (*Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*), viroses e insetos (*Synanthedon* spp., *Capnodis* spp.), adaptações edafoclimáticas (tolerância a solos calcários, ácidos, alagamento, déficit hídrico, baixa fertilidade e temperaturas, replantio) (LORETI, 2008, RATO et al., 2008).

Considerando a importância da utilização de portaenxertos na cultura do pessegueiro, a avaliação de novos materiais faz-se necessária, uma vez que a produção de mudas no Estado do RS, na maioria das vezes é realizada através de portaenxertos provenientes de caroços obtidos por sementes da indústria conserveira (FACHINELLO et al., 2000), portanto sem nenhum critério de seleção para utilização como portaenxertos. Além disso, há carência no conhecimento das características agrônomicas induzidas por diferentes portaenxertos com a maioria das cultivares copa de pessegueiro (SCHMITZ et al., 2012).

Diversos trabalhos têm sido conduzidos no Brasil visando avaliar as respostas agrônomicas induzidas por diferentes portaenxertos sobre as cultivares copa (RODRIGUES et al., 2004, ROSSI et al., 2004, GALARÇA et al., 2012, PICOLOTTO et al., 2012, SCHMITZ et al., 2012). Cultivares com Aldrighi e Capdeboscq tem sido utilizadas por serem genótipos bastante utilizadas como portaenxertos nas primeiras décadas da expansão da persicultura gaúcha (ROSSI et al., 2004), sendo que atualmente novos genótipos selecionados para uso com portaenxertos tem sido introduzidos de diferentes partes do mundo, a exemplo de Tsukuba 1, 2 e 3 (MAYER; BIANCHI; CASTRO, 2014), Flordaguard, Myrobalano, Nemaguard, Nemared bem como genótipos selecionados no Brasil, tais como Aldrighi 1 e Seleção UFPel (MAYER; BIANCHI; CASTRO, 2014), entretanto ainda pouco é conhecido sobre as respostas induzidas por estes diferentes genótipos nas condições brasileiras. Portanto, na tabela 1 são apresentadas algumas características do material vegetal utilizado no presente estudo.

Tabela 1. Características da cultivar copa ‘Chimarrita’ e dos cinco portaenxertos utilizados no presente estudo.

| Genótipo | Características | Referência |
|---------------------------|---|---------------------------------|
| Chimarrita | Foi criada no Centro Nacional de Fruticultura de Clima Temperado na década de 80. É originária do cruzamento entre ‘Babcock’ e ‘Flordabella’. Apresenta vigor médio e é altamente produtiva. Nas condições do sul do RS, produz muito bem em anos em que o acúmulo de frio hibernal seja de 200 horas. A floração plena ocorre em meados de agosto, e a colheita dos frutos inicia-se ao final de novembro ou na primeira semana de dezembro. | RASEIRA; NAKASU; BARBOSA (2014) |
| Tsukuba 1, 2 e 3 | Foram selecionados no Japão. As cultivares ‘Tsukuba’ de 1 a 6 são caracterizadas pela coloração vermelha das folhas jovens. Apresentam vigor diferenciado entre si. ‘Tsukuba 1’ é a mais vigorosa, é resultado do cruzamento entre Akame (folhas vermelhas) e Okinawa. ‘Tsukuba 2’, é intermediária, e ‘Tsukuba 3’ é a menos vigorosa dentre as três. Os portaenxertos da série ‘Tsukuba’, apresentam alguma tolerância aos nematóides causadores de galhas (<i>Meloidogyne</i> spp.) | MAYER; BIANCHI; CASTRO (2014) |
| Aldrighi 1 | Foi selecionada na década de 1940 no município de Pelotas/RS, é originária de sementes de pêssego procedentes da Argentina, logo após introduzida na Estação Experimental de Pelotas, é intensivamente usada nos programas de melhoramento genético do RS. Apresenta vigor médio, e média produção, suscetível à gomose (causada por <i>Fusicoccum amygdali</i>), à ferrugem-da-folha e moderadamente suscetível à podridão-parda dos frutos, possui baixa resistência à asfixia. A plena floração ocorre geralmente nos últimos dias de julho, podendo ocorrer na primeira quinzena de agosto. A colheita dos frutos inicia-se na primeira quinzena de janeiro. É uma cultivar voltada para a indústria na região. A cultivar é bem adaptada as condições de inverno ameno da região Sul do Brasil. | RASEIRA; NAKASU; BARBOSA (2014) |
| Seleção UFPel 0402 | É um genótipo obtido na Universidade Federal de Pelotas a partir de uma população de <i>seedlings</i> derivados por livre polinização da cultivar Okinawa. Apresenta floração e período de maturação precoce (aproximadamente um mês antes da cultivar Okinawa, nas condições climáticas de Pelotas/RS). Apresenta resistência aos nematóides do gênero <i>Meloidogyne</i> spp. | MAYER; BIANCHI; CASTRO (2014) |

Estresse hídrico e seus efeitos na cultura do pessegueiro no RS

Embora o Estado do RS se destaque por ser o maior produtor de pêssegos no âmbito nacional (137 mil toneladas - IBGE, 2015), essa produção poderia ser ainda maior se não houvessem problemas relacionados ao plantio em locais com condições de estresses tanto bióticos como abióticos. Regiões com regularidade da temperatura e pluviosidade durante as estações do ano são mais adequadas para o cultivo de espécies frutíferas. Nesse contexto, a Região Sul do RS, caracteriza-se por ser de clima subtropical e apresenta grandes irregularidades dos fatores ambientais, dentro de uma mesma estação e ao longo dos diferentes anos.

Nesta Região, parte das áreas destinadas ao cultivo do pessegueiro está situada em locais onde há existência de solos hidromórficos e solos apresentando horizonte 'A' pouco permeáveis, pouco profundos, com problemas retenção de água e de drenagem (CUNHA; SILVEIRA, 1996), além do mais, a média de precipitação anual, é bastante elevada (1.500 mm) e muitas vezes mal distribuída ao longo do ano. Em casos de precipitações intensas num curto período de tempo, solos com deficiência de drenagem podem permanecer alagados por diversos dias, resultando em situação de estresse por alagamento em períodos delicados para a cultura, como por exemplo, fase de florescimento (TIMM et al., 2007a, MARTINAZZO, et al., 2013).

Por outro lado, nos meses de novembro a janeiro, é comum ocorrer déficit hídrico, que coincide com o período de pré-colheita e colheita dos frutos exceto em pomares em que se faz uso da irrigação (TIM et al., 2007 a,b, MARTINAZZO, et al., 2013). Em levantamento de dados até 2005, realizados por Timm et al. (2007a), verificou-se que a probabilidade de ocorrência de déficit hídrico maiores do que 20 mm, em solos com capacidade de campo de 100 mm, se aproxima de 50% das áreas de cultivo pessegueiro nos meses de dezembro e janeiro, comprometendo a qualidade e a produtividade dos pomares. Portanto, os estudos sobre o controle e efeitos do déficit hídrico na cultura do pessegueiro merecem maior destaque em função da importância social e econômica desta cultura para o RS e, em especial, a região Sul do Estado.

Mudanças climáticas x déficit hídrico em plantas: efeitos fisiológicos

As plantas sob condições naturais estão expostas a vários estresses ambientais que afetam seu metabolismo desencadeando mudanças bioquímicas e moleculares com a finalidade de evitá-los ou tolerá-los (MENESES et al., 2006, KRASENSKY, JONAK, 2012). Dentre os estresses ambientais que acometem as plantas, destacam-se o estresse hídrico por déficit e alagamento, as altas temperaturas, além da salinidade, alcalinidade e pH baixo dos solos.

Segundo dados do IPCC (*Intergovernmental Panel on Climate Change*), a média de temperatura da superfície global deve aumentar de 1,1 a 6,4°C no final deste século. O aquecimento global aumentaria a frequência e intensidade do déficit hídrico com um aumento de 1 a 30% das áreas secas da Terra até 2100 (CHAVES; MAROCO; PEREIRA, 2003, FISCHLIN et al., 2007).

Sob o contexto de mudanças climáticas, o déficit hídrico tem impacto negativo sobre os sistemas agrícolas, tendo em vista que as respostas das plantas a esse estresse diferem em vários níveis de organização, ou seja, dependendo da intensidade e da duração do estresse, bem como da tolerância da espécie e do estágio de desenvolvimento da planta, sendo que as respostas sobre elas podem ser reversíveis ou irreversíveis (FISCHLIN et al., 2007, SHAO et al., 2008, RIPOLL et al., 2014).

As respostas das plantas ao déficit hídrico são complexas, envolvendo mudanças adaptativas e/ou efeitos deletérios. Os principais mecanismos relacionados a esse estresse envolvem as relações hídricas da planta, fotossíntese e acúmulo de metabólitos específicos, como substâncias compatíveis (açúcares, prolina, glicina betaína), além do mais, aumento na biossíntese de hormônios, como o ácido abscísico (ABA) e etileno. Quando o déficit hídrico se desenvolve lentamente, as plantas podem apresentar respostas de aclimação que tem efeitos no crescimento, com redução da expansão foliar e aumento do crescimento radicular (POTTERS et al., 2007, SHAO et al., 2008).

Um dos mecanismos mais importantes de tolerância ao déficit hídrico a nível fisiológico é o fechamento estomático (ROUHI et al., 2007, CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009, MARTINAZZO et al., 2013), resposta que é mediada pelo ABA (LEUNG, GIRAUDAT, 1988; ZHANG; OUTLAW, 2001, SALAZAR; HERNÁNDEZ; PINO, 2015), o qual desencadeia uma cascata de sinalizações da raiz até o dossel

da planta via transpiração para então promover o fechamento estomático, controlando o influxo e efluxo de K^+ nas células guarda, assim como os de Cl^- e malato na plasmalema e tonoplasto destas células, para o balanço iônico. Este processo controla a entrada e saída de água nas células guarda e consequente movimento estomático (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Além de influenciar o movimento estomático, o ABA promove o crescimento das raízes e inibe o do caule pela supressão da produção de etileno (SHARP, 2002, TAIZ; ZEIGER, 2009, SALÁZAR; HERNÁNDEZ; PINO, 2015). O ABA também pode ser acumulado para induzir o sistema antioxidante, a fim de atenuar os efeitos danosos provocados pela formação das espécies reativas de oxigênio (ERO) durante o estresse hídrico, no entanto, H_2O_2 também interagem no fechamento estomático em resposta ao ABA (HUSSAIN et al., 2011).

O déficit hídrico prolongado induz redução do conteúdo relativo de água no mesofilo, no entanto, as plantas podem ajustar-se osmoticamente com objetivo de retardar a desidratação. À medida que o déficit hídrico torna-se rigoroso a desidratação celular do mesofilo inibe a fotossíntese (ANJUM et al., 2011), porém o ajuste osmótico auxilia a manutenção da abertura estomática e o funcionamento do aparelho fotossintético, permitindo que este opere mesmo em condições de baixo potencial hídrico, até certos limites (TURNER, 1997, ANJUM et al., 2011).

O crescente aumento da desidratação do mesofilo reduz a taxa fotossintética, em plantas sob déficit hídrico, uma vez que o decréscimo de CO_2 afeta o transporte de elétrons nos tilacóides, o ciclo de redução do carbono e o fechamento estomático, fazendo com o que a quantidade de assimilados disponíveis para exportação, como trioses-fosfato do cloroplastídeo para o citosol diminua, e por consequência a síntese de sacarose (ANJUM et al., 2011).

À medida que decresce o conteúdo de água na planta, suas células contraem-se e diminui a pressão de turgidez contra as paredes celulares, este processo concentra solutos nas células e a membrana plasmática torna-se mais espessa e mais comprimida, reduzindo a área foliar em resposta ao déficit hídrico. A área foliar menor irá transpirar menos, fazendo com que haja conservação de água no solo por um período mais longo (TAIZ; ZEIGER, 2009), entretanto essa redução da área foliar acaba afetando diretamente a fotossíntese.

O déficit hídrico aumenta também a senescência e a abscisão foliar (WRIGHT; SMITH; McWILLIAM, 1983), porque o solo com deficiência hídrica não pode fornecer nitrogênio suficiente para suprir as necessidades de crescimento da cultura, havendo necessidade de remobilização de nitrogênio no interior da planta, principalmente das folhas mais velhas para os pontos de crescimento (WOLFE; HENDERSON; HSIAO, 1988).

Visando atenuar os efeitos do déficit hídrico sobre o crescimento das culturas, a busca por cultivares com maior tolerância a esse estresse é de grande valia para uso em áreas onde tais situações ocorrem. No entanto, isso pode ser realizado através de pesquisas que busquem elucidar os possíveis mecanismos chave envolvidos nas respostas ao déficit hídrico, para auxiliar na identificação e seleção de genótipos com tolerância frente a essas condições ambientais (JIMÉNEZ et al., 2013, NAKASHIMA et al., 2014).

Expressão gênica x Déficit hídrico

A expressão gênica pode ser descrita como um conjunto de processos que ocorrem para que um organismo, tecido ou célula, inicie, aumente, diminua ou cesse a elaboração de produtos finais de seus genes, RNAs e/ou proteínas (MARTINS, FILHO, 2010), onde a informação hereditária contida em um gene é processada em um produto gênico funcional, ou seja, a proteína. A transcrição é o início da expressão gênica (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2013).

Ao serem submetidas a estresses bióticos ou abióticos, as plantas iniciam um complexo processo de adaptação, mudanças morfológicas e fisiológicas, incluindo a expressão de genes que podem conferir à elas o caráter de tolerância ou susceptibilidade ao estresse (KRASENSKY, JONAK, 2012). A identificação e o entendimento de como esses eventos são ativados/desativados, e como interagem entre si, é essencial para auxiliar na identificação e/ou desenvolvimento de variedades mais tolerantes. Dessa maneira, genótipos que diferem em tolerância devem apresentar diferenças qualitativas e quantitativas na expressão gênica (NEPOMUCENO; NEUMAIER; FARIAS, 2001, JIMÉNEZ et al., 2013, ARISMENDI et al., 2015).

A tolerância ao déficit hídrico em *Prunus* spp. é uma complexa via que precisa ser melhor elucidada, pois está relacionada à expressão de diversos genes, onde

respostas moleculares e celulares são inúmeras, sendo dependentes de ações conjuntas e da interação de caracteres morfológicos (área reduzida da folha e índice de cera, sistema radicular eficiente), fisiológicos (transpiração reduzida, elevado e eficiente uso de água, fechamento estomático e eficiência fotoquímica) e bioquímicos (acúmulo de solutos como prolina, poliaminas e açúcares, entre outros, aumento da atividade da nitrato redutase e aumento no armazenamento de hidratos de carbono) (MENESES et al., 2006).

Após a percepção do estresse, outros mecanismos também são acionados pela planta, tais como, produção de hormônios e/ou mensageiros secundários que podem dar início à cascata de eventos moleculares (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007).

As respostas fisiológicas das plantas frente ao déficit hídrico são acompanhadas de mudanças na expressão de genes (Figura 1) de três categorias: (i) de percepção e transdução de sinais, (ii) de controle transcricional e (iii) de mecanismos de resposta direta ao estresse (WANG; VICONUR; ALTMAN, 2003). Inúmeros genes induzidos pelo déficit hídrico, e outros tipos de estresses abióticos podem desencadear uma comunicação cruzada (cross-talk) entre as vias de sinalização, gerando a interação de diferentes elementos envolvidos na expressão de genes, podendo levar a interação dos mesmos (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007).



Figura 1. Representação esquemática dos genes envolvidos nas respostas à tolerância ao déficit hídrico. Produtos gênicos são classificados em dois grupos, o primeiro inclui proteínas de provável tolerância ao estresse (proteínas funcionais), o segundo grupo contém fatores protéicos envolvidos na regulação de tradução de sinais e expressão gênica de provável função na resposta ao estresse (proteínas regulatórias) (Adaptado de WANG; VICONUR; ALTMAN, 2003).

Os padrões de regulação da expressão dos genes induzidos durante o déficit hídrico são complexos, sendo que alguns genes respondem à esse estresse rapidamente, enquanto outros são lentamente induzidos ou reprimidos (HU, 2002). Genes de resposta rápida (*early-response genes*) são induzidos em minutos, enquanto que genes de resposta tardia (*delayed-response genes*) são ativados mais lentamente (em horas) e apresentam expressão prolongada. Esses genes de resposta rápida, geralmente são fatores de transcrição que, posteriormente, ativam os genes de resposta tardia que, por sua vez, constituem a maioria dos genes responsivos ao estresse, sugerindo a existência de várias vias de resposta que parecem distintas, mas que envolvem uma complexa rede de sinais regulatórios (ZHU, 2002).

Por participarem de etapas iniciais do processo de percepção e sinalização, os fatores de transcrição (TFs) são responsivos a sinais ambientais e, assim, regulam a expressão/repressão de vários grupos de genes envolvidos em estresses. Vários TFs têm sido associados à tolerância ao déficit hídrico em plantas, tais como DREB, ERF, bZIP, MYB, MYC, NAC, WRKY (JIN et al., 2014, SHIRIGA et al., 2014, BIANCHI et al., 2015, YAO et al., 2015).

Muitas estratégias têm sido utilizadas para isolar e identificar genes que estão envolvidos na resposta ao estresse hídrico, porém o maior desafio é integrar a função biológica desses genes e gerar uma compreensão global sobre o processo de sinalização do estresse (BOHNERT et al., 2006, VALLIYODAN; NGUYEN, 2006).

Com os avanços nas técnicas de sequenciamento de ácidos nucleicos, aumentou grandemente a possibilidade de identificar e caracterizar sequências gênicas associadas a características de importância agrônômica, devido ao grande interesse em se analisar a atividade e a interação transcricional em larga escala em diferentes espécies de plantas (MEYERS et al., 2004). Desse modo, nos últimos anos várias técnicas vêm sendo desenvolvidas para permitir a análise global e/ou pontual da expressão gênica mediante estresse. A capacidade de medir simultaneamente a expressão de milhares de genes depende de sistemas analíticos poderosos, e a disponibilidade de novas tecnologias para esse fim tem fornecido muitas novas estratégias de estudo da resposta gênica (MITRA et al., 2003).

A técnica de RT-qPCR é precisa para quantificar níveis de expressão de um determinado gene, oferecendo rapidez e reprodutibilidade (MALLONA et al., 2010).

O RT-qPCR é baseado no processo da transcrição reversa (RT) seguida da Reação em Cadeia da DNA-polimerase (PCR), com a incorporação de moléculas fluorescentes, os sinais de fluorescência são gerados por fluoróforos que são específicos para a fita dupla de DNA ou por *primers* marcados por fluorescência em regiões específicas (KLEIN et al., 2002). O sinal é proporcional à quantidade de produto de PCR e o equipamento detecta o acúmulo do produto amplificado durante cada ciclo da reação (BUSTIN, 2002). Os dados são então, medidos na fase exponencial da reação de PCR.

Por meio do conhecimento das alterações moleculares de respostas ao estresse hídrico, modificações genéticas de tolerância a estes estresses têm apresentado resultados promissores que podem ser aplicados na agricultura (JIMÉNEZ et al., 2013).

No entanto, considerando a importância da cultura do pessegueiro no âmbito brasileiro e no Estado do RS, estudos relacionados a estresses abióticos, tais como déficit hídrico e/ou alagamento, poderão auxiliar os programas de melhoramento para identificação e seleção de genótipos mais tolerantes, bem como, fornecer tais informações aos pesquisadores e produtores envolvidos no setor produtivo de frutas de caroço no Brasil. Portanto, caracterizar respostas diferenciais a nível fisiológico e molecular em plantas do gênero *Prunus* sp., enxertadas sobre diferentes portaenxertos submetidas ao déficit hídrico, poderá auxiliar na escolha de genótipos mais tolerantes à restrição hídrica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANJUM, S. A.; XIE, X. Y.; WANG, L. C.; SALEEM, M. F.; MAN, C.; LEI, W. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. **African Journal of Agricultural Research**, v. 6, p. 2026-2032, 2011.

ARISMENDI, M. J.; ALMADA, A.; PIMENTEL, P.; BASTIAS, A.; SALVATIERRA, A.; ROJAS, P.; HINRICHSEN, P.; PINTO, M.; DI GENOVA, A.; TRAVISANY, D.; MAASS, A.; SAGREDO, B. Transcriptome sequencing of *Prunus* sp. rootstocks roots to identify candidate genes involved in the response to root hypoxia. **Tree Genetics & Genomes**, v. 11, p.1-16, 2015.

BIANCHI, V. J.; RUBIO, M.; TRAINOTTI, L.; VERDE, V.; BONGHI, C.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, P. *Prunus* transcription factors: breeding perspectives. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1-20, 2015.

BOHNERT, H. J.; GONG, Q.; LI, P.; MA, S. Unraveling abiotic stress tolerance mechanisms – getting genomics going. **Current Opinion Plant Biology**, v. 9, p. 180-188, 2006.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using realtime reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 29, p. 23-39, 2002.

CHAVES, M. M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA, J. S. Understanding plant response to drought-from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, v. 30, p. 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**, v. 103, p. 551-560, 2009.

CUNHA, N. G.; SILVEIRA, R. J. C. **Estudo dos solos do município de Pelotas - Pelotas: EMBRAPA/CPACT**, Ed. UFPel, 1996. 50p.: il. (Documentos CPACT; 12/96). 1. Geomorfologia - Pelotas. 2. Solos-Pelotas.

FACHINELLO, J. C.; SILVA, C. A. P.; SPERANDIO, C.; RODRIGUES, A. C.; STRELOW, E. Z. Resistência de porta-enxertos para pessegueiro e ameixeira aos

nematóides causadores de galhas (*Meloidogyne* spp.). **Ciência Rural**, v. 30, p. 1-6, 2000.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations Agricultural statistics. **Banco de dados**. Acesso em 15 de julho de 2015. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>

FISCHLIN, A.; MIDGLEY, G. F.; PRICE, J. T.; LEEMANS, R.; GOPAL, B.; TURLEY, C. Ecosystems, their properties, goods and services. **Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**, PARRY, M. L.; CANZIANI, O. F.; PALUTIKOF, J. P.; VAN DER LINDEN, P. J.; HANSON, C. E. Cambridge University Press, Cambridge; 211-72, 2007.

GALARÇA, S. P.; FACHINELLO, J. C.; BETEMPS, D. L.; MACHADO, N. P.; HAAS, L. B.; PREZOTTO, M. E.; COMIOTTO, A. Produção e qualidade de frutos de pessegueiros 'Chimarrita' e 'Maciel' sobre diferentes portaenxertos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p. 1731-1736, 2012.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation: principles and practices**. New Jersey: Prentice Hall, 2002, n.7, 880p.

HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C.; BERNARDI, J. **Sistema de produção de pêssego de mesa na região da serra gaúcha**. Pelotas, Versão Eletrônica, 2003.

HU, J. K. Drought and salt stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 247-273, 2002.

HUSSAIN, S. S.; ALI, M.; AHMAD, M.; SIDDIQUE, K. H. Polyamines: natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. **Biotechnology**, v. 29, p. 300-311, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Banco de Dados**. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp?t=2&z=t&o=11&u1=34&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u2=34>. Acesso em 15 de julho de 2015.

JIMÉNEZ, S.; DRIDI, J.; GUTIÉRREZ, D.; MORET, D.; IRIGOYEN, J. J.; MORENO, M. A.; GOGORCENA, Y. Physiological, biochemical and molecular responses in

four *Prunus* rootstocks submitted to drought stress. **Tree Physiology**, v. 33, p. 1061-1075, 2013.

JIN, J.P.; ZHANG, H.; KONG, L.; GAO, G.; LUO, J. C. Plant TFDB 3.0: a portal for the functional and evolutionary study of plant transcription factors. **Nucleic Acids Research**, v.v42, p. 1182-1187, 2014.

KRASENSKY, J.; JONAK, C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. **Journal Experimental Botany**. v. 63, p. 1593-1608, 2012.

KLEIN, C. A.; SEIDL, S.; PETAT-DUTTER, K.; OFFNER, S.; GEIGL, J. B.; SCHMIDTKITTLER, O.; ENDLER, N.; PASSLICK, B.; HUBER, R. M.; SCHLIMOK, G.; BAEUERLE, P. A.; RIETHMULLER, G. Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells. **Nature Biotechnology**, v. 20, p. 387-392, 2002.

LEUNG, J.; GIRAUDAT, J. Abscisic acid signal transduction. **Annual Review Plant Physiology, Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 199-222, 1998.

LORETI, F. Porta-enxertos para a cultura do pessegueiro do terceiro milênio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, p. 274-284, 2008.

MALLONA, I.; LISCHEWSKI, S.; WEISS, J.; HAUSE, B.; EGEEA-CORTINES, M. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida*. **BMC Plant Biology**, v. 104, p. 1-11, 2010.

MARTINAZZO, E. G.; PERBONI, A. T.; OLIVEIRA, P. V.; BIANCHI, V. J.; BACARIN, M. A. Atividade fotossintética em plantas de ameixeira submetidas ao déficit hídrico e ao alagamento. **Ciência Rural**, v. 43, p. 35-41, 2013.

MARTINS, E. A. C.; FILHO, P. R. M. Mecanismos de expressão gênica em eucariotos: **Revista da Biologia**, v. 4, p. 1-5, 2010.

MAYER, N. A.; BIANCHI, V. J.; CASTRO, L. A. S. **Pessegueiro: Portaenxertos**. 1ª ed. Brasília, DF: Embrapa, 2014, 776p.

MENESES, C. H. S.; LIMA, L. H. G. M.; LIMA, M. M. A.; VIDAL, M. S. Aspectos genéticos e moleculares de plantas submetidas ao déficit hídrico. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 10, p. 1039-1072, 2006.

MEYERS, B. C.; GALBRAITH, D. W.; NELSON, T.; AGRAWAL, V. Methods for Transcriptional Profiling in Plants. Be Fruitful and Replicate. **Plant Physiology**, v. 135, p. 637-652, 2004.

MITRA, R. D.; SHENDURE, J.; OLEJNIK, J.; EDYTA, K. O.; CHURCH, G. M. Fluorescent in situ sequencing on polymerase colonies. **Annals of Biochemistry**, v. 320, p. 55-65, 2003.

NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 1-7, 2014.

NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER N.; FARIAS, J. R. B. Tolerância à seca em plantas: Mecanismos fisiológicos e moleculares. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 23, p. 12-18, 2001.

PICOLOTTO, L.; BERTO, R. M.; PAZZIN, D.; PASA, M. S.; SCHIMITZ, J. D.; PREZOTTO, M. E.; BETEMPS, D.; BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C. Características vegetativas, fenológicas e produtivas do pessegueiro cultivar Chimarrita enxertado em diferentes porta enxertos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 583-589, 2009.

PICOLOTTO L.; SCHMITZ, J. D.; PASA, M. S.; BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C. Desenvolvimento vegetativo e produtivo da cultivar 'Maciel' em diferentes portaenxertos. **Ciência Rural**, v. 42, p. 969-974, 2012.

POTTERS, G.T. P.; PASTERNAK, Y.; GUISEZ, K. J.; PALME, Y. M. A. K. Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? **Trends Plant Science**, v. 12, p. 99-105, 2007.

RASEIRA, M. C. B.; NAKASU, B. H.; BARBOSA, W. **Pessegueiro: Cultivares** Descrição e recomendação. 1ª ed. Brasília, DF: Embrapa, 2014, 776p.

RATO, A. E.; AGULHEIRO, A. C.; BARROSO, J. M.; RIQUELME, F. Soil and rootstock influence on fruit quality of plums (*Prunus domestica* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 118, p. 218-222, 2008.

REHDER, A. Manual of cultivated trees and shrubs hardy in North America, 2^a edition. **Macmillan Company New York**. p. 425-481, 1940.

RIPOLL, J.; URBAN, L.; STAUDT, M.; LOPEZ-LAURI, F.; BIDEL, L. P. R.; BERTIN, N. Water shortage and quality of fleshy fruits-making the most of the unavoidable. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, p. 2-21, 2014.

ROCHA, M. D. S.; BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C.; SCHMITZ, J. D.; PASA, M. S.; SILVA, J. B. Comportamento agrônômico inicial da cv. Chimarrita enxertada em cinco portaenxertos de pessegueiro. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 29, p. 583-588, 2007.

RODRIGUES, A. C.; FACHINELLO, J. C.; SILVA, J. B.; FORTES, G. L.; STRELOW, E. Compatibilidade entre diferentes combinações de cvs. copas e portaenxertos de *Prunus* sp. **Revista Brasileira Agrociência**, v. 10, p. 185-189, 2004.

ROSSI, A.; FACHINELLO, J. C.; RUFATO, L.; PARISOTTO, E.; PICOLOTTO, L.; KRUGER, L. R. Comportamento do pessegueiro 'Granada' sobre diferentes portaenxertos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, p. 446-449, 2004.

ROUHI, V.; SAMSON, R.; LEMEURE, R.; Van DAMME, P. Photosynthetic gas exchange characteristics in three different almond species during drought stress and subsequent recovery. **Environmental Experimental Botany**, v. 59, p. 117-129, 2007.

SALAZAR, C.; HERNÁNDEZ, C.; PINO, M. T. Plant water stress: Associations between ethylene and abscisic acid response. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 75, p. 71-79, 2015.

SCHMITZ, J. D.; BIANCHI, V. J.; PASA, M. S. P.; SOUZA, A. L. K.; FACHINELLO, J. C. Vigor e produtividade do pessegueiro 'Chimarrita' sobre diferentes portaenxertos. **Revista Brasileira Agrociência**, v. 18, p. 1-10, 2012.

SHAO, H. B.; CHU, C. A.; JALEEL, Y.; ZHAO, C. X. Water-deficit stress induced anatomical changes in higher plants. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, p. 215-225, 2008.

SHARP, R. E. Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. **Plant, cell and Environment**, v. 25, p. 211-222, 2002.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 221-227, 2007.

SHIRIGA, K.; SHARMA, R.; KUMAR, K.; YADAV, S. K.; HOSSAIN, F.; THIRUNAVUKKARASU, N. Genome-wide identification and expression pattern of drought-responsive members of the NAC family in maize. **Meta Gene**, v. 2, p. 407-417, 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 918p.

TERRA, V. S. S.; VALGAS, R. A.; JÚNIOR, C. R.; TIMM, L. C.; PEREIRA, J. F. M.; CARVALHO, F. L. C.; OLDONI, H. Multivariate analysis applied to the study of the relationship between soil and plant properties in a peach orchard. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, p. 755-764, 2014.

TIMM, LUÍS CARLOS et al. **Manejo da Irrigação na Cultura do Pessegueiro**: manual técnico. Pelotas: Ed. da Universidade Federal de Pelotas, 2007a, 110p.

TIMM, L. C.; JUNIOR, C. R.; TAVARES, V. E. Q.; MADAIL, J. C. M.; MANKE, G.; LEMOS, F. D.; TAVARES, L. C.; RADUNZ, A. L.; LISBOA, H.; PRESTES, R. B.; MORO, M. Caracterização dos persicultores irrigantes e dos métodos de irrigação no pólo produtivo de pêsego da região de Pelotas. **Revista Brasileira Agrociência**, v. 13, p. 413-417, 2007b.

TURNER, N. C. Further progress in crop water relations. In *Advances in agronomy* (D.L. Sparks, ed.). **Academic Press**, p. 293-337, 1997.

VALLIYODAN, B.; NGUYEN, H. T. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 189-195, 2006.

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

WOLFE, D. W.; HENDERSON, D. W.; HSIAO, T. C. Interactive water and nitrogen effects on senescence of maize: I. Leaf area duration, nitrogen distribution, and yield. **Agronomy Journal**, v. 80, p. 859-864, 1988.

WRIGHT, G. C.; SMITH, R. G.; McWILLIAM, J. R. Differences between two grain sorghum genotypes in adaptation to drought stress. I. Crop growth rate and yield response. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 34, p. 615-626, 1983.

YAO, Q. Y.; XIA, E. H.; LIU, F. H.; GAO, L. Z. Genome-wide identification and comparative expression analysis reveal a rapid expansion and functional divergence of duplicated genes in the WRKY gene family of cabbage, *Brassica oleracea* var. capitata. **Gene**, v. 557, p. 35-42, 2015.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. **Biologia Molecular Básica**. 4th ed. Porto Alegre: Artmed, 2013, 416p.

ZHANG, S. Q.; OUTLAW, Y. W. H. Abscisic acid introduced into the transpiration stream accumulates in the guard cell apoplast and causes stomatal closure. **Plant Cell Environment**, v. 24, p. 1045-1054, 2001.

ZHU, J. K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review Plant Biology**, v. 53, p. 247-273, 2002.

CAPÍTULO 1

Déficit hídrico afeta as trocas gasosas em plantas de pessegueiro cultivar Chimarrita enxertada sobre diferentes portaenxertos

INTRODUÇÃO

Dentre as principais espécies de interesse agronômico do gênero *Prunus*, o pessegueiro é considerado a mais importante para a economia mundial. No Estado do Rio Grande do Sul (RS), o cultivo de pêssegos é uma das atividades agrícolas que mais se destacam nos últimos anos, sendo o Estado responsável por uma produção de aproximadamente 137 mil toneladas, com cerca de 60% da produção nacional desta fruta (IBGE, 2015). No RS, o principal pólo de produção é a metade sul do Estado, onde a persicultura é realizada principalmente em pequenas propriedades de agricultura familiar, constituindo uma excelente alternativa para fixar mão de obra no campo, gerando renda e emprego (TERRA et al., 2014).

Todavia, essa região caracteriza-se por apresentar extensas áreas de solos pouco permeáveis, pouco profundos e com problemas de drenagem (CUNHA; SILVEIRA, 1996). Ao longo dos anos é comum ocorrer períodos de estiagem, durante o ciclo vegetativo do pessegueiro, provocando déficit hídrico no solo, influenciando o crescimento da planta e na produtividade.

Considerando que a fase de pré-colheita e colheita dos frutos na região Sul do RS dá-se, principalmente, entre os meses de novembro a janeiro, esse período coincide com a maior escassez de recursos hídricos na maioria dos anos, devido à menor precipitação (TIMM et al., 2007a,b). Além do mais, a alta irradiância e as altas temperaturas acabam afetando negativamente a qualidade e a produtividade dos pomares, uma vez que o número de produtores que fazem uso de algum sistema de irrigação ainda é limitado (TIMM et al., 2007b).

Herter et al. (2003) destacam a importância do uso da irrigação nos períodos de déficit hídrico prolongados, no sentido de fornecer à cultura um adequado suprimento de água para que se obtenha frutos de qualidade e com menores riscos de prejuízos.

O estresse por déficit hídrico afeta a produtividade de muitas culturas, com um impacto negativo e bastante significativo para o crescimento e desenvolvimento das plantas em todo o mundo (CATTIVELLI et al., 2008). O déficit hídrico provoca alterações no comportamento vegetal, sendo que a irreversibilidade dos efeitos negativos do estresse vai depender do genótipo, da duração, da intensidade e do estágio de desenvolvimento da planta, além das diversas interações solo-planta-atmosfera e de outras condições climáticas (SHAO et al., 2008).

A restrição hídrica afeta diretamente o metabolismo das plantas, pois na medida em que o solo seca, torna-se mais difícil a absorção de água do solo devido à sua menor disponibilidade, pelo aumento da força de retenção aos colóides do solo (BERGAMASCHI, 1992). O déficit hídrico pode induzir respostas em todos os níveis de organização celular, porém em nível fisiológico afeta principalmente os processos que envolvem as trocas gasosas, a condutância estomática, transpiração, potencial hídrico, osmótico e da área foliar, aceleração da senescência e a abscisão foliar (ANJUM et al., 2011, JIMÉNEZ et al., 2013).

O fechamento estomático é o principal mecanismo para controlar as trocas gasosas sob estresse hídrico, levando à diminuição na taxa fotossintética líquida, na respiração, na absorção de íons, no metabolismo dos nutrientes, entre outros (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009). Devido à menor capacidade fotossintética em condições de déficit hídrico, menor intensidade luminosa é utilizada no processo fotossintético, sendo assim, as plantas não podem utilizar toda a energia luminosa para a produção de ATP e NADPH₂, acarretando na fotoinibição (OUKARROUM et al., 2007, MARTINAZZO et al., 2013).

A diminuição na condutância estomática leva a uma diminuição na concentração intercelular de CO₂ (C_i) e na transpiração. Sendo que a C_i é um parâmetro que demonstra a disponibilidade de dióxido de carbono para o processo fotossintético, onde a redução deste parâmetro, pode indicar a ocorrência de limitação estomática (CHAVES et al., 2009), de forma que a resistência estomática e do mesófilo reduzam a concentração de CO₂ que pode afetar os cloroplastos. Martinazzo et al. (2013), verificaram redução nas taxas de assimilação de CO₂ em plantas de ameixeira expostas ao déficit hídrico, sendo que esta diminuição foi dependente do fechamento estomático, que diminuiu a C_i e restringiu a perda de água através da transpiração.

O déficit hídrico pode afetar também a utilização e conteúdo de fotoassimilados, no qual está relacionado à menor assimilação de CO₂ e a mobilização de reservas para o crescimento e a manutenção das plantas sob estresse. O crescimento das raízes em plantas sob deficiência hídrica mediante baixa atividade fotossintética pode ocorrer devido ao direcionamento preferencial dos fotoassimilados recém-produzidos para as raízes, e também através da mobilização de reservas de outros órgãos para as raízes (FILHO et al., 2008).

Devido às condições climáticas da região Sul do RS, pode-se considerar que existe um período crítico de deficiência hídrica para a cultura do pessegueiro, na grande maioria dos anos, contribuindo para a redução da produtividade de forma significativa.

Uma das fases importantes em relação à disponibilidade de água é no período de saída de dormência, que coincide com a polinização das flores e a frutificação efetiva. Nessa fase, a falta de água pode contribuir para aumento do abortamento floral ou limitar a taxa de divisão celular dos frutos. Na fase de rápido crescimento dos frutos, mas principalmente duas a três semanas antes da maturação dos frutos, o adequado suprimento de água contribui significativamente para o aumento no tamanho dos frutos. A terceira fase importante é após a colheita, quando a planta armazena energia para o próximo ciclo produtivo. Neste período, a planta necessita absorver nutrientes do solo e continuar com boa produção de fotoassimilados, que servirão de reservas para suportar a brotação e o florescimento na próxima estação de crescimento, e a disponibilidade de água é fator fundamental para isto (TIMM et al., 2007a).

A busca por portaenxertos que apresentem níveis diferenciais de tolerância ao déficit hídrico é fundamental para reduzir perdas na produtividade e na qualidade de frutos de pessegueiro (JIMÉNEZ et al., 2008; MORENO; GOGORCENA; PINOCHET, 2008, JIMÉNEZ et al., 2013). As diferenças na capacidade do sistema radicular dos portaenxertos em absorver água, podem ser responsáveis pelas variações no grau de tolerância à seca da cultivar copa (CARBONNEAU, 1985). Tal capacidade pode conferir tolerância ao déficit hídrico, o qual tem sido demonstrado em outras plantas lenhosas, tais como videira (IACONO; BUCCELLA; PETERLUNGER, 1998, SOUZA; SOARES; ALBUQUERQUE, 2001), cerejeira

(GONÇALVES, 2003), amendoeira (ROUHI et al., 2007), macieira (WANG et al., 2012) e citros (SUASSUNA et al., 2014).

Somado a isso, o estudo sobre os processos envolvidos nas respostas fisiológicas e bioquímicas em pessegueiros submetidos ao déficit hídrico, através do uso de ferramentas de análise do aparato fotossintético das plantas, podem fornecer uma melhor compreensão e facilitar os procedimentos de triagem para a seleção de portaenxertos mais tolerantes (JIMÉNEZ et al., 2013). Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do déficit hídrico sobre os parâmetros de trocas gasosas da cultivar copa Chimarrita enxertada sobre cinco diferentes portaenxertos de *Prunus persica*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas no presente trabalho, plantas de pessegueiro da cultivar copa Chimarrita com três anos de idade, enxertada sobre cinco portaenxertos de *Prunus persica* (Tsukuba 1, Tsukuba 2, Tsukuba 3, Aldrighi 1 e Seleção UFPel 0402). As plantas foram desplantadas do viveiro, no segundo ano após a enxertia e transplantadas para vasos de polietileno com capacidade de 25 litros, contendo como substrato terra do próprio viveiro, classificado como Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico (STRECK et al., 2008).

Após completarem um ano e quatro meses de crescimento nos vasos, as mesmas foram utilizadas para o experimento, que foi conduzido em casa de vegetação, durante o mês de dezembro de 2013, no Campus Capão do Leão, da Universidade Federal de Pelotas.

As plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos: (i) estresse por déficit hídrico, que consistiu na suspensão total da irrigação, a partir do início do experimento (19/12/2013), e (ii) plantas irrigadas com 5 litros de água diariamente para cada vaso/combinção, mantendo a capacidade de campo (controle). Plantas do tratamento por déficit hídrico foram mantidas sob as condições de estresse por seis dias, após, foram submetidas às condições normais de irrigação, por três dias (caracterizando o período de recuperação).

Foram avaliados os parâmetros de trocas gasosas, nos dias: zero, um, dois, três, quatro e seis dias de estresse, sendo o sétimo e nono dias, período de recuperação. As avaliações foram medidas em folhas maduras, completamente

expandidas, localizadas no terço médio de cada ramo, utilizando-se um analisador portátil a infravermelho de CO₂ (modelo LI-6400XT LI-COR, Inc., Lincoln, NE, USA). As leituras foram realizadas em duas folhas por planta, localizadas em ramos diferentes, no período da manhã entre 9:00 e 11:00h, com concentração de CO₂ na câmara de 380 µmol mol⁻¹ e densidade de fluxo de fótons de 1.200 µmol m⁻² s⁻¹, utilizando-se a fonte luminosa LI-COR 6400-02, acoplada à câmara de medida (LI-COR, Inc., Lincoln, NE, USA LI-COR 6400-11).

Durante o experimento foram avaliadas a taxa assimilatória líquida de CO₂ (*A*, µmol CO₂ m⁻² s⁻¹), condutância estomática (*g_s*, mol H₂O m⁻² s⁻¹), concentração intercelular de CO₂ (*C_i*, µmol CO₂ mol⁻¹) e a taxa de transpiração (*E*, mmol H₂O m⁻² s⁻¹), em cada combinação 'Chimarrita'/portaenxerto.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento em esquema fatorial 2 x 8, sendo duas condições hídricas (controle e déficit hídrico) e oito avaliações (0, 1^o, 2^o, 3^o, 4^o, 6^o, 7^o e 9^o). Cada combinação da cultivar Chimarrita com os diferentes portaenxertos foram avaliados individualmente. Os resultados foram submetidos à análise de variância (*p*≤0,05), sendo utilizado o teste de Tukey para comparação de médias entre os tratamentos de cada dia de estresse de cada cultivar, através do Sistema de Análise Estatística - WinStat – Versão 2.0 (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa fotossintética líquida nas plantas controle da cultivar Chimarrita, sobre os diferentes portaenxertos, variaram entre 7,9, e 14,5 µmol CO₂ m⁻² s⁻¹, apresentando valores maiores no início do experimento, com decréscimo até o final do mesmo (Figuras 1A, 2A, 3A, 4A e 5A). Entretanto, os valores registrados ficaram dentro de uma faixa condizente ao descrito em diferentes espécies de *Prunus*, a exemplo dos trabalhos de Romero et al. (2004), que relataram uma assimilação de até 14 µmol CO₂ m⁻² s⁻¹ em plantas adultas de *Prunus dulcis*, mantidas a campo na Espanha. De Herralde; Biel; Savé (2003) registraram valores entre 14,8 e 20,3 µmol CO₂ m⁻² s⁻¹ em plantas de amendoeira (*P. amygdalus*) e Rieger; Bianco; Okie (2003), valores superiores a 10 µmol CO₂ m⁻² s⁻¹, em *Prunus persica*. Em portaenxertos do

híbrido 'GxN-9' ou 'Monegro' (*P. dulcis* × *P. persica*), Martinazzo et al. (2011), relataram valores de até 12,6 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Sob condição de déficit hídrico, as plantas da cultivar Chimarrita, apresentaram um decréscimo similar para os valores de A e g_s , até o sexto dia de estresse, independente do portaenxerto. No primeiro e segundo dias após o início do déficit hídrico, as combinações 'Chimarrita'/portaenxertos comportaram-se de maneira semelhante aos seus controles, com exceção das plantas de 'Chimarrita' enxertadas sobre 'Tsukuba 3' (Figura 3A e B) e 'Aldrighi 1' (Figura 4A e B) que apresentaram uma redução menos pronunciada nos valores de A e g_s no segundo dia de déficit hídrico (variando de 10,15 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 0,25 $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e 11,95 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 0,28 $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente), sendo tais valores superiores às demais combinações de enxertia.

As reduções mais marcantes dos valores de A e g_s nas plantas sob efeito do déficit hídrico ocorreram a partir do terceiro dia, atingindo valores mínimos no quarto e sexto dias. O contrário foi observado por Messchmidt et al. (2015), em plantas da cv. Mirabolano 29-C sob condições de déficit hídrico, valores de A e g_s , 47% e 84% respectivamente, menores do que as plantas controle, no primeiro dia de avaliação, atingindo valores próximos a zero no oitavo dia.

Nas plantas do tratamento controle de 'Chimarrita' enxertada sobre 'Seleção UFPel 0402' (Figura 5A e B), verificou-se os menores valores de A e g_s ao longo de todo o período de avaliação. Além disso, no segundo dia de restrição hídrica, foi a combinação que registrou as menores médias para esses parâmetros analisados (A 9,36 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, g_s 0,25 $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, controle; e A 5,44 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, g_s 0,12 $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, déficit hídrico), o qual leva a sugerir que este portaenxerto induz menor tolerância a tal estresse, comparado principalmente, às respostas induzidas por 'Tsukuba 3' e 'Aldrighi 1'. A 'Seleção UFPel 0402' apresenta o menor vigor em relação aos demais portaenxertos avaliados (dados não apresentados), o qual pode ser um dos fatores associados à indução dos menores valores de A e g_s na cultivar Chimarrita.

Para as diferentes combinações 'Chimarrita'/portaenxertos, tanto para A como para g_s , no período de recuperação de 72h, as plantas alcançaram valores muito semelhantes aos seus respectivos controles, com exceção para os dados de A da combinação 'Chimarrita/Tsukuba 1', que apresentou uma taxa fotossintética 25%

menor em relação ao controle. Porém, as combinações 'Chimarrita/Tsukuba 3' (Figura 3A e B) e 'Chimarrita/Seleção UFPel 0402' (Figura 5A e B) apresentaram uma tendência de recuperação mais rápida do que as demais, ambas com maiores valores de A e g_s no período de 24h de recuperação.

Em plantas de *Prunus* spp., Messchmidt et al. (2015) verificaram que o déficit hídrico causou uma redução de 43% nos valores de A aos oito dias de estresse, quando comparado aos valores das plantas controle. Quando submetidas à recuperação, a A das plantas anteriormente expostas ao déficit hídrico alcançou valores similares ao controle três dias após a reposição da água no solo, corroborando os dados do presente estudo. De acordo com Torrecillas et al. (1996), a rápida recuperação após uma condição de estresse pode estar relacionada a uma maior tolerância ao déficit hídrico, entretanto, tal efeito deverá ser melhor investigado no caso da 'Seleção UFPel 0402', em função dos padrões mais baixos de A e g_s induzidos na cultivar copa.

Assim como observado neste presente estudo, Rouhi et al. (2007) constataram o mesmo comportamento em plantas de *Prunus scoparia* e *Prunus lycioides*, onde a g_s apresentou uma tendência a diminuir sob déficit hídrico mais intenso com indução por PEG 6000, mas esta diminuição na g_s não refletiu em um aumento no uso eficiente da água, evidenciando que não houve uma limitação estomática.

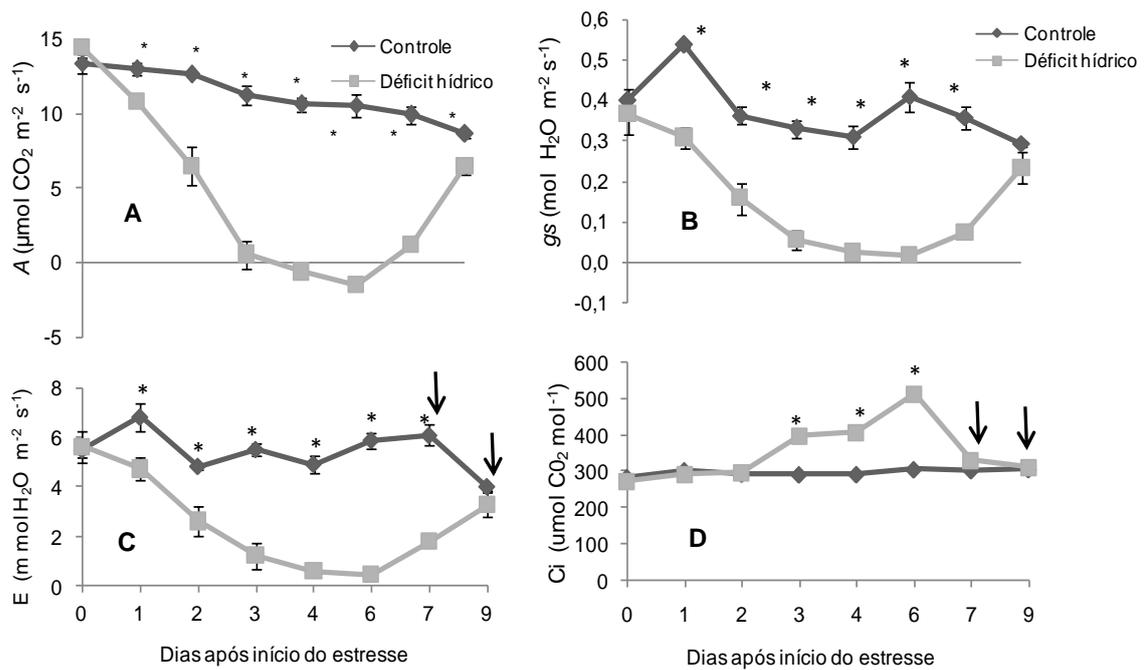


Figura 1. Taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E) e concentração intercelular de CO_2 (Ci) de plantas de pessegueiro cultivar copa ‘Chimarrita’ enxertada sobre o portaenxerto ‘Tsukuba 1’, submetidas ao déficit hídrico por seis dias. Setas indicam período de recuperação (7=24h e 9=72h respectivamente). Médias comparadas dentro de cada dia, sendo que os asteriscos indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($n = 4$). Barra indica erro padrão da média.

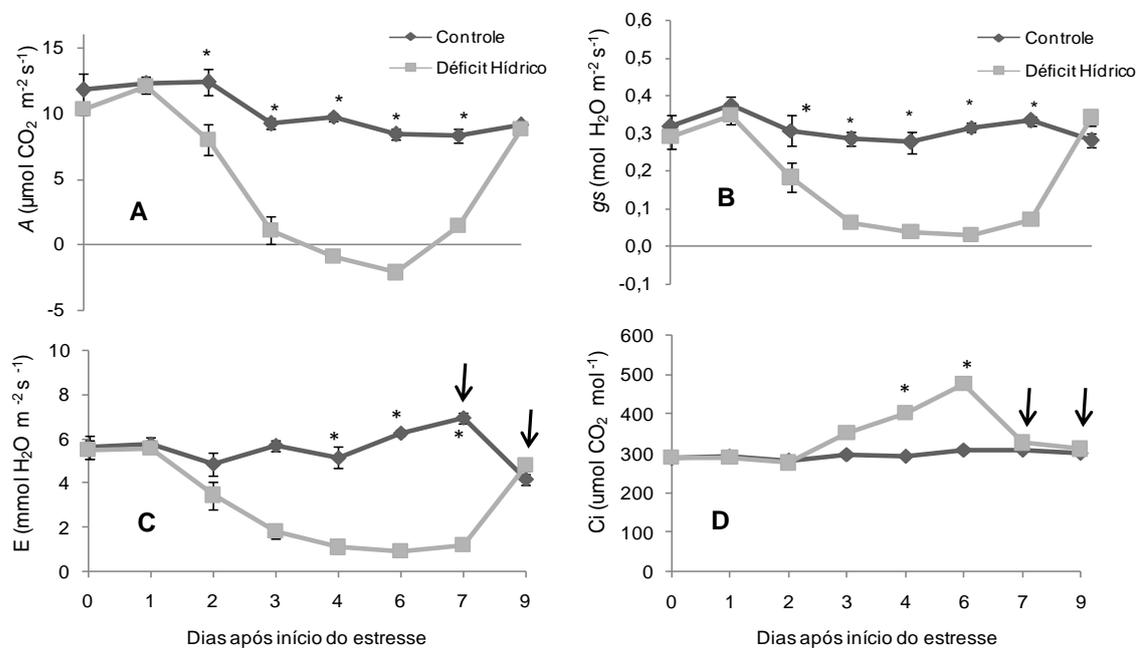


Figura 2. Taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E) e concentração intercelular de CO_2 (Ci) de plantas de pessegueiro cultivar copa ‘Chimarrita’ enxertada sobre o portaenxerto ‘Tsukuba 2’, submetidas ao déficit hídrico por seis dias. Setas indicam período de recuperação (7=24h e 9=72h respectivamente). Médias comparadas dentro de cada dia, sendo que os asteriscos indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($n = 4$). Barra indica erro padrão da média.

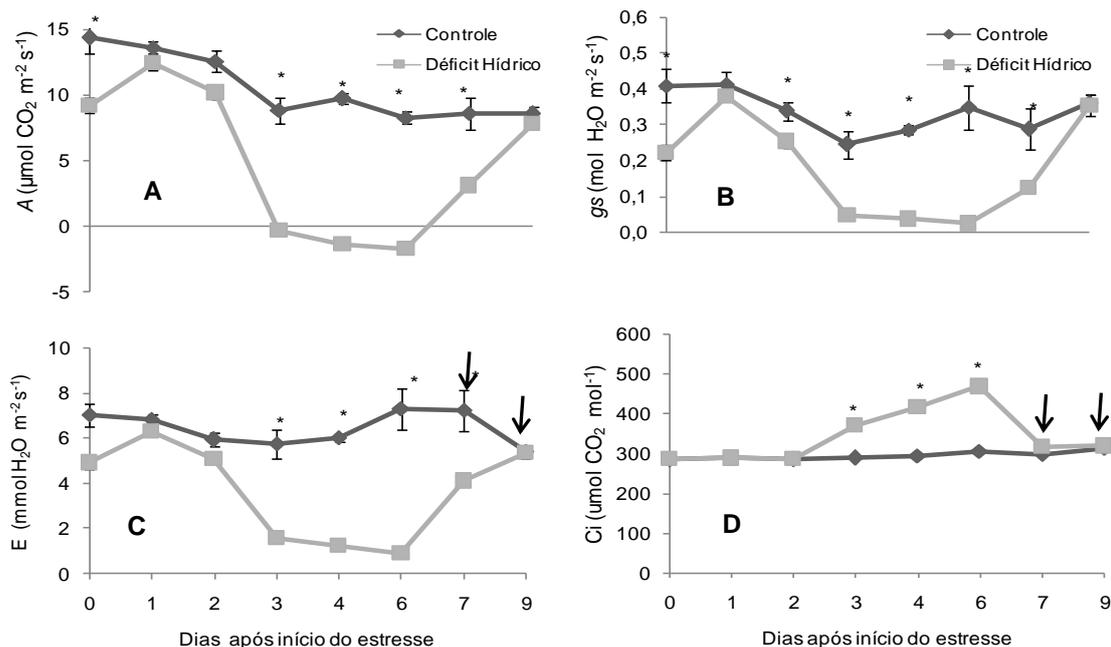


Figura 3. Taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E) e concentração intercelular de CO_2 (C_i) de plantas de pessegueiro cultivar copa ‘Chimarrita’ enxertada sobre o portaenxerto ‘Tsukuba 3’, submetidas ao déficit hídrico por seis dias. Setas indicam período de recuperação (7=24h e 9=72h respectivamente). Médias comparadas dentro de cada dia, sendo que os asteriscos indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($n = 4$). Barra indica erro padrão da média.

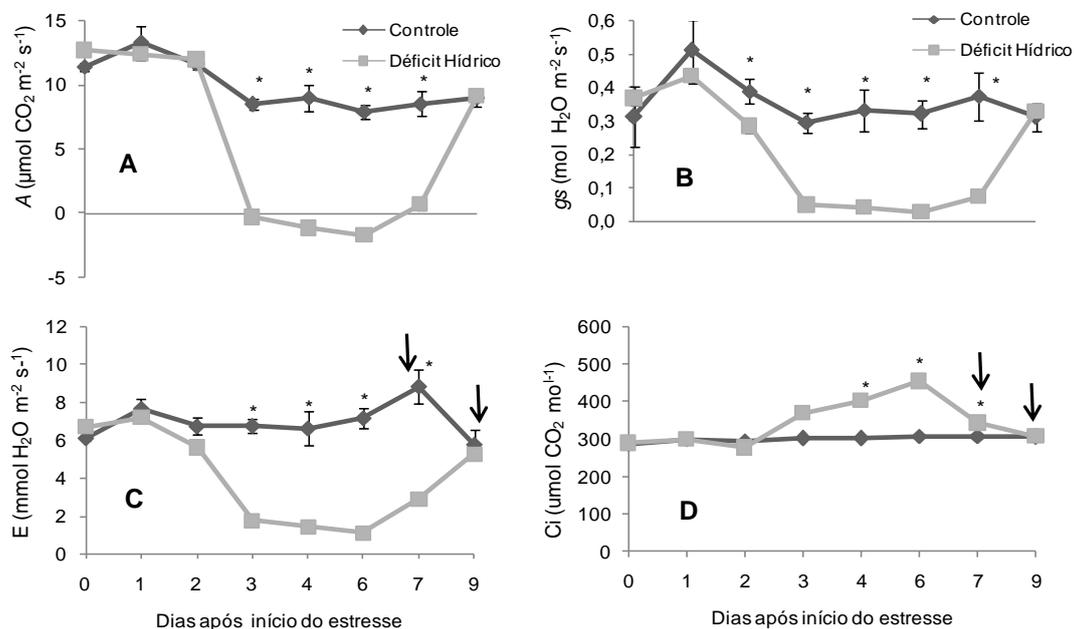


Figura 4. Taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E) e concentração intercelular de CO_2 (C_i) de plantas de pessegueiro cultivar copa ‘Chimarrita’ enxertada sobre o portaenxerto ‘Aldrichi 1’, submetidas ao déficit hídrico por seis dias. Setas indicam período de recuperação (7=24h e 9=72h respectivamente). Médias comparadas dentro de cada dia, sendo que os asteriscos indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($n = 4$). Barra indica erro padrão da média.

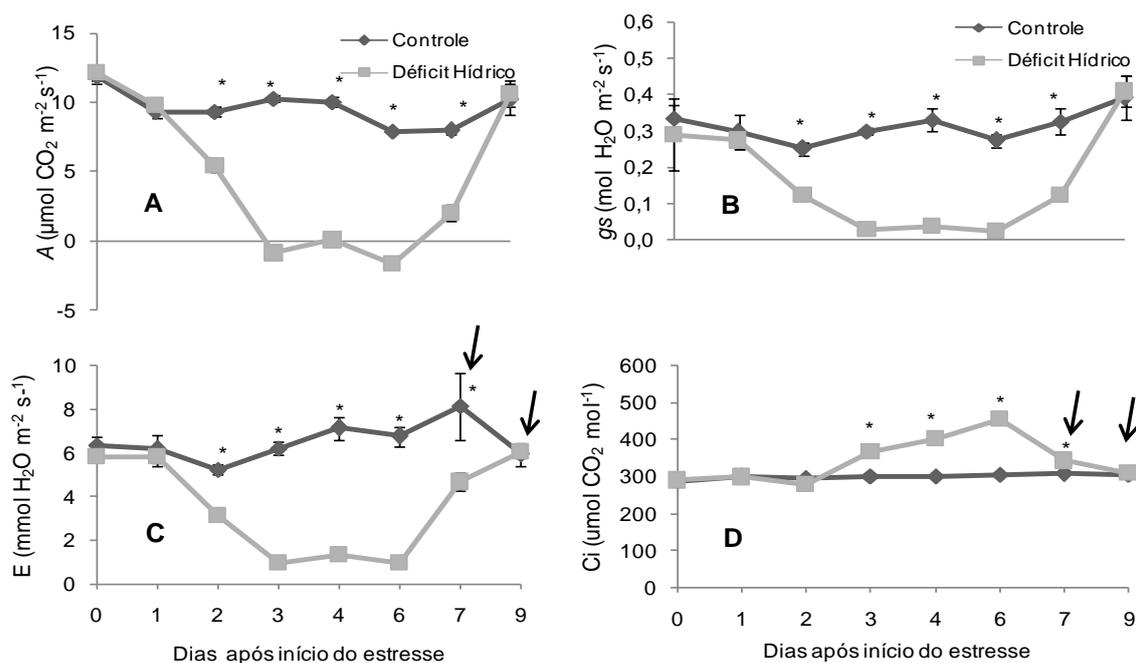


Figura 5. Taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E) e concentração intercelular de CO_2 (C_i) de plantas de pessegueiro cultivar copa 'Chimarrita' enxertada sobre o portaenxerto 'Seleção UFPel 0402', submetidas ao déficit hídrico por seis dias. Setas indicam período de recuperação (7=24h e 9=72h respectivamente). Médias comparadas dentro de cada dia, sendo que os asteriscos indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($n = 4$). Barra indica erro padrão da média.

Em relação aos valores da concentração intercelular de CO_2 (C_i) e transpiração (E), todas as combinações 'Chimarrita'/portaenxertos apresentaram uma drástica diminuição nas plantas submetidas ao déficit hídrico (Figuras 1C e D, 2C e D, 3C e D, 4C e D e 5C e D) com exceção para os dados de C_i , a partir do terceiro até o sexto dia de estresse, o que coincide com o comportamento observado para a A e g_s . Os valores de C_i para as plantas estressadas, sempre se mostraram superiores ao controle em todas as combinações 'Chimarrita'/portaenxertos durante o terceiro, quarto e sexto dia, e até mesmo, no período de recuperação de 24h.

Em todas as plantas submetidas ao déficit hídrico, a tendência da E coincidiu com as reduções observadas na g_s ao longo do período experimental, atingindo os menores valores no sexto dia, apresentando aumento da E a partir do primeiro dia de recuperação (24h), quando se retomou a irrigação das plantas estressadas, igualando os valores de E ao do controle no período de 72h de recuperação. De acordo com Suassuna et al. (2014), esta relação direta entre E e g_s é esperada em virtude do fechamento parcial dos estômatos, o qual restringe tanto a saída de vapor d'água, quanto à entrada de CO_2 no interior da célula. Além do mais, a intensidade da E varia com a ação de fatores internos, área superficial, distribuição e número

dos estômatos e de fatores externos, como: luz, umidade do ar, temperatura e disponibilidade de água no solo.

Sob condição de déficit hídrico, tem sido demonstrada a relação direta entre a redução na C_i em razão do fechamento estomático, gerando decréscimos na assimilação do CO_2 , e no rendimento quântico do fotossistema II (BAKER, 1991, TEZARA et al., 2003). Quando ocorre aumento na C_i com diminuição de g_s , como foi observado no presente estudo, sob déficit hídrico, o decréscimo de A indica que esta limitação não é devida somente ao aumento da resistência estomática, mas também, ao efeito do estresse hídrico sobre a A , visto que um alto valor de C_i , associado aos baixos valores de g_s , indicaria um decréscimo na eficiência de carboxilação (NI; PALLARDY, 1992, LEIDI et al., 1993), como foi verificado neste estudo (Figuras 1, 2, 3, 4 e 5).

Outra provável consequência do aumento de C_i com o fechamento estomático é a redução de A , devido à predominância de limitações não estomáticas, com a ocorrência de resistência mesofílica (RAMANJULU; SREENIVASULU; SUDHAKAR, 1998), justificada pela baixa condutância do mesofilo, a qual reduz a capacidade difusiva de CO_2 (PEEVA; CORNIC, 2009). O acúmulo desse gás na câmara subestomática provoca o fechamento estomático, resultando na inibição da condutância estomática e diminuição na atividade das enzimas envolvidas no processo de fixação de CO_2 , como a enzima rubisco na forma carboxilativa, o que aumentaria a sua função como oxigenase e, conseqüentemente, na fotorrespiração, acarretando assim um desbalanço energético (ZISKA; TOMECEK; GEALY, 2010, SAGE; SAGE; KOCACIMAR, 2012).

Em plantas de ameixeira cultivar América (*P. salicina*) sob déficit hídrico, Martinazzo et al. (2013) verificaram que os valores de C_i reduziram ao longo do período de estresse, acompanhado também da redução na atividade fotossintética, a qual está associada com a diminuição da eficiência de carboxilação. Em plantas do portaenxerto 'GxN-9', Martinazzo et al. (2011) verificaram redução da atividade fotossintética, a partir do quinto dia sob déficit hídrico, e que a mesma relacionou-se com a diminuição da eficiência de carboxilação, porém sem alteração significativa na C_i .

Jiménez et al. (2013) verificaram que plantas de quatro portaenxertos híbridos de *Prunus*, após 16 e 26 dias de déficit hídrico, apresentaram diminuição em todos

os parâmetros avaliados: A , g_s , E e C_i . Rieger; Bianco; Okie (2003), também verificaram após 24 dias, diminuição nos parâmetros de A (49%) e g_s (83%) em plantas de *Prunus ferganensis* para o mesmo estresse.

Diferentes autores relataram que mesmo em curto prazo, a diminuição da fotossíntese não pode ser atribuída somente às limitações estomáticas (NI; PALLARDY, 1992, RAMANJULU; SREENIVASULU; SUDHAKAR, 1998 e YORDANOV; VELIKOVA; TSONEV, 2000, ROUHI et al., 2007), o que pode ser percebido neste estudo, através do aumento de C_i e ao mesmo tempo, diminuição da g_s . Segundo Chaves et al. (2009) essa resposta pode ser atribuída a um heterogêneo fechamento estomático e/ou interferência da condutância cuticular. A importância relativa dos estômatos em relação às limitações não estomáticas parece depender tanto da intensidade, duração do estresse e da tolerância da espécie/genótipo ao déficit hídrico, sendo estas, geralmente menos importantes para as plantas com maior tolerância a esse estresse ou durante tensões mais leves (RAMANJULU; SREENIVASULU; SUDHAKAR, 1998).

Baseado nos parâmetros de trocas gasosas avaliados, foi possível observar uma tendência de maior tolerância ao déficit hídrico até o terceiro dia de estresse nas plantas enxertadas com 'Aldrighi 1', a qual possivelmente está associada ao médio vigor deste genótipo (ROSSI et al., 2004, ROCHA et al., 2007, SCHMITZ et al., 2012) que está associado ao maior volume do sistema radicular (dados não apresentados). Verificou-se ainda que as plantas de 'Chimarrita' enxertadas sobre 'Tsukuba 3' e 'Seleção UFPEl 0402', demonstraram maior rapidez na recuperação (24h) ao déficit hídrico. No entanto, 'Tsukuba 3' parece induzir uma maior tolerância inicial ao déficit hídrico e maior capacidade de recuperação pós estresse, porém essas respostas necessitam de uma investigação mais aprofundada, em nível fisiológico e molecular, visando o melhor entendimento das interações de diferentes genótipos sob condições de estresses por déficit hídrico.

Somado a isso, outro ponto a investigar são as respostas induzidas em 'Chimarrita' pelo portaenxerto 'Seleção UFPEl 0402', onde se observou os menores valores de A e g_s , inclusive nas plantas do tratamento controle, o qual pode ser utilizado como parâmetros indicativos de menor tolerância ao déficit hídrico.

CONCLUSÕES

Pode-se concluir que as diferentes combinações de portaenxertos com a cultivar copa Chimarrita demonstraram comportamento fisiológico diferencial para a tolerância inicial ao déficit hídrico. A combinação 'Chimarrita'/Adrighi 1' apresentou-se com uma maior tolerância inicial ao déficit hídrico.

A redução da taxa assimilatória líquida durante o déficit hídrico não está relacionada principalmente à limitação estomática, sugerindo-se que ocorrem também limitações não estomáticas.

O déficit hídrico por até seis dias, afeta os parâmetros relacionados às trocas gasosas nas plantas das diferentes combinações da cultivar 'Chimarrita'/portaenxertos de *Prunus*, porém de forma reversível, uma vez que após 72h do retorno da irrigação das plantas, todas as combinações avaliadas demonstraram total capacidade de recuperação do desempenho fisiológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANJUM, S. A.; XIE, X. Y.; WANG, L. C.; SALEEM, M. F.; MAN, C.; LEI, W. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. **African Journal of Agricultural Research**, v. 6, p. 2026-2032, 2011.

BAKER, N. R. A possible role for photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis. **Physiologia Plantarum**, v. 81, p. 563-70, 1991.

BERGAMASCHI, H. **Desenvolvimento de déficit hídrico em culturas**. In: BERGAMASCHI, H. (Ed.). Agrometeorologia aplicada à irrigação. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1992, p. 25-32.

CARBONNEAU, A. The early selection of grapevine rootstocks for resistance to drought conditions. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 36, p. 195-198, 1985.

CATTIVELLI, L.; FULVIA, R.; FRANZ, W. B.; MAZZUCOTELLI, E.; MASTRANGELO, A. M.; FRANZIA, E. C.; TONDELLI, A.; STANCA, A. M. Drought tolerance improvement in crop plants: an integrated view from breeding to genomics. **Field Crops Research**, v. 105, p. 1-14, 2008.

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

CUNHA, N. G.; SILVEIRA, R. J. C. **Estudo dos solos do município de Pelotas - Pelotas: EMBRAPA/CPACT, Ed. UFPel, 1996. 50p.: il. (Documentos CPACT; 12/96). 1. Geomorfologia - Pelotas. 2. Solos-Pelotas.**

DE HERRALDE, F.; BIEL, C.; SAVÉ, R. Leaf photosynthesis of eight almond tree cultivars. **Biologia Plantarum**, v. 46, p. 557-561, 2003.

FILHO, J. R. M.; DO AMARAL, L. R.; MACHADO, D. F. S. P.; MEDINA, C. L.; MACHADO, E. C. Deficiência hídrica, trocas gasosas e crescimento de raízes em laranja 'Valência' sobre dois tipos de porta-enxerto. **Bragantia**, v. 67, p. 75-82, 2008.

GONCALVES, B.; SANTOS, A.; SILVA, A. P.; MOUTINHO-PEREIRA, J.; TORRES-PEREIRA, J. M. G. Effect of pruning and plant spacing on the growth of cherry

rootstocks and their influence on stem water potential of sweet cherry trees. **Journal of horticultural Science e Biotechnology**, v. 78, p. 667-672, 2003.

HERTER, F. G.; SACKS, S.; CARVALHO, F. L. C. et al. Condições de clima e solo para instalação do pomar. In: RASEIRA, M. C. B.; CENTELLAS-QUEZADA, A. (Eds.). **Pêssego. Produção**. Brasília: EMBRAPA, 2003. p. 36-40.

IACONO, F.; BUCCELLA, A.; PETERLUNGER, E. Water stress and rootstock influence on leaf gas exchange of grafted and ungrafted grapevines. **Science Horticulture**, v. 75, p. 27-39, 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp?t=2&z=t&o=11&u1=34&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u2=34>. Acesso em 15 de julho de 2015.

JIMÉNEZ, S.; PINOCHET, J.; ABADÍA, A.; MORENO, M. A.; GOGORCENA, Y. Tolerance response to iron chlorosis of *Prunus* selections as rootstocks. **HortScience**, v. 43, p. 304-309, 2008.

JIMÉNEZ, S.; DRIDI, J.; GUTIÉRREZ, D.; MORET, D.; IRIGOYEN, J. J.; MORENO, M. A.; GOGORCENA, Y. Physiological, biochemical and molecular responses in four *Prunus* rootstocks submitted to drought stress. **Tree Physiology**, v. 33, p. 1061-1075, 2013.

JORDAN, W. R. Whole plant response to water deficits: An overview. In: TAYLOR, H. M., JORDAN, W. R., SINCLAIR, T.R. **Limitations to efficient water use in crop production**, Madison: ASA, CSSA, and SSA, p. 289-317, 1983.

LEIDI, E. O.; LOPEZ, J. M.; LOPEZ, M.; GUTIERREZ, J. C. Searching for tolerance to water stress in cotton genotypes: photosynthesis, stomatal conductance and transpiration. **Photosynthetica**, v. 28, p. 383-390, 1993.

MACHADO, A. A.; CONCEIÇÃO, A. R. **Sistema de análise estatística para Windows. WinStat. Versão 2.0**. UFPel, 2003.

MARTINAZZO, E. G.; PERBONI, A. FARIAS, M. E.; BIANCHI, V. J.; BACARIN, M. A. Photosynthetic activity in the rootstock of hybrid peach trees submitted to water restriction and flooding. **Brazilian Society of Plant Physiology**, v. 23, p. 231-236, 2011.

MARTINAZZO, E. G.; PERBONI, A. T.; OLIVEIRA, P. V.; BIANCHI, V. J.; BACARIN, M. A. Atividade fotossintética em plantas de ameixeira submetidas ao déficit hídrico e ao alagamento. **Ciência Rural**, v. 43, p. 35-41, 2013.

MESSCHMIDT, A.; BIANCHI, V. J.; ZANANDREA, I.; MARTINAZZO, E. G.; RADMANN, E. B.; BACARIN, M. A. Trocas gasosas e atividade antioxidante de portaenxertos de *Prunus* spp. submetidos ao estresse seca e alagamento. **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 114, p. 71-81, 2015.

MORENO, M. A.; GOGORCENA, Y.; PINOCHET, J. **Mejora y selección de patrones *Prunus* tolerantes a estreses abióticos**. In: Ávila CM, Atienza SG, Moreno MT, Cubero JI (eds) La adaptación al ambiente y los estreses abióticos en la mejora vegetal. Junta de Andalucía, Sevilla, Spain, p. 449-75, 2008.

NI, B.; PALLARDY, S. G. Stomatal and non stomatal limitation to net photosynthesis in seedlings of woody angiosperms. **Plant Physiology**, v. 99, p.1502-1508, 1992.

OUKARROUM, A.; MADIDI, EL. S.; SCHANSKER, G.; STRASSER, R. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, p. 438-446, 2007.

PEEVA, V.; CORNIC, G. Leaf photosynthesis of *Haberlea rhodopensis* before and during drought. **Environmental and Experimental Botany**, v. 65, p. 310-318, 2009.

RAMANJULU, S.; SREENIVASULU, N.; SUDHAKAR, C. Effect of water stress on photosynthesis in two mulberry genotypes with different drought tolerance. **Photosynthetica**, v. 35, p. 279-283, 1998.

RIEGER, M.; LO BIANCO, R.; OKIE, W. R. Response of *Prunus ferganensis*, *Prunus persica* and two interspecific hybrids to moderate drought stress. **Tree Physiology**, v. 23, p. 51-58, 2003.

ROCHA, M. S.; BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C.; SCHMITZ, J. D.; PASA, M. S.; DA SILVA, J. P. Comportamento agrônômico inicial da cv. Chimarrita enxertada em cinco portaenxertos de pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, p. 583-588, 2007.

ROMERO, P.; NAVARRO, J. M.; GARCIA, F.; ORDAZ, P. B. Effects of regulated deficit irrigation during the pre-harvest period on gas exchange, leaf development and crop yield of mature almond trees. **Tree Physiology**, v. 24, p. 303-312, 2004.

ROSSI, A.; FACHINELLO, J. C.; RUFATO, L.; PARISOTTO, E.; PICOLOTTO, L.; KRUGER, L. R. Comportamento do pessegueiro 'Granada' sobre diferentes portaenxertos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, p. 446-449, 2004.

ROUHI, V.; SAMSON, R.; LEMEURE, R.; Van DAMME, P. Photosynthetic gas exchange characteristics in three different almond species during drought stress and subsequent recovery. **Environmental Experimental Botany**, v. 59, p. 117-129, 2007.

SAGE, R. F.; SAGE, T. L.; KOCACINAR, F. Photorespiration and the Evolution of C4 Photosynthesis. **The Annual Review of Plant Biology**, v. 63, p. 17-29, 2012.

SCHMITZ, J. D.; BIANCHI, V. J.; PASA, M. S.; KÜLKAMP, A. L.; FACHINELLO, J. C. Vigor e produtividade do pessegueiro 'Chimarrita' sobre diferentes portaenxertos. **Revista Brasileira Agrociência**, v.18, p. 1-10, 2012.

SHAO, H. B.; CHU, L.Y.; JALEEL, C. A.; ZHAO, C. X. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, p. 215-225, 2008.

SOUZA, C. R.; SOARES, A. M.; ALBUQUERQUE M. R. Trocas gasosas de mudas de videira, obtidas por dois portaenxertos, submetidas à deficiência hídrica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 1221-1230, 2001.

STRECK, E. V.; KÄMPF, N.; DALMOLIN, R. S. D.; KLAMT, E.; NASCIMENTO, P. C.; SCHNEIDER, P.; GIASSON, E.; PINTO, L. F. S. **Solos do Rio Grande do Sul**. 2.ed. Porto Alegre: UFRGS, 2008, 222p.

SUASSUNA, J. F.; FERNANDES, P. D.; DE BRITO, K. S. A.; NASCIMENTO, R.; DE MELO, A. S.; BRITO, M. E. B. Trocas gasosas e componentes de crescimento em portaenxertos de citros submetidos à restrição hídrica. **Irriga**, v. 19, p. 464-477, 2014.

TERRA, V. S. S.; VALGAS, R. A.; JÚNIOR, C. R.; TIMM, L. C.; PEREIRA, J. F. M.; CARVALHO, F. L. C.; OLDONI, H. Multivariate analysis applied to the study of the relationship between soil and plant properties in a peach orchard. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, p. 755-764, 2014.

TEZARA, W.; MARTINEZ, D.; RENGIFO, E.; HERRERA, A. Photosynthetic responses of the tropical spiny shrub *Lycium nodosum* (Solanaceae) to drought, soil salinity and saline spray. **Annals of Botany**, v. 92, p. 757-765, 2003.

TIMM, LUÍS CARLOS et al. **Manejo da Irrigação na Cultura do Pessegueiro**: manual técnico. Pelotas: Ed. da Universidade Federal de Pelotas, 2007a, 110p.

TIMM, L. C.; JUNIOR, C. R.; TAVARES, V. E. Q.; MADAIL, J. C. M.; MANKE, G.; LEMOS, F. D.; TAVARES, L. C.; RADUNZ, A. L.; LISBOA, H.; PRESTES, R. B.; MORO, M. Caracterização dos persicultores irrigantes e dos métodos de irrigação no pólo produtivo de pêsego da região de Pelotas. **Revista Brasileira Agrociência**, v. 13, p. 413-417, 2007b.

TORRECILLAS, A.; ALARCÓN, J. J.; DOMINGO, R.; PLANES, J.; SÁNCHEZ-BLANCO, M. J. Strategies for drought resistance in leaves of two almond cultivars. **Plant Science**, v. 118, p. 135-143, 1996.

WANG, S.; LIANG, D.; LI, C.; HAO, Y.; FENGWANG M.; SHU, H. Influence of drought stress on the cellular ultrastructure and antioxidant system in leaves of drought-tolerant and drought-sensitive apple rootstocks. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 51, p. 81-89, 2012.

YORDANOV, I.; VELIKOVA, V.; TSONEV, A. Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. **Photosynthetica**, v. 38, p. 171-186, 2000.

ZISKA, L. H.; TOMECEK, M. B.; GEALY, D. R. Competitive interactions between cultivated and red rice as a function of recent and projected increases in atmospheric carbon dioxide. **Agronomy Journal**, v. 102, p. 118-123, 2010.

CAPÍTULO 2

Genes de referência para estudos de expressão gênica em plantas de *Prunus persica* sob déficit hídrico

INTRODUÇÃO

O pessegueiro (*Prunus persica* L. Batsch) é uma das espécies frutíferas de clima temperado mais importantes do mundo (LUO et al., 2014). No entanto, entre os fatores abióticos, o estresse hídrico é um fenômeno comum que afeta seriamente o rendimento da produção desta cultura. Pessegueiros são altamente sensíveis ao estresse hídrico em determinados estádios fenológicos, como no florescimento, que pode levar ao abortamento de flores e frutos, no período de intensa divisão celular e na fase que antecede a maturação dos frutos (DICHIO et al., 2006; TIMM et al., 2007a, MERCHIER et al., 2009, WANG; GARTUNG, 2010).

Fisiologicamente o estresse hídrico inibe o crescimento e desenvolvimento das plantas, afetando diretamente o processo fotossintético, levando a redução da área foliar, condutância estomática, transpiração, potencial hídrico e osmótico, acelerando a senescência e a abscisão foliar (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009), resultando em significativas limitações fisiológicas que podem causar severas quedas na produtividade das plantas (NAKASHIMA; YAMAGUCHI; SHINOZAKI, 2014).

As plantas têm evoluído sob as diferentes condições ambientais impostas à elas e, assim, desenvolveram estrategicamente processos genéticos e moleculares extremamente complexos e de grande importância para sobreviverem à estas condições (LE et al., 2012). Muitos dos processos primários que as plantas utilizam frente às condições adversas não são constitutivamente ativos todo o tempo, mas são induzidos quando estas estão presentes, ativando cascatas de transdução de sinais, que, por consequência, ativam/reprimem inúmeros genes de resposta ao estresse, conduzindo a alterações bioquímicas e fisiológicas (NAKASHIMA; YAMAGUCHI; SHINOZAKI, 2014).

No gênero *Prunus*, existem vários estudos utilizando estratégias que possibilitam identificar genes expressos em resposta a diferentes tratamentos e/ou condições de estresse (ALMADA et al., 2013; JIMÉNEZ et al., 2013, NIU et al., 2014;

ARISMENDI et al., 2015), entretanto é necessário que, dentro de tais experimentos, alguns genes sejam selecionados como candidatos, os quais devem ser validados em análises mais pontuais para quantificar sua expressão em resposta ao estresse.

Uma das técnicas mais utilizadas para determinação da expressão gênica é a técnica de RT-qPCR (*quantitative* RT-PCR), baseada no processo de transcrição reversa (RT), seguida da Reação em Cadeia da DNA-polimerase (PCR), onde há incorporação de moléculas fluorescentes covalentemente ligadas ou não a nucleotídeos, as quais podem ser quantificadas durante a cinética da reação. Os produtos formados são monitorados a cada ciclo, o que permite uma detecção rápida e precisa do cDNA amplificado, com alta sensibilidade e especificidade na análise de transcritos (GACHON; MINGAN; CHARRIER, 2004).

A confiabilidade da técnica de RT-qPCR é dependente de estratégias experimentais específicas, que visam minimizar variações na qualidade, estabilidade e integridade do RNA, e na eficiência da síntese de cDNA (DERVEAUX; VANDESOMPELE; HELLEMENS, 2010). Entre estas estratégias, a seleção de genes de referência adequados para normalizar os dados é de grande importância para obter resultados precisos.

Um gene de referência adequado deve ser expresso a um nível constante entre as amostras, e a sua expressão não pode ser afetada pelas diferentes condições experimentais (BUSTIN, 2002). Considerando que tanto a sequência do gene de referência como a sequência do gene de interesse/alvo estarão presentes na amostra testada, ambos apresentarão o mesmo padrão de variação dentro do experimento, exceto em relação ao nível de expressão (EXPÓSITO-RODRÍGUEZ et al., 2008). A utilização de genes de referência inadequados pode resultar em erros de quantificação e, conseqüentemente, os dados de expressão podem ser mal interpretados (JAIN et al., 2006; AMIL-RUIZ et al., 2013).

Os genes de referência utilizados, geralmente, são aqueles envolvidos em processos celulares básicos, como no metabolismo primário e manutenção da estrutura celular (EXPÓSITO-RODRÍGUEZ et al., 2008). Aqueles mais comumente testados em estudos de RT-qPCR em plantas incluem actina (*ACT*), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), fator de alongação (*EF-1 α* , *EF-4 α*), tubulina (*α -TUA* e *β -TUB*), ubiquitina (*UBQ5*, *UBQ10*), RNA ribossomal (*18S*, *40S*) e ciclofilina (*CYP*) (JAIN et al., 2006, TONG et al., 2009, LE et al., 2012, HUANG et al., 2014, HU et al.,

2014, NIU et al., 2014, MORAES et al., 2015, YE et al., 2015, GALLI et al., 2015). No entanto, estudos mostram que a expressão de muitos destes genes de referência, podem exibir expressão diferencial entre genótipos, tecidos, órgãos e estádios de desenvolvimento (TONG et al., 2009, LE et al., 2012, HU et al., 2014, NIU et al., 2014, GALLI et al., 2015; MORAES et al., 2015; YE et al., 2015). Portanto, é crucial a escolha de genes de referência apropriados para a normalização de cada cultura e condição experimental.

Nas últimas décadas, muitos métodos matemáticos e softwares têm sido desenvolvidos para analisar a variabilidade da expressão de genes de referência, tais como o NormFinder, o qual avalia a variação total de expressão dos genes através da soma da variância (ANDERSEN; JENSEN; ORNTOFT, 2004). O BestKeeper, utiliza os valores do desvio padrão e coeficiente de variação, para calcular a variância intrínseca de expressão (PFAFFL et al., 2004). O algoritmo geNorm, seleciona dois genes mais estáveis, ou a combinação múltipla de vários genes estáveis, calculando a estabilidade média de expressão (M) através da média aritmética de cada gene normalizador comparados par a par (VANDESOMPELE et al., 2002). O método comparativo de ΔC_T calcula a expressão relativa de pares de genes, dentro de cada tratamento, medindo a estabilidade do gene pela média dos valores do desvio padrão da comparação entre um gene normalizador e os outros genes candidatos (SILVER et al., 2006).

Mediante isso, o objetivo do presente estudo foi analisar a expressão de oito genes de referência, a fim de identificar normalizadores adequados para estudos em folhas de plantas de pessegueiro submetidos ao déficit hídrico.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal e Condições Experimentais

Pessegueiros da cultivar copa Chimarrita, com quatro anos de idade enxertadas sobre dois portaenxertos de *Prunus persica* (Aldrichi 1 e Tsukuba 2), foram utilizadas no presente estudo.

No segundo ano após a enxertia, as plantas foram desplantadas do viveiro e transplantadas para vasos de polietileno, com capacidade de 25 litros, contendo como substrato solo do próprio viveiro, classificado como Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico (STRECK et al., 2008). Após completarem dois anos de

crescimento nos vasos, as mesmas foram utilizadas para o experimento, que foi conduzido em casa de vegetação, entre os meses de janeiro e fevereiro de 2015, no Campus Capão do Leão, da Universidade Federal de Pelotas.

As plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos: (i) estresse por déficit hídrico, que consistiu na suspensão total da irrigação, a partir do início do experimento, e (ii) plantas irrigadas com 5 litros de água diariamente para cada vaso/combinção, mantendo a capacidade de campo (controle). Plantas do tratamento por déficit hídrico foram mantidas sob as condições de estresse por nove dias.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições biológicas por tratamento em esquema fatorial 2 x 3, sendo duas condições hídricas (controle e déficit hídrico) e três períodos de avaliações (4^o, 7^o e 9^o dias de estresse). Após cada coleta, amostras de folhas da cultivar copa Chimarrita enxertadas sobre os dois portaenxertos, foram acondicionadas imediatamente em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em ultrafreezer a - 80°C até o momento da extração do RNA. Os resultados das combinações da cultivar copa e dos portaenxertos (combinações Chimarrita/portaenxertos) foram analisados separadamente.

Extração de RNA e Síntese de cDNA

Todos os procedimentos que envolveram a extração e manipulação do RNA total foram executados em capela de exaustão, utilizando-se sempre vidrarias e material autoclavado por 40 minutos, tratados com água ultra pura com DEPC.

O RNA total foi extraído a partir de 100 mg de tecido foliar, de acordo com o protocolo de CHANG; PURYEAR; CAIRNEY (1993), com pequenas modificações. O tecido foliar foi macerado com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino, onde foi transferido para tubos de polipropileno de 2 mL, acrescentado-se 900 µL de tampão CTAB pré-aquecido, e as amostras foram homogenizadas em vórtex e incubadas em banho-maria a 65°C durante 30 minutos, após resfriadas, acrescentou-se igual volume (900 µL) de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). As amostras foram imediatamente centrifugadas por 10 minutos a 12.000g a 4°C para a separação das fases aquosa e orgânica.

A fase superior aquosa foi transferida para um novo tubo, adicionado igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), sendo que tal volume foi ajustado em função do volume de sobrenadante recuperado, agitado e centrifugado novamente por 10 minutos a 12.000g a 4°C. O sobrenadante (aproximadamente 400 µL) foi transferido para um novo tubo, no qual se adicionou cloreto de lítio 3M (120 µL), os extratos foram misturados por inversão dos tubos e então encaminhados para o freezer (-20°C), onde permaneceram *overnight* para precipitação dos ácidos nucléicos. No dia seguinte, as amostras foram imediatamente centrifugadas a 12.000g durante 30 minutos a 4°C. Os tubos foram retirados cuidadosamente da centrífuga (o *pellet* é muito gelatinoso e se desprende com facilidade da parede dos tubos) e virou-se o tubo uma única vez para observar o *pellet*. Descartou-se o sobrenadante, acrescentou-se ao *pellet* precipitado 500 µL de tampão composto por TE + SDS 1% + NaCl 1M pré-aquecido a 65°C. Adicionou-se igual volume (500 µL) de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), e então as amostras foram centrifugadas a 12.000g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante (+/-450 µL) foi transferido para um novo tubo, e então adicionado 350 µL de isopropanol (volume é ajustado perante o volume recuperado do sobrenadante). As amostras foram novamente centrifugadas a 12.000g durante 10 minutos a 4°C. Logo, retirou-se o isopropanol dos tubos, os quais foram lavados com etanol 70% gelado (500 µL). As amostras foram novamente centrifugadas a 12.000g por 1 minuto a 4°C, com o auxílio de uma micropipeta, retirou-se o resíduo de etanol com bastante cuidado para não perder o *pellet*. Deixou-se o *pellet* secando com o tubo inclinado sob uma folha de papel absorvente por aproximadamente 50 minutos em câmara de fluxo laminar.

O *pellet* de RNA foi dissolvido com a adição de 30 µL de água DEPC 0,01% autoclavada, homogeneizadas em vórtex e armazenadas em ultrafreezer. A concentração e pureza de RNA foram mensuradas em NanoDrop ND-1000 (260/280nm) enquanto que a qualidade e integridade foram verificadas em eletroforese com gel de agarose 1,0%.

Os cDNAs fita simples foram sintetizados por transcrição reversa a partir de 1,5 µg de RNA total utilizando o kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega), numa reação com volume final de 20 µL utilizando primers oligo-dT de acordo com as instruções do fabricante.

Escolha dos genes de referência/normalizadores

Foram selecionados oito genes de referência para serem testados neste estudo, os quais são citados na literatura como controle interno nas análises de RT-qPCR e que, supostamente, não apresentam variação significativa mediante diferentes condições experimentais. Os genes selecionados foram: Actina (*ACT*), Ciclofilina 2 (*CYP2*), Fator de alongação 1- α (*EF1- α*), Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), α -Tubulina (*TUA*), β -Tubulina (*TUB*), Ubiquitina10 (*UBQ10*) e 18S RNA ribossomal (*18S*) (Tabela 1).

Reações de RT-qPCR

O volume total para cada reação de RT-qPCR foi de 12 μ L, sendo 6,25 μ L do fluoróforo SYBR Green (Invitrogen®), 0,25 μ L (10 mM) de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 1 μ L de cDNA (diluição 1:5, previamente definida), 4,15 μ L de água ultra pura e 0,1 μ L de ROX. A amplificação foi padronizada em equipamento CFX-96 Real Time Thermal Cycler (Bio-Rad), utilizando-se as seguintes condições de amplificação: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto com inserção da curva de *melting* de 65 a 95°C, com incremento de 5°C a cada medida de fluorescência. Foram utilizadas três repetições biológicas.

Especificidade e Curva Padrão de Eficiência

A especificidade dos *primers* foi avaliada através da curva de dissociação (*melting curve*), sendo mantidos neste estudo somente aqueles *primers* com *amplicons* específicos, ou seja, com um único pico de dissociação das fitas dos produtos da PCR.

A eficiência da PCR (*E*) foi obtida a partir de quatro diluições seriadas de cDNA (1:1; 1:5; 1:25 e 1:125) para gerar a curva padrão de cada par de *primer* testado. O valor de *E* foi estimado pela equação $E = 10^{-(1/\text{slope})}$ (RASMUSSEN, 2001), onde o *slope* corresponde à inclinação da reta obtida da regressão entre os valores de C_T (*Cycle Threshold*) dos transcritos e os valores do logaritmo das diferentes diluições de cDNA (curva padrão de eficiência), sendo considerados aceitáveis valores de eficiência entre 1,8 e 2,2, o que corresponde a uma eficiência da reação entre 90-110% (Figuras 1 e 2).

Análise dos dados

Para classificar e determinar o desempenho de cada gene de referência, foram utilizadas a média dos valores de C_T (LE et al., 2012, NIU et al., 2014) para cada amostra testada, obtidos através de cada ciclo de reação de RT-qPCR. Os dados foram submetidos a análise de variância, através do Sistema de Análise Estatística - WinStat – Versão 2.0 (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2003). Foram considerados estáveis aqueles genes normalizadores com menores valores de desvio padrão e coeficiente de variação.

Paralelamente às análises estatísticas, a estabilidade dos normalizadores para ambas as combinações 'Chimarrita'/portaenxertos, foram avaliadas através da ferramenta RefFinder, disponível no site <http://www.leonxie.com/referencegene.php>, o qual integra os algoritmos computacionais geNorm, NormFinder, BestKeeper e o método comparativo do ΔC_T para comparar e classificar a estabilidade dos genes candidatos a normalizadores. Os valores de C_T de cada gene foram utilizados por estes algoritmos para determinar a estabilidade de expressão relativa dos mesmos. Destes quatro algoritmos, geNorm e NormFinder usam os valores de expressão relativa calculados a partir dos valores de C_T , enquanto que BestKeeper e o método comparativo do ΔC_T usam diretamente os valores de C_T inseridos no RefFinder (CHAO et al., 2012). Além da análise separada em cada algoritmo utilizado, uma classificação geral do melhor normalizador para a condição experimental testada foi obtida através de uma combinação dos resultados dos quatro algoritmos. Os cálculos detalhados de cada um dos métodos encontram-se descritos em Chen et al. (2011).

Tabela 1. Descrição dos oito genes de referência testados nas reações de RT-qPCR em plantas de pessegueiro sob déficit hídrico.

| GENE | DESCRIÇÃO | T^om (Melting) | PRIMER FORWARD (5'-3') | PRIMER REVERSE (5'-3') | REFERÊNCIA |
|--------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------|
| <i>ACT</i> | Actina | 57,5°C | GTTATTCTTCATCGGCGTCTTCG | CTTCACCATTCCAGTTCCATTGTC | TONG et al. (2009) |
| <i>EF-1α</i> | Fator de alongação 1 α | 56,2°C | AATTGCCTTTGTTCCCATCTCTG | TGGGCTCCTTCTAATCTCCTTA | XU et al. (2008) |
| <i>CYP2</i> | Ciclofilina 2 | 56,3°C | ACTCCAAAGCGTGTTAGAAAAGG | GTCTCTTCCACCATAACGATAGG | TONG et al. (2009) |
| <i>GADPH</i> | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase | 57,0°C | ATTTGGAATCGTTGAGGGTCTTATG | AATGATGTTGAAGGAAGCAGCAC | TONG et al. (2009) |
| <i>TUA</i> | α -Tubulina | 56,9 °C | TTCTCTCTACTCATTCCCTCCTTG | GATTGGTGTATGTTGGTCTCTCG | TONG et al. (2009) |
| <i>TUB</i> | β -Tubulina | 59,5°C | CCGAGAATTGTGACTGCCTTCAAG | AGCATCATCCTGTCTGGGTATTCC | TONG et al. (2009) |
| <i>UBQ10</i> | Ubiquitina 10 | 57,0°C | AAGGCTAAGATCCAAGACAAAGAG | CCACGAAGACGAAGCACTAAG | TONG et al. (2009) |
| <i>18S rRNA</i> | 18S RNA ribossomal | 59,0°C | TAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTG | CTAAGCGGCATAGTCCCTCTAAG | TONG et al. (2009) |

RESULTADOS

Os *primers* testados amplificaram produtos específicos, confirmados pela presença de apenas um pico nas curvas de dissociação (*melting curve*), comprovando a especificidade do produto (Figuras 1 e 2). Pela análise da curva, ao final da reação, avalia-se a fluorescência das amostras em relação ao aumento contínuo da temperatura, sendo que cada *amplicon* possui uma temperatura de fusão específica, o que possibilita diferenciar os produtos resultantes da PCR (PFAFFL, 2001).

A eficiência de amplificação de cada par de *primers*, com as amostras de cDNA de cada uma das combinações 'Chimarrita'/portaenxerto foi baseada nos valores obtidos do Logaritmo (*log*) das diluições de cDNA (1:1; 1:5; 1:25 e 1:125). As eficiências de amplificação variaram entre 1,89 e 2,20, indicando que ao final de cada ciclo, o transcrito molde foi duplicado (Figuras 1 e 2). Porém, houve uma exceção para o gene de referência *18S*, testado na combinação 'Chimarrita/Aldrighi 1', que apresentou uma eficiência acima do limite normalmente aceitável ($E = 2,39$). O mesmo não foi verificado para a combinação 'Chimarrita/Tsukuba 2', que apresentou valores de $E = 1,92$.

Os coeficientes de determinação (R^2), obtidos para a maioria dos genes testados, foram acima do valor mínimo aceitável de 0,7 ou 70%, com exceção para os genes *EF-1 α* e *18S* na combinação 'Chimarrita/Aldrighi 1', que apresentaram R^2 abaixo do aceitável ($R^2 = 0,673$ e $0,594$, respectivamente) (Figura 1), conforme proposto por PFAFFL (2001).

Em relação ao Desvio Padrão (DP) e Coeficiente de Variação (CV%), observou-se que dentre os genes testados, os da *TUA* e *CYP2* foram aqueles que apresentaram os menores valores de DP (0,40 e 0,36, respectivamente) e CV% (11,01 e 11,22, respectivamente) para a combinação 'Chimarrita/Aldrighi 1' (Tabela 2). O mesmo também foi verificado para 'Chimarrita/Tsukuba 2', onde o gene *TUA*, apresentou o menor valor de DP (0,20) e CV% (8,42), indicando maior estabilidade de expressão deste gene para ambas as combinações. Por outro lado, o gene *ACT*, apresentou os maiores valores de DP, entre 2,36 ('Chimarrita/Aldrighi 1') e 1,25 ('Chimarrita/Tsukuba 2') e de CV% entre 45,71 ('Chimarrita/Aldrighi 1') e 63,44 ('Chimarrita/Tsukuba 2') comparados aos demais genes testados.

A principal característica de um gene de referência é a estabilidade média de expressão (M) o qual não poderá ser afetada pelo tipo de tecido, períodos de desenvolvimento ou condições fisiológicas. Neste estudo, foi utilizado RefFinder, uma ferramenta baseada em softwares de fácil operação, desenvolvida para avaliação e triagem de genes de referência, que integra o Método comparativo ΔC_T (SILVER et al., 2006), BestKeeper (PFAFFL et al., 2004), NormFinder (ANDERSEN; JENSEN; ORNTOFT, 2004) e geNorm (VANDESOMPELE et al., 2002).

Os resultados obtidos com os métodos do RefFinder foram semelhantes no subconjunto de ambas as combinações de 'Chimarrita'/portaenxertos de pessegueiro do presente estudo. O gene que se apresentou mais instável foi a *ACT*, seguido do *Ef-1 α* (Figuras 3 A-E e 4 A-E), sugerindo que estes clássicos genes de referência não são adequados para normalizar os dados de RT-qPCR para as combinações e condições experimentais avaliadas.

De acordo com o Método Comparativo ΔC_T , o gene de referência mais estável na condição experimental testada (déficit hídrico), foi o gene *TUA*, apresentando menor valor de M para 'Chimarrita/Aldrighi1' (1,19) e 'Chimarrita/Tsukuba 2' (0,79), seguido do segundo gene mais estável, o *CYP2* (Figuras 3A e 4A). O valor de M é definido por Chen et al. (2011), como a variação média de um determinado gene em relação à todos os outros testados.

O padrão de estabilidade de expressão verificado com o algoritmo do programa BestKeeper foi diferente dos demais algoritmos, evidenciando que os genes *18S*, na combinação 'Chimarrita/Aldrighi 1', e *UBQ10*, na combinação 'Chimarrita/Tsukuba 2', foram os genes mais estáveis, e *ACT* seguido de *EF-1 α* , como os menos estáveis para ambas as combinações 'Chimarrita'/portaenxertos (Figuras 3B e 4B).

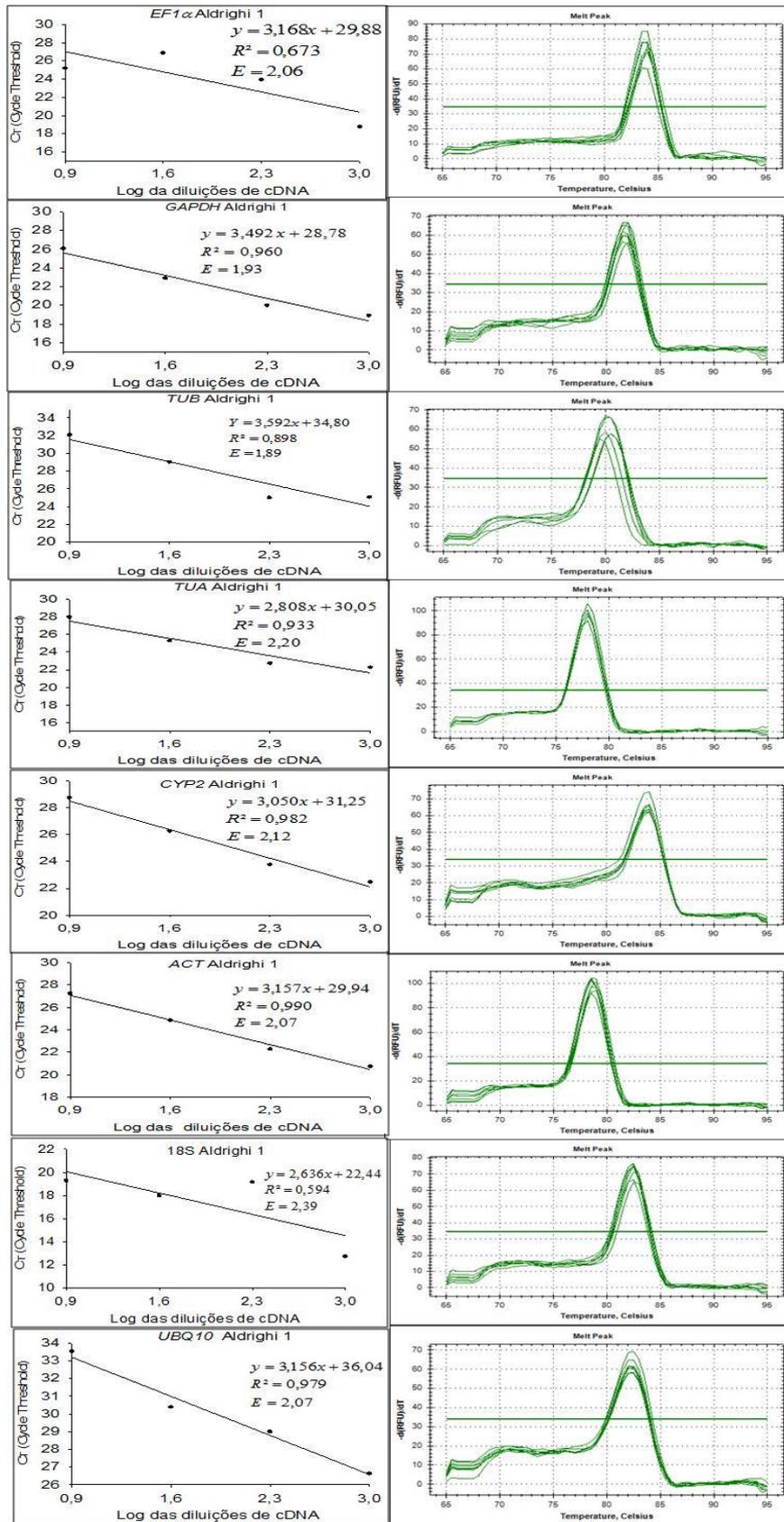


Figura 1. Eficiência e especificidade de oito genes de referência em folhas de pessegueiro cultivar Chimarrita enxertada sobre o portaenxerto 'Aldrighi1', submetidos ao déficit hídrico por diferentes períodos.

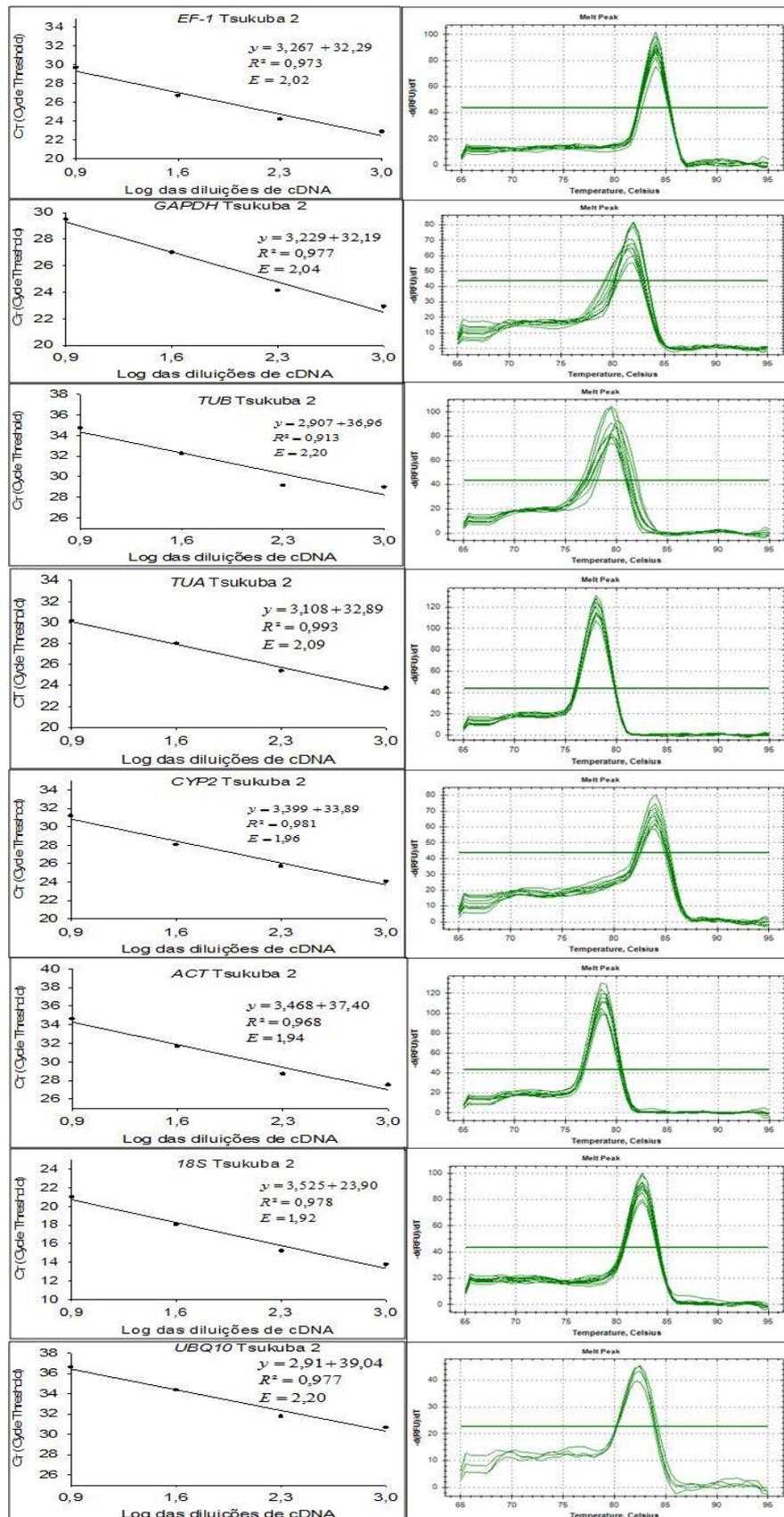


Figura 2. Eficiência e especificidade de oito genes de referência em folhas de pessegueiro cultivar Chimarrita enxertada sobre o portaenxerto 'Tsukuba 2', submetidos ao déficit hídrico por diferentes períodos.

Tabela 2. Média (\bar{X}), Coeficiente de Variação (CV%) e Desvio Padrão (DP) de oito genes de referência testados em folhas de plantas de pessegueiro, cultivar Chimarrita, enxertadas sobre os portaenxertos 'Aldrighi 1' e 'Tsukuba 2', e submetidos ao déficit hídrico.

| ALDRIGHI 1 | TUA | CYP2 | UBQ10 | TUB | 18S | GADPH | Ef-1α | ACT |
|-----------------------------------|------------|-------------|--------------|------------|------------|--------------|--------------------------------|------------|
| Média \bar{X} | 3,69 | 3,26 | 3,84 | 2,98 | 3,11 | 3,98 | 5,91 | 5,17 |
| CV% | 11,01 | 11,22 | 18,30 | 39,90 | 25,12 | 24,04 | 25,10 | 45,71 |
| DP | 0,40 | 0,36 | 0,70 | 1,18 | 0,78 | 0,95 | 1,48 | 2,36 |
| TSUKUBA 2 | | | | | | | | |
| Média \bar{X} | 2,45 | 2,10 | 1,40 | 1,56 | 1,47 | 1,96 | 2,31 | 1,97 |
| CV% | 8,42 | 22,40 | 47,01 | 28,91 | 32,96 | 38,53 | 17,66 | 63,44 |
| DP | 0,20 | 0,47 | 0,66 | 0,45 | 0,48 | 0,75 | 0,40 | 1,25 |

De acordo com o algoritmo do programa NormFinder, o gene de referência que apresentou menor valor de M foi o *GADPH* (M= 0,584 - 'Chimarrita/Aldrighi 1'), seguido do *TUA* (M= 0,654) (Figura 3C). Já para a combinação 'Chimarrita/Tsukuba 2', o gene *TUA*, foi o mais estável, apresentou o menor valor de M (0,463), seguido do *TUB* (M= 0,537) e *UBQ10* (M= 0,555). Nesta combinação, o gene *GADPH* apresentou-se altamente instável, ocupando a sétima posição (M= 0,740) (Figura 4C), o mesmo foi verificado para os algoritmos do Método Comparativo ΔC_T (M= 0,970) (Figura 4A) e geNorm (M= 0,812) (Figura 4D).

O programa geNorm utiliza o princípio de que a razão da expressão de dois genes de referência deve ser constante através de diferentes condições experimentais e/ou órgãos/tecido, utilizando (M= 0,5) como ponto de corte. Com base nos valores de M calculados para os oito genes testados, observou-se *TUA/CYP2* (M= 0,436; M= 0,355) (Figuras 3D e 4D, respectivamente) como os genes mais estáveis para ambas combinações cultivar-copa/portaenxertos do presente estudo, e como o mais variável/instável, *ACT* (M=1,42 e M= 0,91) (Figuras 3D e 4D, respectivamente).

Além de integrar os quatro métodos acima, o software RefFinder (Figuras 3E e 4E) utiliza o valor de C_T para atribuir um valor adequado para um gene individual e calcula a média geométrica dos seus valores para a classificação final, com base nas classificações de cada um dos quatro programas (CHEN et al., 2011).

Embora o RefFinder não indique um valor de corte para classificar um gene de referência como estável ou instável, este software fornece um ranking dos genes candidatos de acordo com a sua estabilidade. Neste caso, os genes candidatos com

a classificação mais baixa foram considerados como sendo expressos de forma mais estável sob as condições experimentais avaliadas, e assim, podendo ser selecionados como genes de referência ideais. Tal como observado na Figura 3E, o ranking global recomendado de estabilidade no subconjunto para 'Chimarrita/Aldrighi 1' foi determinada como: *TUA* > *CYP2* > *GAPDH* > *18S* > *TUB* > *UBQ10* > *Ef-1 α* > *ACT*. Já a estabilidade do subconjunto para 'Chimarrita/Tsukuba 2', apresentou-se um pouco diferenciada, porém, os dois primeiros genes mais estáveis foram os mesmos apresentados para a combinação 'Chimarrita/Aldrighi 1', sendo que o ranking para 'Chimarrita/Tsukuba 2' foi: *TUA* > *CYP2* > *UBQ10* > *TUB* > *18S* > *GAPDH* > *Ef-1 α* > *ACT* (Figura 4E). Portanto, utilizou-se o RefFinder como uma ferramenta de confirmação para finalmente selecionar os genes de referência mais adequados, uma vez que pequenas diferenças no grau de estabilidade de expressão foram observadas entre as abordagens avaliadas.

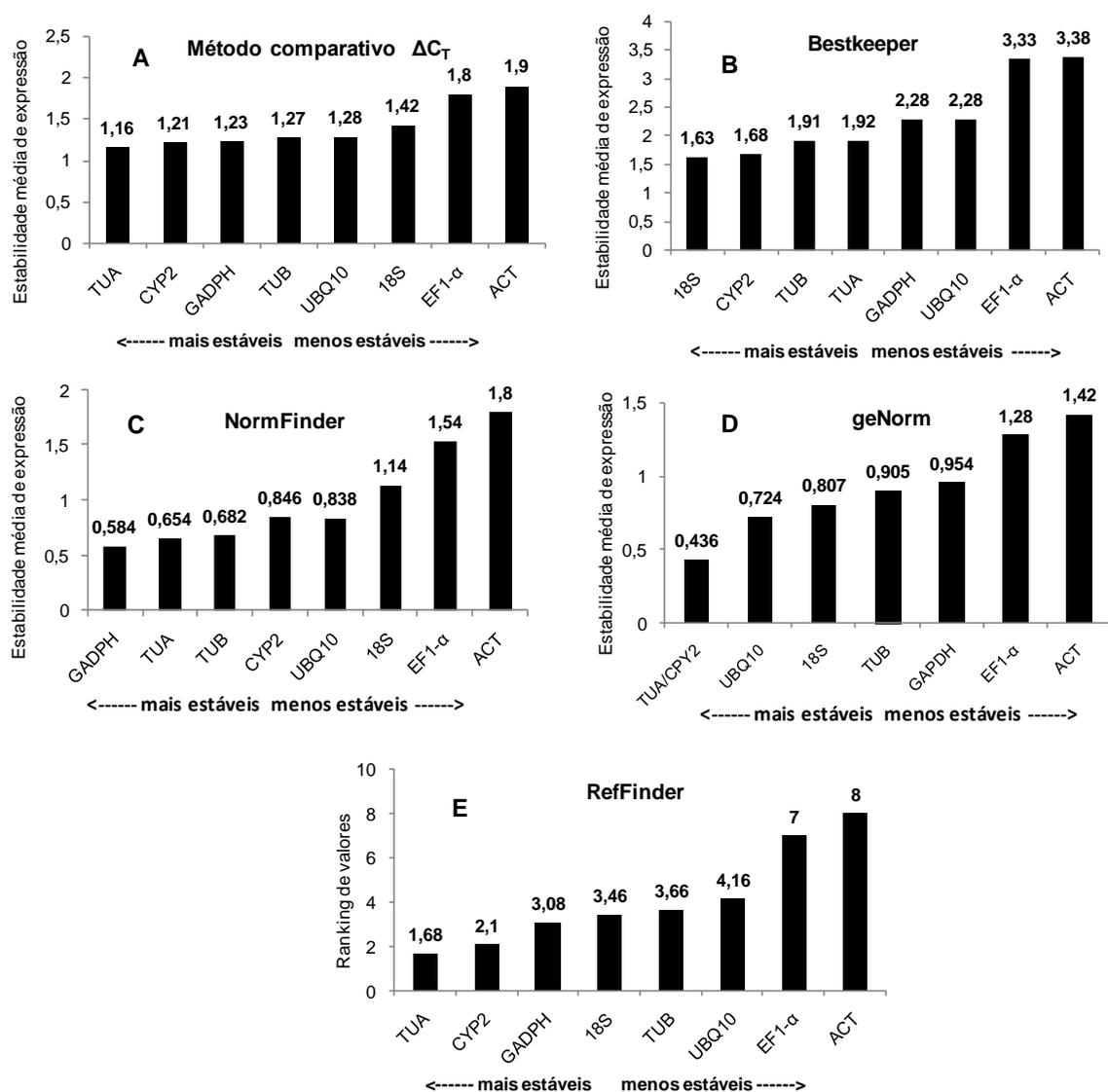


Figura 3. Estabilidade média de expressão de oito genes de referência de acordo com os algoritmos (A) Método Comparativo ΔC_T , (B) Bestkeeper, (C) NormFinder, (D) geNorm e (E) RefFinder-Ranking, em folhas de pessegueiro cultivar copa 'Chimarrita' enxertada sobre o portaenxerto 'Aldrichi 1', submetidos ao déficit hídrico.

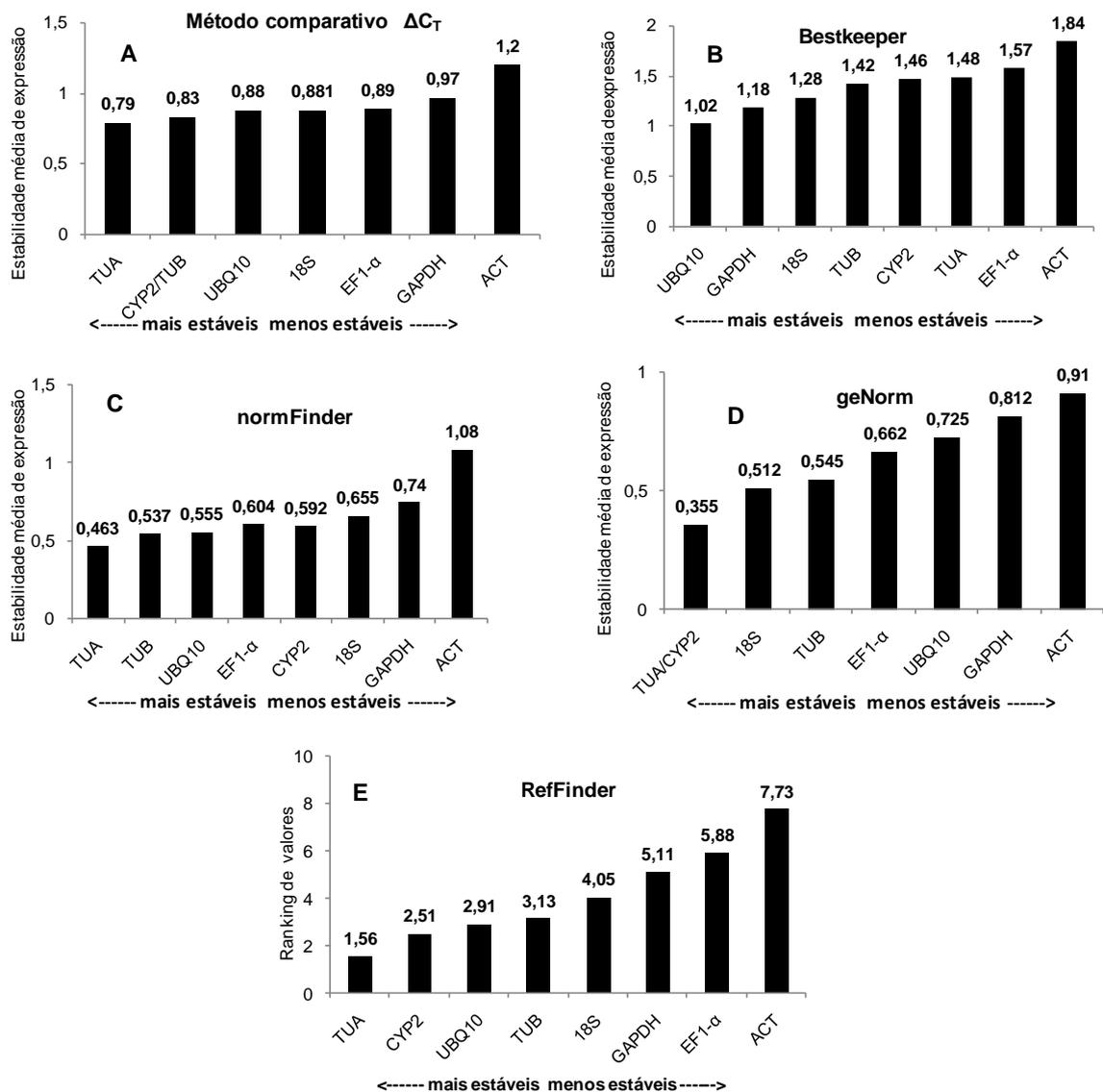


Figura 4. Estabilidade média de expressão de oito genes de referência de acordo com os algoritmos (A) Método Comparativo ΔC_T , (B) Bestkeeper, (C) NormFinder, (D) geNorm e (E) RefFinder- Ranking, em folhas de pessegueiro cultivar copa ‘Chimarrita’ enxertada sobre o portaenxerto ‘Tsubuka 2’, submetidos ao déficit hídrico.

DISCUSSÃO

A importância da análise de expressão gênica tem crescido significativamente nas últimas décadas, sendo atualmente RT-qPCR, a técnica mais comumente utilizada para analisar a expressão de transcritos (MALLONA et al., 2010). Esta técnica é considerada bastante precisa e confiável, além do mais, serve para validar os dados obtidos por outros métodos. Sem dúvida, as suas vantagens são a alta sensibilidade, a detecção em tempo real do progresso da reação, velocidade da

análise e medição precisa do material examinado na amostra (GACHON et al., 2004).

Estudos de expressão gênica por RT-qPCR exigem o conhecimento dos genes de referência expressos de forma estável para a normalização de dados de genes alvo, sob condições experimentais específicas, pois a utilização de genes de referência não validados e inadequados pode resultar em uma duvidosa interpretação dos dados (BUSTIN et al., 2009, DERVEAUX et al., 2010). Muitos genes são costumeiramente conhecidos como constitutivos e, conseqüentemente, muito utilizados como normalizadores em análises de RT-qPCR. Contudo, mesmo genes envolvidos em processos básicos do metabolismo celular podem apresentar variações significativas de expressão, não sendo assim adequados para a utilização como controle interno de determinadas condições experimentais (TONG et al., 2009, HU et al., 2014, GALLI et al., 2015). A principal característica de um gene de referência é a sua estabilidade da expressão, o qual não é afetado pelo tipo de tecido, períodos de desenvolvimento ou condições fisiológicas.

Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) é um dos genes de referência comumente usado para normalizar os dados de RT-qPCR. O uso de *GAPDH* em muitos estudos traz bons resultados (CRUZ et al., 2009), por outro lado, em outros não é recomendado devido à variabilidade de expressão imposta pelas diferentes condições experimentais (TONG et al., 2009; HU et al., 2014; HUANG et al., 2014; GALLI et al., 2015; YE et al., 2015). Neste trabalho, *GAPDH* se apresentou bastante instável na maioria dos algoritmos utilizados, e também apresentou um alto CV%, 24,04 para 'Chimarrita/Aldrighi 1', e 38,53 para 'Chimarrita/Tsukuba 2'. As possíveis razões para essa alta variabilidade, devem-se ao fato do *GAPDH* atuar como um componente da via glicolítica, convertendo gliceraldeído-3-fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato com a concomitante redução de NAD^+ a NADH_2 , e também participar de outros processos celulares, fazendo com que, o perfil de expressão deste gene possa ter sido influenciado mediante as condições experimentais do presente estudo.

A actina é uma proteína intracelular bastante abundante nas células eucarióticas e estas estão em maior concentração no córtex celular. Genes que codificam actina são habitualmente utilizados como normalizadores em muitos

estudos de expressão (JAIN et al., 2006). Dentre os oitos genes de referência testados no presente estudo, *ACT* foi considerado o gene mais instável mediante os quatro algoritmos analisados (Figuras 3 A-E e 4 A-E) e também apresentou o maior CV% e DP (Tabela 2). Tong et al. (2009), também verificaram alta instabilidade deste gene em plantas de pessegueiro. *ACT* também demonstrou instabilidade em outros estudos, tais como realizados por Galli et al. (2015), em plantas de *Fragaria x ananassa* Duch submetidos ao déficit hídrico, e por Jain et al. (2006), em plantas de *Oryza sativa* em diferentes condições experimentais. Por outro lado, em sementes de *Prunus sibirica* L., *ACT* foi um dos genes mais estáveis baseados nos algoritmos geNorm e NormFinder (NIU et al., 2014).

Em folhas e raízes de *Dactylis glomerata* L., os genes *ACT* e *CPY2* apresentaram maior estabilidade, em plantas submetidas ao déficit hídrico (HUANG et al., 2014). Estes mesmos genes, também foram os mais estáveis baseado nos algoritmos geNorm e NormFinder, em flores e frutos em desenvolvimento de plantas de cerejeira (YE et al., 2015). No presente estudo, o gene *CYP2* também mostrou alta estabilidade, no ranking de classificação (RefFinder), apresentou-se como o segundo gene mais estável (Figuras 3E e 4E). As ciclofilinas constituem uma família de proteínas encontradas em organismos bastante variados, desde procarionotos até humanos. Estas moléculas estão ligadas à função de modulação da permeabilidade das membranas nas mitocôndrias e também influenciam na conformação de proteínas na célula (LEWIN, 1997), portanto muitas vezes, são utilizadas como gene de referência em muitos estudos.

A ubiquitina é uma proteína fundamental na regulação de processos biológicos, estando diretamente envolvida em complexos de sinalização de outras proteínas (SUN et al., 1997), além de participarem na estrutura e transcrição da cromatina, na reparação de DNA, regulação da endocitose e transporte de proteínas (HERNANDEZ-GARCIA et al., 2009). Ao investigarem a expressão de 11 genes de referência em diferentes amostras de *Prunus persica*, Tong et al. (2009) verificaram que *UBQ10* apresentou expressão estável como normalizador nesta espécie. No presente estudo esse comportamento não foi verificado, pois *UBQ10* não apresentou uma boa estabilidade perante todos os algoritmos analisados. Ao contrário dos resultados encontrados por Galli et al. (2015), onde o gene *UBQ11* foi

o segundo gene mais estável de acordo com a classificação geral (RefFinder) em plantas de morangueiro submetidos ao déficit hídrico.

Os ribossomos dos eucariontes apresentam quatro moléculas diferentes de rRNA: 5S, 5.8S, 18S e 28S. Estas moléculas de rRNA juntamente com as proteínas ribossomais, formam as duas subunidades ribossomais 40S e 60S. As moléculas de rRNA têm diferentes papéis na síntese protéica.

Subunidades ribossomais, como o 18S são amplamente utilizados como genes de referência. Porém o uso do gene 18S como referência nem sempre é apropriado, pois como ele não tem a cauda poli-A o que impede a síntese de cDNA com *primers* oligo-dT. Além disso, o gene 18S, sendo de origem ribossômica, nem sempre é inteiramente representativo da população de mRNA celular. No presente estudo este gene apresentou variabilidade na estabilidade, sendo o mais estável apenas no algoritmo Bestkeeper para a combinação 'Chimarrita/Aldrigh 1'. Galli et al. (2015) não indicaram como possível gene de referência para plantas de morangueiro sob condições de estresse osmótico e déficit hídrico. Em pessegueiro, sob diferentes condições experimentais e tecidos, Tong et al. (2009) também verificaram grande variabilidade para este gene.

O fator de alongação 1α de eucariotos é um membro altamente conservado da família das GTPases, que incluem fatores protéicos envolvidos no início, alongamento e término da tradução, além de atuarem em outras funções celulares, como interação com proteínas do citoesqueleto, calmodulina e com o sistema proteolítico dependente de ubiquitina (KEELING et al., 2004). Assim como foi verificado por Niu et al. (2014), em plantas de *Prunus sibirica* L. e por HU et al. (2014), em plantas de *Fortunella crassifolia* Swingle, submetidas a diferentes estresses abióticos, o gene *Ef-1 α* mostrou variabilidade na expressão de estabilidade, corroborando os resultados deste trabalho, como pode ser verificado no ranking de estabilidade (RefFinder) (Figuras 3E e 4E).

As tubulinas compõem uma pequena família de proteínas globulares. Os membros mais usuais desta família são a α -tubulina e a β -tubulina, que são as proteínas que compõem os microtúbulos, que desempenham papel crucial em vários processos básicos como divisão celular, transporte intracelular, movimento celular, morfogênese e manutenção do formato da célula (LUDWIG et al., 1987; WHITTAKER; TRIPLETT, 1999). Neste trabalho foram analisados ambos genes de

tubulina (α e β), sendo que o gene *TUB* (β - tubulina) foi mais instável do que o gene *TUA* (α -tubulina) nas condições experimentais impostas. *TUA* foi o gene mais estável para ambas as cultivares comparado à todos os outros testados, isso foi demonstrado em todos os algoritmos analisados e também apresentou o menor DP (0,20) e CV% (8,42) na combinação 'Chimarrita/Tsukuba 2'. Por outro lado, Ye et al. (2015), verificaram alta estabilidade para este gene em tecidos e órgãos vegetativos em plantas de cerejeira. No entanto, Tong et al. (2009) não verificaram estabilidade deste gene em diferentes genótipos, tecidos e fases de desenvolvimento dos frutos em *Prunus persica*. Hu et al. (2014) também não verificaram estabilidade do gene *TUA* em *Fortunella crassifolia* Swingle submetidas ao déficit hídrico.

Os resultados obtidos no presente estudo nos levam a sugerir que os genes constitutivos podem ser regulados de forma diferenciada em diferentes espécies de plantas, confirmando que geralmente não há um gene de referência universalmente aplicável para todas as condições experimentais, e que os transcritos de referência comumente utilizados, podem nem sempre mostrar a expressão constitutiva. Portanto, a contradição destes e outros resultados, corroboram a importância de uma escolha correta do gene constitutivo para análises de expressão de transcritos por RT-qPCR. A utilização de genes de referência inadequados conduz a diferenças no perfil de expressão relativa. Estes resultados confirmam ainda mais a importância de validar previamente os genes de referência para as condições experimentais a serem estudadas. Interpretações errôneas e inconsistentes podem ser levadas adiante se uma validação prévia não for realizada para as condições experimentais impostas.

Assim, este estudo é de grande importância para outras análises de expressão gênica, a fim de verificar se estes resultados se mantêm em outras espécies de *Prunus* sp. mediante as mesmas condições do presente estudo.

CONCLUSÕES

A análise da estabilidade de expressão de oito genes candidatos a normalizadores para estudos de RT-qPCR, sugere os genes constitutivos *TUA* e *CYP2* como os mais adequados para estudos em folhas de pessegueiro cultivar

copa Chimarrita enxertadas sobre os portaenxertos 'Aldrichi 1' e 'Tsukuba 2' submetidos ao déficit hídrico. Os genes *Ef-1 α* e *ACT* são os menos indicados para as condições experimentais testadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMADA, R.; ARISMENDI, M. J.; PIMENTEL, P.; ROJAS, P.; HINRICHSEN, P.; PINTO, M.; SAGREDO, B. Class 1 non-symbiotic and class 3 truncated hemoglobin-like genes are differentially expressed in stone fruit rootstocks (*Prunus* L.) with different degrees of tolerance to root hypoxia. **Tree Genetics & Genomes**, v. 9, p.1051-1063, 2013.

AMIL-RUIZ, F.; GARRIDO-GALA, J.; BLANCO-PORTALES, R.; FOLTA, K. M.; MUÑOZ-BLANCO, J.; CABALLERO, J. L. Identification and validation of reference genes for transcript normalization in strawberry (*Fragaria × ananassa*) defense responses. **PLoS One**, v. 8, p.1-18, 2013.

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ORNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v. 64, p. 5245-5250, 2004.

ARISMENDI, M. J.; ALMADA, A.; PIMENTEL, P.; BASTIAS, A.; SALVATIERRA, A.; ROJAS, P.; HINRICHSEN, P.; PINTO, M.; DI GENOVA, A.; TRAVISANY, D.; MAASS, A.; SAGREDO, B. Transcriptome sequencing of *Prunus* sp. rootstocks roots to identify candidate genes involved in the response to root hypoxia. **Tree Genetics & Genomes**, v. 11, p.1-16, 2015.

BUSTIN, S. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 29, p. 23–39, 2002.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, p. 611–622, 2009.

CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 11, p. 113-116, 1993.

CHAO, W. S.; DOGRAMACI, M.; FOLEY, M. E.; HORVATH, D. P.; ANDERSON, J. V. Selection and validation of endogenous reference genes for qRT-PCR analysis in Leafy Spurge (*Euphorbia esula*). **PLoS ONE**, v. 7, p. 1-10, 2012.

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

CHEN, L.; ZHONG, H. Y.; KUANG, J. F.; LI, J. G.; LU W. J.; CHEN, J. Y. Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions. **Planta** v. 234, p. 377-390, 2011.

CRUZ, F.; KALAOUN, S. P.; NOBILE, C.; ALMEIDA, J.; BARROS, L.; ROMANO, E.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; VASLIN, M.; FERFEIRA, A. M. Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative real-time RT-PCR. **Molecular Breeding**, v. 23, p. 607–616, 2009.

DERVEAUX, S.; VANDESOMPELE, J.; HELLEMENS, J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. **Methods**, v. 50, p. 227–230, 2010.

DICHIO, B.; XILOYANNIS, C.; SOFO, A.; MONTANARO, G. Effects of postharvest regulated deficit irrigation on carbohydrate and nitrogen partitioning, yield quality and vegetative growth of peach trees. **Plant Soil**, v. 290, p. 127-137, 2006.

EXPÓSITO-RODRÍGUEZ, M.; BORGES, A. A.; BORGES-PÉREZ A.; PÉREZ, J. A. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. **BMC Plant Biology**, v. 8:131, p. 1-12, 2008.

GACHON, C.; MINGAN, A.; CHARRIER, B. Real time PCR: what relevance to plant studies? **Journal Experimental Botany**, v. 55, p.1445-1454, 2004.

GALLI, V.; BOROWSKI, J. M.; PERIN, E. C.; MESSIAS, R. S.; LABONDE, J.; PEREIRA, I. S.; ANJOS, S. D. A.; ROMBALDI, C. V. Validation of reference genes for accurate normalization of gene expression for real time quantitative PCR in strawberry fruits using different cultivars and osmotic stresses. **Gene**, v. 554, p. 205-214, 2015.

HERNANDEZ-GARCIA, C. M, MARTINELLI, A. P.; BOUCHARD, R. A.; FINER, J. J. A soybean (*Glycine max*) polyubiquitin promoter gives strong constitutive expression in transgenic soybean. **Plant Cell Reports**, v. 28, p. 837-849, 2009.

HU, Y.; CHEN, H.; LUO, C.; DONG, L.; ZHANG, S.; HE, X.; HUANG, G. Selection of reference genes for real-time quantitative PCR studies of kumquat in various tissues and under abiotic stress. **Scientia Horticulturae**, v. 174, p. 207-216, 2014.

HUANG, L.; YAN, H.; JIANG, X.; ZHANG, Y.; ZHANG X.; YANG J.; ZENG, B.; YIN, G.; LEE, S.; YANHONG, Y.; XIAO, M.; PENG, Y. Reference gene selection for quantitative real-time reverse-transcriptase PCR in orchardgrass subjected to various abiotic stresses. **Gene**, v. 553, p. 158-165, 2014.

JAIN, M.; NIJHAWAN, A.; TYAGI, A. K.; KHURANA, J. P. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 345, p. 646-651, 2006.

JIMÉNEZ, S.; DRIDI, J.; GUTIÉRREZ, D.; MORET, D.; IRIGOYEN, J. J.; MORENO, M. A.; GOGORCENA, Y. Physiological, biochemical and molecular responses in four *Prunus* rootstocks submitted to drought stress. **Tree Physiology**, v. 33, p. 1061-1075, 2013.

KEELING, P. J; INAGAKI, Y. A classic of eukaryotic GTPase with a punctuate distribution suggesting multiple functional replacements of translation elongation factor 1 alpha. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 15380-15385, 2004.

LE, D. T.; ALDRICH, D. L.; VALLIYODAN, B.; WATANABE, Y.; HA, C. V.; NISHIYAMA, R.; GUTTIKONDA, S. K.; QUACH, T.; GUTIERREZ-GONZALEZ, J. J.; TRAN, L. S. P.; NGUYEN, H. T. Evaluation of Candidate Reference Genes for Normalization of Quantitative RT-PCR in Soybean Tissues under Various Abiotic Stress Conditions. **PLoS ONE**, v. 7, p. 1-10, 2012.

LEWIN, B. "*GENES VI*". New York: Oxford University Press, 1997, 1260p.

LUDWIG, S. R.; OPPENHEIMER, D. G.; SILFLOW, C. D. ; SNUSTAD, D. P. Characterization of the α -tubulin gene family of *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, p. 5833-5837, 1987.

LUO, X.; SHI, T.; SUN, H.; SONG, J.; NI, Z.; GAO, Z. Selection of suitable inner reference genes for normalisation of microRNA expression response to abiotic stresses by RT-qPCR in leaves, flowers and young stems of peach. **Scientia Horticulturae**, v. 165, p. 281–287, 2014.

MACHADO, A. A.; CONCEIÇÃO, A. R. **Sistema de análise estatística para Windows. WinStat. Versão 2.0**. UFPel, 2003.

MALLONA, I.; LISCHEWSKI, S.; WEISS, J.; HAUSE, B.; EGEEA-CORTINES, M. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida*. **BMC Plant Biology**, v. 10:4, 2010.

MERCIER, V.; BUSSI, C.; LESCOURRET, F.; GENARD, M. Effects of different irrigation regimes applied during the final stage of rapid growth on an early maturing peach cultivar. **Irrigation Science**, v. 27, p. 297-306, 2009.

MORAES, G. P.; BENITEZ, L. C.; DO AMARAL, M. M.; VIGHI, I. L.; AULER, P. A.; MAIA, L. C.; BIANCHI, V. J.; BRAGA, E. J. B. Evaluation of reference genes for RT-qPCR studies in the leaves of rice seedlings under salt stress. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, p. 2384-2398, 2015.

NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 1-7, 2014.

NIU, J. ZHU, B.; CAI, J.; LI, P.; WANG, L.; DAI, H.; QIU, L.; YU, H.; DENG LONG A.; ZHAO, H.; ZHANG, Z.; LIN, S. Selection of Reference Genes for Gene Expression Studies in Siberian Apricot (*Prunus sibirica* L.) Germplasm Using Quantitative Real-Time PCR. **PLoS ONE**, v. 9, p. 1-10, 2014.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real time RTPCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 2002-2007, 2001.

PFAFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper—Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 509-515, 2004.

RASMUSSEN R. P. Quantification on the Light Cycler. In: Meuer S, Wittwer CT and Nakagawara K (eds) **Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications**. 1st edition. Springer Press, Heidelberg, p. 21-34, 2001.

SILVER, N.; BEST, S.; JIANG, J. THEIN, S. L. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, v. 7, p. 33-42, 2006.

STRECK, E. V.; KÄMPF, N.; DALMOLIN, R. S. D.; KLAMT, E.; NASCIMENTO, P. C. SCHNEIDER, P.; GIASSON, E.; PINTO, L. F. S. **Solos do Rio Grande do Sul**. 2.ed. Porto Alegre: UFRGS, 2008. 222p.

SUN, C. W.; GRIFFEN, S.; CALLIS, J. A model for the evolution of polyubiquitin genes from the study of *Arabidopsis thaliana* ecotypes. **Plant Molecular Biology**, v. 34, p. 745-758, 1997.

TIMM, LUÍS CARLOS et al. **Manejo da Irrigação na Cultura do Pessequeiro**: manual técnico. Pelotas: Ed. da Universidade Federal de Pelotas, 2007a, 110p.

TONG, Z.; GAO, Z.; WANG, F.; ZHOU, J.; ZHANG, Z. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using realtime PCR. **BMC Molecular Biology**, v. 10:71, p. 1-13, 2009.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, p. 1-12, 2002.

WANG, D.; GARTUNG, J. Infrared canopy temperature of early-ripening peach trees under postharvest deficit irrigation. **Agricultural Water Management**, v. 97, p. 1787-1794, 2010.

WHITTAKER D. J.; TRIPLETT, B. A. Gene-Specific Changes in α -Tubulin Transcript Accumulation in Developing Cotton Fibers. **Plant Physiology**, v. 121, p. 181-188, 1999.

XU, Y.; ZHANG, L.; XIE, H.; ZHANG, Y. Q.; OLIVEIRA, M. M.; RONG-CAI M. A. Expression analysis and genetic mapping of three SEPALLATA-like genes from peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). **Tree Genetics & Genomes**, v. 4, p. 693-703, 2008.

YE, X.; ZHANG, F.; TAO, Y.; SONG, S.; FANG, J. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in different cherry genotypes, developmental stages and organs. **Scientia Horticulturae**, v. 181, p. 182-188, 2015.

CAPÍTULO 3

Resposta diferencial na expressão de genes potencialmente envolvidos no mecanismo de tolerância ao déficit hídrico em plantas da cv. Chimarrita (*Prunus persica*) enxertada sobre dois portaenxertos

INTRODUÇÃO

As plantas estão constantemente expostas a fatores bióticos e abióticos, os quais acabam desencadeando diferentes estresses que afetam o crescimento e o metabolismo, acarretando principalmente em reduções nos rendimentos das culturas (WANG et al., 2007, PISTELLI et al., 2012). Neste contexto, a Região Sul do RS, caracteriza-se por ser de clima subtropical e apresenta grandes irregularidades dos fatores ambientais, dentro de uma mesma estação e ao longo dos diferentes anos. A exploração de espécies frutíferas de clima temperado na região pode ser realizada desde que utilizados genótipos adaptados ou tolerantes às condições climáticas locais, principalmente no que tange à exigência em frio, resistência e tolerância a diferentes estresses bióticos e abióticos (FACHINELLO; BIANCHI, 2005).

O pessegueiro [*Prunus persica* (L.) Batsch] é a frutífera de caroço com maior expressão econômica no Mundo, estando entre aquelas mais produzidas e consumidas *in natura* (SCHMITZ et al., 2012, LUO et al., 2014). No Brasil, o Estado do RS se destaca por liderar a produção nacional desta frutífera, porém, apresenta produtividade baixa em seus pomares ($\approx 10 \text{ t ha}^{-1}$) comparado aos Estados de São Paulo e Minas Gerais, que apresentam médias próximas de 20 t ha^{-1} (IBGE, 2015).

Segundo ROCHA et al. (2007), problemas de baixa produtividade em pomares de pessegueiro na região sul do RS, podem ser atenuados com a utilização de mudas com qualidade garantida, portaenxertos e cultivares copa adaptados às condições edafoclimáticas da região, além do manejo adequado dos pomares. Entretanto, ainda não existe uma indicação segura sobre quais são os melhores portaenxertos para frutas de caroço no Brasil.

A utilização de portaenxertos na cultura do pessegueiro visa possibilitar o cultivo em locais em que as condições edafoclimáticas e fitossanitárias possuem alguma limitação ao desempenho produtivo do pomar. Um dos problemas enfrentados pela cultura do pessegueiro na região Sul do RS é estresse por déficit

hídrico em períodos críticos para a cultura, como é o caso da pré-colheita e colheita dos frutos, entre os meses de novembro e janeiro, afetando diretamente a qualidade e produtividade dos pomares desta região (TIMM et al., 2007a,b, MARTINAZZO et al., 2013).

No período de saída da dormência, quando ocorre a polinização e fecundação, a disponibilidade hídrica é fundamental para garantir a quantidade de células que definirão os frutos, sendo que nessa fase, a deficiência hídrica pode aumentar o abortamento das flores, bem como reduzir o número de células por fruto. Outra fase em que o adequado aporte de água é fundamental é na fase de crescimento rápido dos frutos, que ocorre duas a três semanas antes da maturação destes. Nesta fase, o tamanho dos frutos é diretamente proporcional à disponibilidade hídrica no solo (TIMM et al., 2007a, MERCHIER et al., 2009, WHANG; GARTUNG, 2010).

Neste contexto, o estresse por déficit hídrico produz um impacto negativo importante sobre os sistemas agrícolas, tendo em vista que as respostas das plantas a esse estresse diferem em vários níveis de organização, ou seja, depende da intensidade e da duração do estresse, bem como da espécie ou estágio de desenvolvimento (SHAO et al., 2008, WHANG; GARTUNG, 2010, KRASENSKY; JONAK, 2012, RIPOLL et al., 2014). Em nível de planta, o déficit hídrico induz diversas respostas fisiológicas e bioquímicas como o fechamento estomático, a redução do crescimento e da fotossíntese e o aumento da respiração, afetando consideravelmente o crescimento e o desenvolvimento (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009; NAKASHIMA; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, SHINOZAKI, 2014; RIPOLL et al., 2014).

Plantas submetidas ao déficit hídrico podem manter a absorção de água pelas raízes por intermédio do ajustamento osmótico no vacúolo e no citosol, no qual envolve a acumulação de solutos compatíveis, tais como: prolina, glicina betaína, sacarose, sorbitol, rafinose, trealose, entre outros, conferindo a diminuição do potencial hídrico dos tecidos em relação à solução do solo, com isso mantém o crescimento celular, a abertura estomática e a fotossíntese, favorecendo a tolerância a desidratação e exploração de um maior volume de água do solo (KRASENSKY; JONAK, 2012, BANDURSKA, PLACHTA; WOSZCZYK, 2009, JIMÉNEZ et al., 2013). Tais respostas ao déficit hídrico são complexas, pois envolvem a expressão de

genes que implicam na coordenação e na integração de várias vias bioquímicas e fisiológicas, que contribuem para que a planta produza respostas de adaptação às condições impostas pelo estresse (KRASENSKY; JONAK, 2012).

Genes cuja expressão é aumentada durante o déficit hídrico, incluem aqueles que codificam enzimas chaves na biossíntese de ácido abscísico, etileno, rota glicolítica, proteínas envolvidas no ajuste osmótico e na proteção celular, inúmeras proteínas de sinalização celular, como quinases e fosfatases, e fatores de transcrição (KIM et al., 2007, JIMÉNEZ et al., 2013). Dessa forma, proteínas que fazem parte de vias metabólicas que levam à tolerância ao estresse hídrico, são sintetizadas (WANG; VINOCCUR; ALTMAN, 2003, TRAN et al., 2007).

A expressão diferencial de genes envolvidos nos mecanismos de defesa contra a desidratação celular têm função chave na tolerância ao déficit hídrico. O entendimento de como cada gene contribui na resposta final, nos níveis celulares, fisiológicos e agronômicos, podem auxiliar no desenvolvimento de plantas com maior tolerância ao déficit hídrico (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SEKI 2003, KRASENSKY; JONAK, 2012). No entanto, saber como esses eventos são ativados/desativados e como interagem entre si, é essencial para a busca de cultivares mais tolerantes, dessa maneira genótipos que diferem no grau de tolerância, devem apresentar diferenças qualitativas e quantitativas na expressão gênica (NEPOMUCENO; NEUMAIER; FARIAS, 2001).

A aplicação de técnicas de análise de transcritos para o estudo da tolerância ao déficit hídrico tem trazido prospecções importantes dentro dos mecanismos bioquímicos e moleculares, podendo trazer resultados promissores que podem ser aplicados nos programas de melhoramento genético (MATSUMURA et al., 2005, JIMÉNEZ et al., 2013).

As tecnologias para analisar o perfil transcricional permitem a análise de populações de mRNA a partir de células ou tecidos selecionados, produzindo medidas de expressão gênica em larga escala. A técnica de RT-qPCR é precisa para quantificar níveis de expressão de um determinado gene, possibilitando obter dados com rapidez e alta reprodutibilidade (MALLONA et al., 2010). Muitos estudos foram realizados utilizando a técnica de RT-qPCR, a fim de verificar a expressão gênica em portaenxertos de *Prunus* sob estresse hídrico, tais como realizados por Pistelli et al. (2012), Almada et al. (2013) e Arismendi et al. (2015), no qual

estudaram as respostas moleculares em plantas submetidas ao alagamento, por outro lado, Jiménez et al. (2013) verificaram estas respostas em plantas sob condições de déficit hídrico.

Perante isso, o presente trabalho teve por objetivo verificar através da técnica de RT-qPCR a expressão de genes-chave envolvidos no processo de resposta ao déficit hídrico em plantas de pessegueiro cultivar copa 'Chimarrita' enxertadas sobre os portaenxertos 'Aldrighi 1' e 'Tsukuba 2'.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal e Condições Experimentais

Pessegueiros da cultivar copa Chimarrita, com quatro anos de idade enxertadas sobre dois portaenxertos de *Prunus persica* (Aldrighi 1 e Tsukuba 2), foram utilizadas no presente estudo.

No segundo ano após a enxertia, as plantas foram desplantadas do viveiro e transplantadas para vasos de polietileno, com capacidade de 25 litros, contendo como substrato solo do próprio viveiro, classificado como Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico (STRECK et al., 2008). Após completarem dois anos de crescimento nos vasos, as mesmas foram utilizadas para o experimento, que foi conduzido em casa de vegetação, entre os meses de janeiro e fevereiro de 2015, no Campus Capão do Leão, da Universidade Federal de Pelotas.

As plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos: (i) estresse por déficit hídrico, que consistiu na suspensão total da irrigação, a partir do início do experimento, e (ii) plantas irrigadas com 5 litros de água diariamente para cada vaso/combinção, mantendo a capacidade de campo (controle). Plantas do tratamento por déficit hídrico foram mantidas sob as condições de estresse por nove dias.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições biológicas por tratamento em esquema fatorial 2 x 3, sendo duas condições hídricas (controle e déficit hídrico) e três períodos de avaliações (4^o, 7^o e 9^o dias de estresse). Após cada coleta, amostras de folhas da cultivar copa Chimarrita enxertadas sobre os dois portaenxertos, foram acondicionadas imediatamente em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em ultrafreezer a - 80°C até o momento da extração do RNA. Os resultados das combinações da

cultivar copa e dos portaenxertos (combinações Chimarrita/portaenxertos) foram analisados separadamente.

Extração de RNA e Síntese de cDNA

Todos os procedimentos que envolveram a extração e manipulação do RNA total foram executados em capela de exaustão, utilizando-se sempre vidrarias e material autoclavado por 40 minutos, tratados com água ultra pura com DEPC.

O RNA total foi extraído a partir de 100 mg de tecido foliar, de acordo com o protocolo de CHANG; PURYEAR; CAIRNEY (1993), com pequenas modificações. O tecido foliar foi macerado com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino, onde foi transferido para tubos de polipropileno de 2 mL, acrescentado-se 900 µL de tampão CTAB pré-aquecido, e as amostras foram homogenizadas em vórtex e incubadas em banho-maria a 65°C durante 30 minutos, após resfriadas, acrescentou-se igual volume (900 µL) de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). As amostras foram imediatamente centrifugadas por 10 minutos a 12.000g a 4°C para a separação das fases aquosa e orgânica.

A fase superior aquosa foi transferida para um novo tubo, adicionado igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), sendo que tal volume foi ajustado em função do volume de sobrenadante recuperado, agitado e centrifugado novamente por 10 minutos a 12.000g a 4°C. O sobrenadante (aproximadamente 400 µL) foi transferido para um novo tubo, no qual se adicionou cloreto de lítio 3M (120 µL), os extratos foram misturados por inversão dos tubos e então encaminhados para o freezer (-20°C), onde permaneceram *overnight* para precipitação dos ácidos nucléicos. No dia seguinte, as amostras foram imediatamente centrifugadas a 12.000g durante 30 minutos a 4°C. Os tubos foram retirados cuidadosamente da centrífuga (o *pellet* é muito gelatinoso e se desprende com facilidade da parede dos tubos) e virou-se o tubo uma única vez para observar o *pellet*. Descartou-se o sobrenadante, acrescentou-se ao *pellet* precipitado 500 µL de tampão composto por TE + SDS 1% + NaCl 1M pré-aquecido a 65°C. Adicionou-se igual volume (500 µL) de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), e então as amostras foram centrifugadas a 12.000g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante (+/-450 µL) foi transferido para um novo tubo, e então adicionado 350 µL de isopropanol (volume é ajustado perante o volume recuperado do sobrenadante). As amostras foram novamente

centrifugadas a 12.000g durante 10 minutos a 4°C. Logo, retirou-se o isopropanol dos tubos, os quais foram lavados com etanol 70% gelado (500 µL). As amostras foram novamente centrifugadas a 12.000g por 1 minuto a 4°C, com o auxílio de uma micropipeta, retirou-se o resíduo de etanol com bastante cuidado para não perder o *pellet*. Deixou-se o *pellet* secando com o tubo inclinado sob uma folha de papel absorvente por aproximadamente 50 minutos em câmara de fluxo laminar.

O *pellet* de RNA foi dissolvido com a adição de 30 µL de água DEPC 0,01% autoclavada, homogeneizadas em vórtex e armazenadas em ultrafreezer. A concentração e pureza de RNA foram mensuradas em NanoDrop ND-1000 (260/280nm) enquanto que a qualidade e integridade foram verificadas em eletroforese com gel de agarose 1,0%.

Os cDNAs *in situ* simples foram sintetizados por transcrição reversa a partir de 1,5 µg de RNA total utilizando o kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega), numa reação com volume final de 20 µL utilizando primers oligo-dT de acordo com as instruções do fabricante.

Escolha e síntese dos *primers*

Para a síntese de *primers*, foi realizada a busca das sequências nucleotídicas utilizadas em trabalhos publicados com plantas do gênero *Prunus* submetidos ao estresse hídrico, de acordo com Pistelli et al. (2012) e Jiménez et al. (2013) (Tabela 1).

Quantificação relativa (RT-qPCR)

O volume total para cada reação de RT-qPCR foi de 12 µL, sendo 6,25 µL do fluoróforo SYBR Green (Invitrogen®), 0,25 µL (10 mM) de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 1 µL de cDNA (diluição 1:5, previamente definida), 4,15 µL de água ultra pura e 0,1 µL de ROX. A amplificação foi padronizada em equipamento CFX-96 Real Time Thermal Cycler (Bio-Rad), utilizando-se as seguintes condições de amplificação: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto com inserção da curva de *melting* de 65 a 95°C, com incremento de 5°C a cada medida de fluorescência. Foram utilizadas três repetições biológicas.

A partir dos valores de ΔC_T obtidos foram calculados os valores de Quantificação Relativa de Expressão (QR), através da seguinte equação: $QR = 2^{-\Delta C_T}$

($\Delta\Delta CT$) (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002). Como normalizador interno da reação, foi escolhido o gene *TUA*, previamente selecionado (conforme dados disponibilizados no Capítulo 2) entre outros sete genes candidatos a normalizadores (*ACT*, *Ef-1 α* , *CYP2*, *GAPDH*, *TUB*, *UBQ10* e *18S*).

Especificidade e Curva Padrão de Eficiência

A especificidade dos *primers* foi avaliada através da curva de dissociação (*melting curve*), sendo mantidos neste estudo somente aqueles *primers* com *amplicons* específicos, ou seja, com um único pico de dissociação das fitas dos produtos da PCR.

A eficiência da PCR (E) foi obtida a partir de quatro diluições seriadas de cDNA (1:1; 1:5; 1:25 e 1:125) para gerar a curva padrão de cada par de *primer* testado. O valor de E foi estimado pela equação $E = 10^{-(1/\text{slope})}$ (RASMUSSEN, 2001), onde o *slope* corresponde à inclinação da reta obtida da regressão entre os valores de C_T (*Cycle Threshold*) dos transcritos e os valores do logaritmo das diferentes diluições de cDNA (curva padrão de eficiência), sendo considerados aceitáveis valores de eficiência entre 1,8 e 2,2, o que corresponde a uma eficiência da reação entre 90-110% (Figuras 1 e 2).

Tabela 1. Descrição da sequência nucleotídica de sete genes testados nas reações de RT-qPCR em plantas de pessegueiro sob déficit hídrico.

| GENE | DESCRIÇÃO | T⁰m (Melting) | PRIMER FORWARD (5'-3') | PRIMER REVERSE (5'-3') | REFERÊNCIA |
|--------------------|---|-------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------|
| <i>ACC oxidase</i> | 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidase | 63,5°C | TTCCAGGATGACAAGGTCAGTGGT | GTTTGGGCAATCACTCTGTTGCTCC | Pistelli et al. (2012) |
| <i>GTL</i> | Glicosiltransferase | 62,7°C | AACAGCTTCAGAGGAGTGGTCGTT | GATTGGTGTCCGGCCATCATCATT | Pistelli et al. (2012) |
| <i>SDH</i> | Sorbitol desidrogenase | 54,8°C | CGAAGTTGGTAGCTTGGTGAAGA | CTTTGCACTGCTCACATCTCCA | Jiménez et al. (2013) |
| <i>SIP1</i> | Rafinose sintase | 52,8°C | GGTGCCATCCAGTCCTTTGT | TGCCCTCAATCCTGCAACTT | Jiménez et al. (2013) |
| <i>SOT1</i> | Transportador de Sorbitol | 62,7°C | GGTGTCTTAACAATGCCCGAGTCG | TGGGGACCTGAACAACGTCTTCGG | Pistelli et al. (2012) |
| <i>S6PDH</i> | Sorbitol-6-fosfato desidrogenase | 54,3°C | ACATGGCACGACATGGGAAAAGAC | AATTGGCTCACTTGAGGCTTGAT | Jiménez et al. (2013) |
| <i>P5CS</i> | Pirrolina-5-carboxilato sintetase | 54,1°C | CGAATTGCTGTGGATGCAAAAGT | GCGAAGGTCAACCACAAGATCA | Jiménez et al. (2013) |

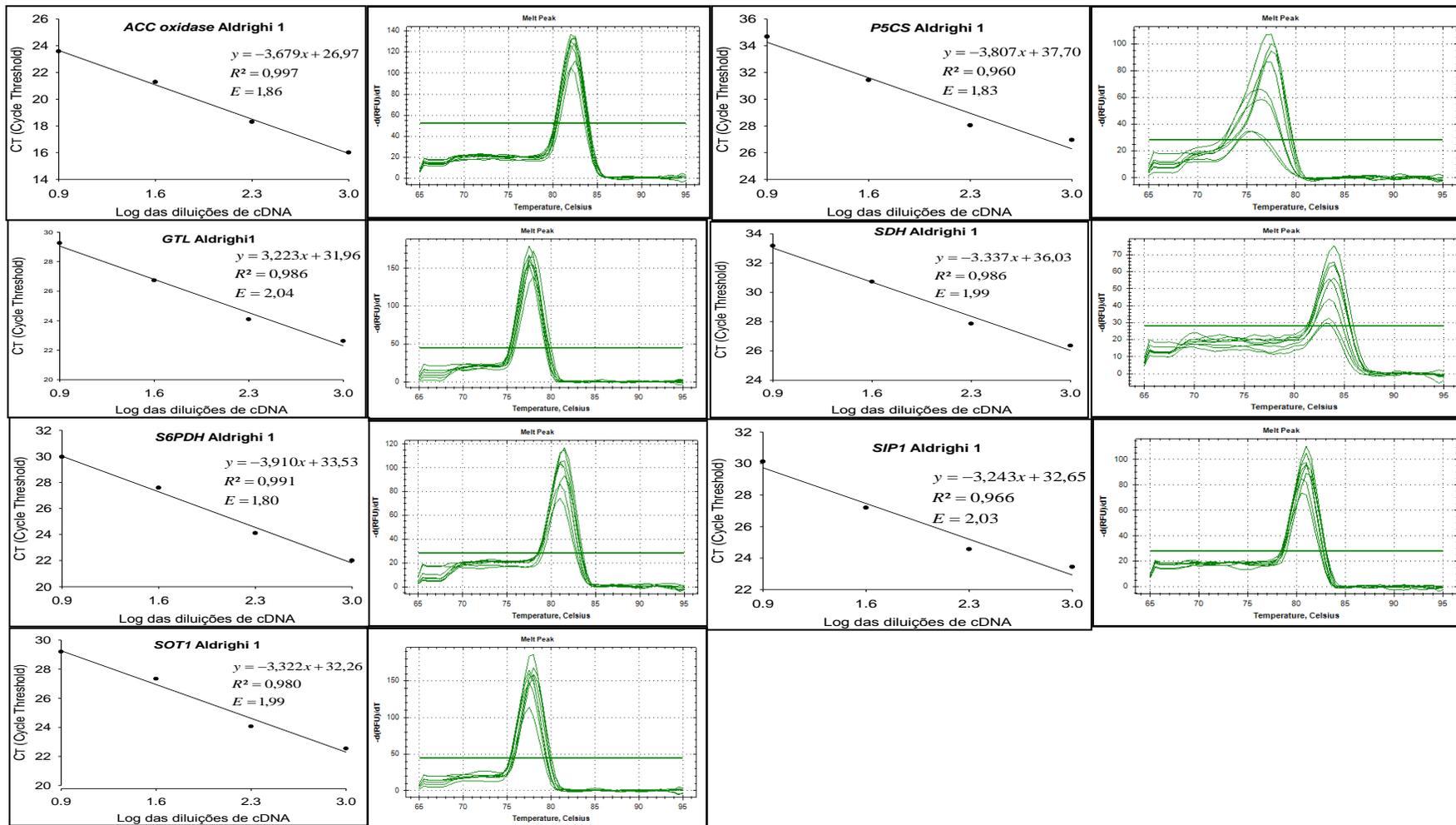


Figura 1. Eficiência e especificidade dos sete *primers* testados em folhas de pessegueiro cultivar copa ‘Chimarrita’ enxertada sobre o portaenxerto ‘Aldrichi 1’ submetidos ao déficit hídrico por diferentes períodos.

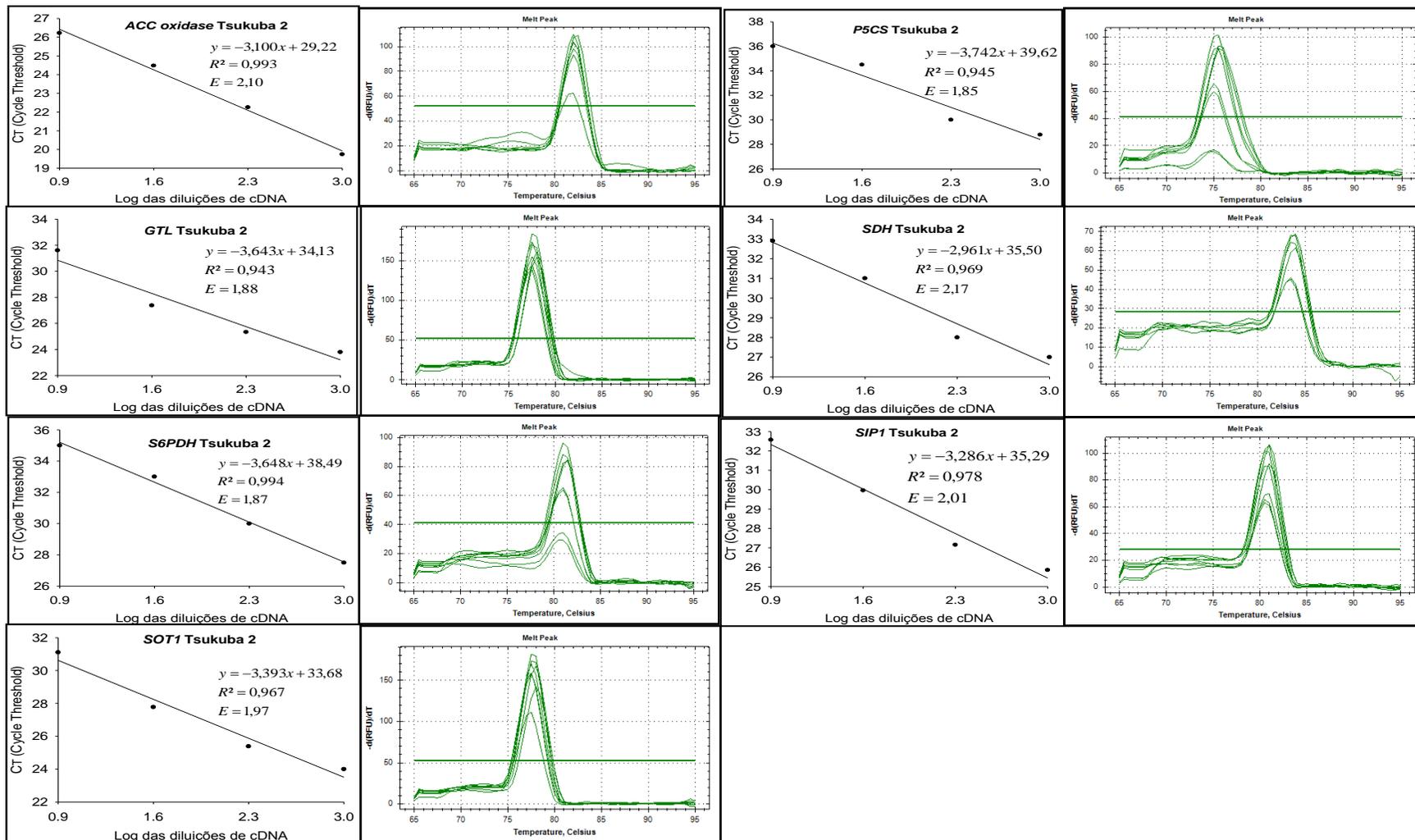


Figura 2. Eficiência e especificidade dos sete *primers* testados em folhas de pessegueiro cultivar copa ‘Chimarrita’ enxertada sobre o portaenxerto ‘Tsukuba 2’ submetidos ao déficit hídrico por diferentes períodos.

RESULTADOS

Para avaliar a existência de respostas moleculares iniciais ao déficit hídrico, a expressão de genes envolvidos na síntese dos principais osmólitos acumulados foram avaliados em folhas da cultivar copa Chimarrita enxertada sobre o portaenxerto 'Aldrighi 1' e 'Tsukuba 2' mediante déficit hídrico por um período de nove dias.

Os *primers* testados mostraram-se eficientes e específicos, com eficiências próximas a 100%, variando entre 1,80 e 2,17 para ambas as combinações 'Chimarrita'/portaenxertos (Figuras 1 e 2). Os coeficientes de determinação (R^2), para todos os *primers* testados, foram acima do valor mínimo aceitável de 0,7 ou 70% (PFAFFL, 2001). A especificidade da amplificação é determinada pela presença de um único pico na curva de dissociação (*Melting*). Nesta curva analisa-se a fluorescência das amostras em relação ao aumento contínuo da temperatura, sendo que cada *amplicon* possui uma temperatura de fusão específica, o que possibilita diferenciar os produtos resultantes da PCR. As curvas de dissociação apresentadas demonstraram que os pares de *primers* analisados possuem um pico único bastante definido, confirmando especificidade do produto amplificado.

Em relação à expressão relativa dos sete genes analisados neste estudo, é possível verificar que ao longo do período de estresse, estes se apresentaram *up-regulated* (regulação positiva) e *down-regulated* (regulação negativa) perante o controle (QR= 1,0). Para ambas as combinações 'Chimarrita'/portaenxertos, a expressão dos genes *ACC oxidase* e *SOT1* (Figura 3A e 3B) mostraram-se reprimida (*down-regulated*) comparados ao controle, em todos os dias de avaliação do déficit hídrico (4°, 7° e 9° dias), sendo que a expressão do *ACC oxidase* no sétimo dia de estresse para 'Chimarrita/Tsukuba 2' (Figura 3A), apresentou-se quase nula (QR= 0,088), enquanto que para 'Chimarrita/Aldrighi 1', obteve-se valores de expressão cinco vezes menor (QR= 0,222) comparado ao controle (QR= 1,0). Para esta mesma combinação cultivar/portaenxerto, o gene *GTL* (Figura 3D), também se apresentou reprimido ao longo do tempo, enquanto que para 'Chimarrita/Tsukuba 2' foi o gene *P5CS* que teve sua expressão aumentada (Figura 3E), sendo que no sétimo dia, sua expressão relativa foi igual a do controle (QR= 1,0)

Para 'Chimarrita/Aldrighi 1', os genes *P5CS* e *SIP1* se mostraram altamente expressos (*up-regulated*) em relação ao controle no sétimo dia de estresse, porém para outros genes, tais como *S6PDH* (Figura 3G), essa alta expressão foi verificada no quarto dia de estresse. Já para a combinação 'Chimarrita/Tsukuba 2', o gene *S6PDH* mostrou-se altamente expresso no quarto dia de estresse, enquanto os genes *SDH* e *GTL* apresentaram aumento significativo na expressão apenas no sétimo dia.

Para ambas as combinações 'Chimarrita'/portaenxertos, o gene que apresentou maior nível de expressão foi o *S6PDH*, que no quarto dia de estresse aumentou cerca de 6,74 vezes o nível de expressão comparado ao controle na combinação 'Chimarrita/Tsukuba 2', e 6,41 vezes para 'Chimarrita/Aldrighi 1', diminuindo drasticamente a sua expressão nos dias subsequentes do estresse (7° e 9° dias).

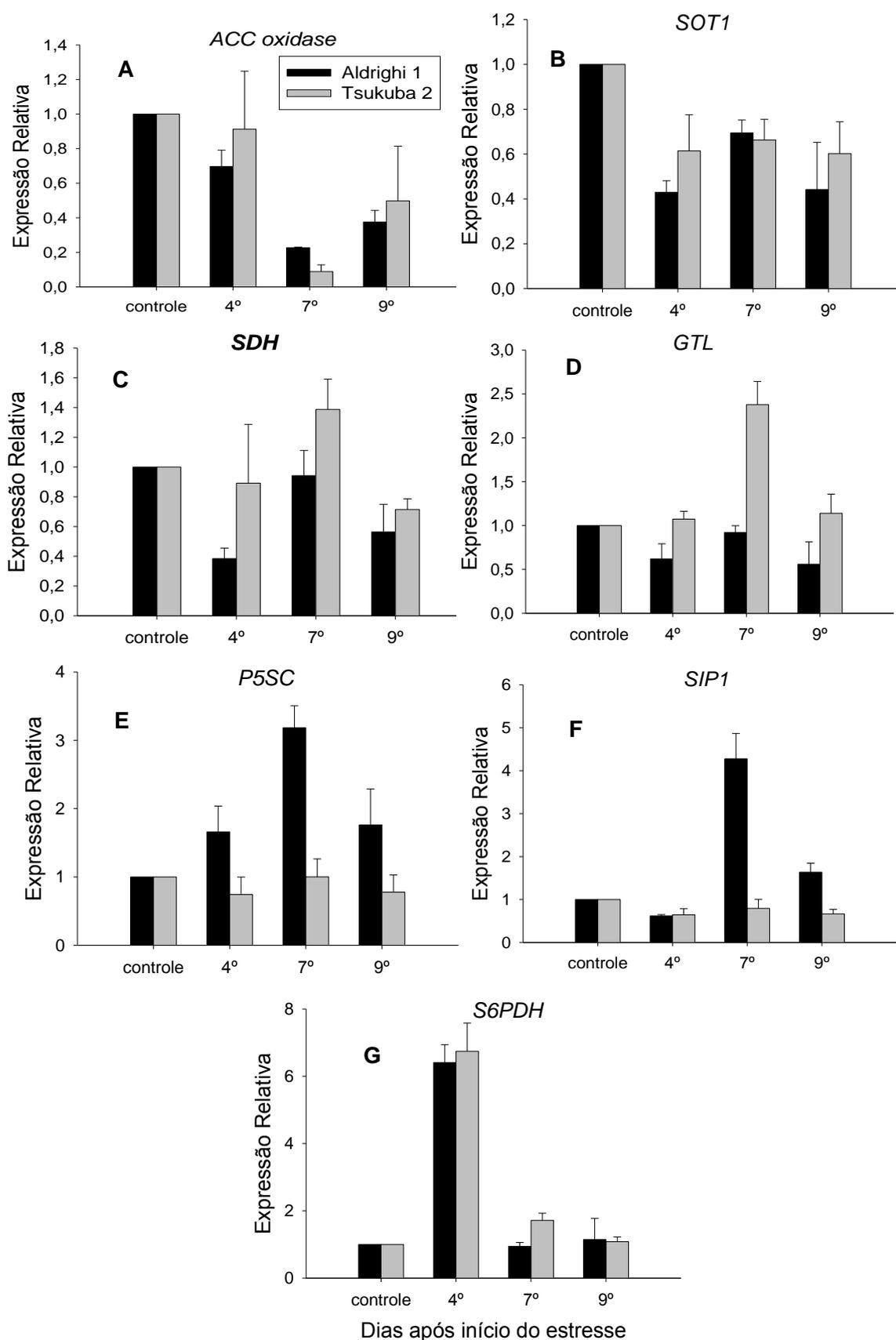


Figura 3. Expressão relativa dos genes *ACC oxidase*, *SOT1*, *SDH*, *GTL*, *P5CS*, *SIP1* e *S6PDH* em folhas de pessegueiro cultivar copa 'Chimarrita' enxertadas sobre os portaenxertos 'Adrighi 1' e 'Tsukuba 2', submetidos ao déficit hídrico. As barras indicam erro padrão (n=3).

DISCUSSÃO

Estresses abióticos, como o déficit hídrico, desencadeiam uma série de respostas nas plantas, começando com a percepção do estresse, o que leva à ativação de vias de sinalização e alteração dos níveis de expressão dos genes, conseqüentemente, alterando a fisiologia, o crescimento e desenvolvimento vegetal (YAMAGUCHI; BLUMWALD, 2005, YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2006).

Entre as mudanças metabólicas induzidas nas plantas quando submetidas a estresses abióticos, destaca-se o acúmulo significativo de uma mistura complexa de ácidos orgânicos, açúcares e aminoácidos, que tem sido denominado de “ajustamento osmótico”, que pode estar relacionada como típica resposta de tolerância ao déficit hídrico em plantas (MAHAJAN; TUTEJA, 2005, MENESES et al., 2006, KRASENSKY; JONAK, 2012, JIMÉNEZ et al., 2013, MARIJUAN; BOSCH, 2013, SALAZAR; HERNÁNDEZ; PINO, 2015).

A função primordial dos osmorreguladores ou solutos compatíveis é de manter o turgor celular e seus condutores de gradientes para captação da água, permitindo a continuidade dos processos de crescimento vegetal, expansão, divisão celular e fotossíntese (KRASENSKY; JONAK, 2012, BANDURSKA, PLACHTA; WOSZCZYK, 2009, JIMÉNEZ et al., 2013). Genes envolvidos na síntese e no acúmulo de osmólitos estão entre os membros deste grupo (JIMÉNEZ et al., 2013). Dentre as moléculas osmoprotetoras destaca-se o aminoácido prolina, que mediante déficit hídrico reduz o potencial osmótico celular, mantendo o equilíbrio hídrico, entre o vacúolo e o citoplasma, bem como, servindo como reserva de carbono e nitrogênio, utilizado no restabelecimento da planta após o estresse (ASHRAF et al., 2011, MARIJUAN; BOSCH, 2013).

Além dos processos envolvidos na síntese de prolina, vários outros genes são expressos em resposta ao déficit hídrico, dentre eles os que codificam transcritos de enzimas que atuam na rota de produção e/ou transporte de outras moléculas envolvidas na osmoproteção, destacando-se os genes sorbitol desidrogenase (*SDH*), rafinose sintase (*SIP1*), sorbitol-6-fosfato-desidrogenase (*S6PDH*), pirrolina-5-carboxilato sintetase (*P5CS*), cuja expressão foi avaliada no presente estudo.

Entre os inúmeros genes diferencialmente expressos em resposta ao estresse hídrico, muitos estão relacionados ao metabolismo de carboidratos, pois o déficit hídrico pode provocar alterações nos níveis de carboidratos e, conseqüentemente,

na expressão dos genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo destas moléculas.

A família dos oligossacarídeos da rafinose (RFOs) apresenta diversas funções nas plantas, sendo utilizados para o transporte e armazenamento de carbono e como solutos compatíveis para a proteção da planta contra estresses abióticos, entre eles, o déficit hídrico. A biossíntese de rafinose inicia-se a partir da formação de galactinol, subsequentemente, o galactinol doa a unidade de galactose para uma molécula de sacarose, formando a rafinose, sendo a enzima rafinose sintase, responsável por essa reação (CASTILLO et al., 1990, PETERBAUER; RICHTER, 2001). Neste estudo, o gene *SIP1*, que codifica para enzima rafinose sintase, aumentou sua expressão em 4,27 vezes no sétimo dia de estresse para a combinação 'Chimarrita/Aldrighi 1', evidenciando a participação deste açúcar na osmoproteção mediante déficit hídrico. Corroborando isso, Jiménez et al. (2013) também verificaram aumento significativo na expressão deste gene em folhas de portaenxertos de *Prunus* submetidos ao déficit hídrico durante 16 dias. Assim como, Gimeno, Gadea e Forment (2009), que também verificaram aumento na expressão deste gene em plantas de *citrus* submetidos ao déficit hídrico.

Por outro lado, a cultivar Chimarrita enxertada sobre 'Tsukuba 2' não apresentou níveis significativos de expressão deste gene, que foi reprimido (*down-regulated*) em relação às plantas controle, em todo o período de estresse, evidenciando que há resposta diferencial a nível de expressão gênica mediante diferentes combinações de cultivar copa/portaenxerto submetidos ao déficit hídrico.

Assim como *SIP1*, o gene *P5CS* também apresentou altos níveis de expressão, 3,18 vezes maior comparado ao controle, na combinação 'Chimarrita/Aldrighi 1'. Esse gene codifica a enzima que regula a taxa de biossíntese de prolina, bem como, inibe a sua degradação (VERBRUGGEN; VILLARROEL; VAN MONTAGU, 1993, KISHOR, 2005, SILVA et al., 2010). A síntese de prolina é aumentada sob estresse osmótico, enquanto seu catabolismo é reprimido. Esse efeito foi verificado na combinação 'Chimarrita/Tsukuba 2', que apresentou a expressão *down-regulated* para este gene em todos os dias de estresse. Jiménez et al. (2013) não observaram alteração nos níveis de expressão do gene *P5CS* mediante déficit hídrico em folhas de quatro portaenxertos de *Prunus*, ao contrário do que foi observado nas raízes, onde apresentaram expressão significativa para o

portaenxerto 'GF 677' e também correlação positiva com os níveis de prolina. Em estudo recente, as isoformas de *OsP5CS1* e *OsP5CS2* foram co-expressas em tabaco, no qual, conferiram às plantas transgênicas, acúmulo de prolina e redução dos danos oxidativos nas células sob condições de estresses abióticos (ZHANG et al., 2014).

A família das Rosaceas inclui frutíferas importantes, como por exemplo, macieira, pereira, pessegueiro, damasqueiro, ameixeira e cerejeira, e o principal açúcar translocado via floema, é o sorbitol (BIELESKI, 1982, LOSCHER, 1987). Nesta família, as plantas são capazes de carregá-los passivamente no floema e translocar o sorbitol e sacarose via simplasto, contribuindo assim para o potencial osmótico da célula, evitando a regulação por retroalimentação (SLEWINSKI; BRAUN, 2010). Em pessegueiro, este açúcar representa cerca de 60-90% do carbono exportado nas folhas (MOING et al., 1997). Recentemente, foram identificados os cDNAs que codificam transportadores de sorbitol (*PcSOT1* e *PcSOT2*) em cerejeira (*Prunus cerasus*) (GAO et al., 2003), os quais apresentaram alta expressão nos frutos.

No presente estudo, a expressão do gene *SOT1*, que codifica transportadores de sorbitol, foi *down-regulated* em ambas as combinações da cultivar-copa/portaenxertos ao longo do estresse, possivelmente por uma inativação do sistema de regulação de carboidratos, não contribuindo para manter o potencial osmótico perante o estresse imposto. Em condições de déficit hídrico, espera-se que estes transportadores aumentem a sua expressão, para que haja direcionamento de sorbitol para o crescimento radicular, possivelmente como forma de aumentar a capacidade das plantas para absorverem água, portanto, isto não foi verificado neste estudo, sugerindo que possivelmente aos nove dias as plantas não estavam com um índice de restrição hídrica elevado, ou seja, ainda tinham níveis de sorbitol bons, não influenciando a taxa de expressão dos transportadores. Por outro lado, em folhas e raízes de portaenxertos somaclonais de *Prunus* submetidos ao alagamento por seis dias, Pistelli et al. (2012) verificaram maior taxa de expressão deste gene nas raízes (aproximadamente 2,5 vezes) em relação a parte aérea para o clone S.4.

A sorbitol desidrogenase é uma enzima oxiredutora que catalisa a oxidação de sorbitol em frutose com posterior obtenção de energia para célula (LOSCHER, 1987). A expressão do gene *SDH* diminuiu (*down-regulated*) perante o controle em

ambas as combinações de cultivares, com exceção do sétimo dia de estresse para a cultivar Chimarrita enxertada sobre 'Tsukuba 2', cujo nível de expressão mostrou-se *up-regulated* 1,38 vezes, enquanto que para combinação 'Chimarrita/Aldrighi 1' a expressão foi *down-regulated* (0,94), evidenciando o comportamento diferencial da combinação cultivar copa/portaenxerto mediante as condições impostas. Corroborando os dados do presente estudo, Jiménez et al. (2013), ao analisarem a expressão deste mesmo gene em raízes dos portaenxertos 'Cadaman' e 'GF 677' verificaram correlação entre os níveis de sorbitol com a expressão do mesmo ao 16 dias de déficit hídrico, no entanto, verificaram níveis menores de sorbitol com o prolongamento do estresse (26 dias).

Outra importante enzima chave na biossíntese de sorbitol é a sorbitol-6-fosfato desidrogenase. Em nêspereira, um aumento na acumulação de sorbitol mediante tratamento com frio, foi correlacionado com um aumento na atividade de S6PDH (HIRAI, 1983). A acumulação deste açúcar em plantas é modificada em resposta às condições ambientais. Por exemplo, em folhas de macieira, os fotoassimilados são convertidos para sorbitol em vez de sacarose (PAN; QUEBEDEAUX, 1995).

Neste estudo, o gene *S6PDH* mostrou-se altamente expresso em ambas as combinações 'Chimarrita'/portaenxerto no quarto dia de estresse, diminuindo drasticamente no sétimo e nono dias. Embora não se tenha quantificado este açúcar, isso leva a sugerir que o aumento na atividade de *S6PDH* pode estar intimamente relacionado com a quantidade de sorbitol presente nestas plantas.

Segundo Kanamaru et al. (2004), o aumento na atividade de *S6PDH* está intimamente relacionado ao processo fotossintético, pois ativa a síntese de sorbitol, através do fornecimento de mais substratos, ou seja, dos fotossintatos ou aumentando os produtos da hidrólise do amido. A alta expressão deste gene (4º dia de estresse) observadas neste estudo em ambas as combinações 'Chimarrita'/portaenxerto, pode estar relacionada com a diminuição da expressão do gene que oxida o sorbitol (*SDH* - Figura 3C), assim como dos transportadores de sorbitol (*SOT1* - Figura 3B), como foi verificado no presente estudo. Segundo Li; Li (2005), essa reduzida degradação de sorbitol, poderia explicar o aumento da acumulação de sorbitol em folhas mediante déficit hídrico. No entanto, no sétimo dia de estresse, para a combinação 'Chimarrita/Tsukuba 2', os níveis de expressão do

gene *SDH* se mostraram elevados (1,38 vezes), comportamento contrário foi verificado para a expressão de *S6PDH*, onde neste mesmo dia apresentou valores de expressão 1,71, corroborando a argumentação de Li; Li (2005), que sob déficit hídrico o aumento da atividade do gene que catalisa o sorbitol (*SDH*) é inversamente proporcional a acumulação deste açúcar.

Jiménez et al. (2013) registraram baixa expressão do gene *S6PDH* em condições de déficit hídrico em folhas de portaenxertos de *Prunus*. Já Zhang et al. (2011) verificaram correlação com a alta expressão de *S6PDH* e com o conteúdo de sorbitol em folhas de macieira submetidos ao estresse osmótico induzido por PEG-6000, sugerindo que este gene desempenhou um papel importante na resposta ao estresse osmótico.

Vários são os grupos de glicosiltransferases nas plantas, e estas participam de reações de transferência de açúcares para um vasto grupo de moléculas receptoras (ROSS et al., 2001; ASPEBORG; SCHRADER; COUTINHO, 2005). Estas enzimas são importantes na formação e degradação dos compostos pécnicos e na ausência de sua atividade, podem reduzir o conteúdo de ácidos galacturônicos, principais constituintes da pectina, ou seja, menor adesão entre as células foliares e radiculares, facilitando a desidratação dessas (BOUTON; LEBOEUF; MOUILLE, 2002). A expressão do gene *GTL* neste estudo, apresentou-se bastante pronunciada, 2,37 vezes no sétimo dia de estresse para a combinação 'Chimarrita/Tsukuba 2', evidenciando a participação deste gene na síntese de compostos pécnicos, no qual a possibilidade de aumentar a tolerância ao estresse hídrico, pode estar relacionada ao aumento de síntese de cadeias pécnicas, nas quais estes compostos podem atuar como agentes gelificantes bem como, anti-dessecantes (LEUCCI et al., 2008).

Um dos principais mecanismos de defesa das plantas ao déficit hídrico é a regulação estomática para minimizar a perda de água por transpiração, assim, mantendo o turgor celular por um período maior (LARCHER, 2000, MARTINAZZO et al., 2013). Com o fechamento estomático, há uma diminuição da difusão de CO₂ para o mesófilo foliar, ocasionando assim, redução da taxa fotossintética, afetando o acúmulo de fotoassimilados (SANTOS et al., 2004). As plantas diminuem a área de transpiração mediante um rápido e reversível enrolamento das folhas, (as quais são protegidas pela cutícula) e pelo estímulo da abscisão foliar. O aumento nos níveis de

fitohormônios, tais como, etileno e ABA nas folhas, induz a abscisão foliar e o fechamento estomático respectivamente, permitindo assim, um domínio maior na perda de água (CHAVES; FLEXAS, 2009, TAIZ; ZEIGER, 2009, SALAZAR; HERNÁNDEZ; PINO, 2015).

A biossíntese de etileno tem como precursor o aminoácido metionina: a conversão da metionina em S-adenosil-metionina (SAM) requer o gasto de uma molécula de ATP e uma de H₂O. O oxigênio é essencial no final da reação para que ocorra a conversão de 1-amino-cliopropano-1-carboxílico (ACC) em etileno. Portanto, duas enzimas são consideradas chave na síntese de etileno, a ACC sintase, que forma ACC, e a ACC oxidase que forma etileno em presença de oxigênio (TAIZ; ZEIGER, 2009). Sob déficit hídrico, uma estreita relação entre a expressão de ACC e síntese de etileno foi demonstrada em *Citrus* (GÓMEZ-CADENAS et al., 1996). O ACC move-se via xilema, da raiz para a parte aérea, mostrando uma associação entre sua expressão e aumento nos níveis de etileno foliar (LIU et al., 2006).

Neste estudo, a expressão do gene que codifica para a ACC oxidase, *ACO1* apresentou-se reprimido (*down-regulated*) para ambas as combinações 'Chimarrita'/portaenxertos em todo o período de estresse.

No entanto, estudos comprovam que plantas submetidas a diferentes estresses abióticos têm seus níveis de etileno alterados (GÓMEZ-CADENAS et al., 1996, GIL et al., 2009, PISTELLI et al., 2012, LARRAINZAR, et al., 2014). Adicionalmente, tem sido verificado que a ação de complexos receptores de etileno resulta na inativação de sítios receptores envolvidos na transferência de sinalização ao etileno (BINDER; BLEECKER, 2003). Portanto, a ação do etileno é negativamente regulada pelo número de sítios receptores disponíveis, determinando a resposta a este hormônio (HUA; MEYEROWITZ, 1998).

Desse modo, possivelmente plantas sob estresse hídrico exibam poucos sítios receptores para o etileno, o que poderia diminuir sua sensibilidade a este fitohormônio, não resultando na abscisão foliar como foi verificado neste estudo (dados não mostrados), estando esta resposta relacionada com os baixos níveis de expressão do gene que o codifica, evidenciando que aparentemente o etileno pode agir como um regulador negativo em plantas sob este tipo de estresse.

Pistelli et al. (2012), em trabalho realizado com alagamento em portaenxertos de *Prunus* Mr.S. 2/5 e seus clones (S.1 e S.4), que divergem quanto à tolerância ao alagamento, verificaram alta expressão do gene *ACO1* (aproximadamente oito vezes) em tecidos foliares do clone S.1 após seis dias de exposição a este estresse, e que também estas plantas, foram severamente danificadas, mostrando murchamento e forte epinastia das folhas, no qual pode ser correlacionado com os altos níveis de expressão verificados.

Através deste estudo onde se avaliou a expressão de genes envolvidos em processos de tolerância ao déficit hídrico com diferentes combinações de copa/portaenxertos, foi possível verificar que há variabilidade genética nestas combinações testadas, onde os genes *SDH*, *GTL*, *P5SC* e *SIP1* mostraram padrões de expressão bastante diferenciados para as duas combinações de copa/portaenxertos testadas. Além do mais, o gene *S6PDH* apresentou expressão bastante pronunciada e similar para ambas as combinações copa/portaenxertos no quarto dia de estresse, evidenciando a participação e importância do sorbitol no ajustamento osmótico para uma possível tolerância ao déficit hídrico.

Por fim, foi possível evidenciar que o déficit hídrico causa mudanças fisiológicas nas plantas, e isto apresenta bases moleculares e genéticas, além do mais, pode ocorrer expressão diferencial de genes numa mesma espécie, dependendo do nível (tempo) de estresse imposto, dessa forma, toda expressão fenotípica está relacionada à expressão gênica e a sua interação com o ambiente.

CONCLUSÕES

Mediante a condição de estresse imposta e com a tecnologia utilizada no desenvolvimento do presente estudo, podemos concluir que:

- Houve indução de resposta diferencial da combinação 'Chimarrita'/portaenxertos em relação à expressão dos genes relacionados ao ajustamento osmótico, tais como, *SDH*, *SIP1*, *GTL* e *P5CS*.

- A expressão dos genes relacionados ao metabolismo de carboidratos e de prolina podem ser utilizados como marcadores moleculares para identificar variabilidade para a tolerância ao déficit hídrico em *Prunus persica*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMADA, R.; ARISMENDI, M. J.; PIMENTEL, P.; ROJAS, P.; HINRICHSEN, P.; PINTO, M.; SAGREDO, B. Class 1 non-symbiotic and class 3 truncated hemoglobin-like genes are differentially expressed in stone fruit rootstocks (*Prunus* L.) with different degrees of tolerance to root hypoxia. **Tree Genetics & Genomes**, v. 9, p. 1051-1063, 2013.

ARISMENDI, M. J.; ALMADA, A.; PIMENTEL, P.; BASTIAS, A.; SALVATIERRA, A.; ROJAS, P.; HINRICHSEN, P.; PINTO, M.; DI GENOVA, A.; TRAVISANY, D.; MAASS, A.; SAGREDO, B. Transcriptome sequencing of *Prunus* sp. rootstocks roots to identify candidate genes involved in the response to root hypoxia. **Tree Genetics & Genomes**, v. 11, p. 1-16, 2015.

ASHRAF, M.; AKRAM, N. A.; ALQURAINY, F.; FOOLAD, M. R. Drought tolerance: roles of organic osmolytes, growth regulators, and mineral nutrients. **Advances in Agronomy**, v. 111, p. 249-296, 2011.

ASPEBORG, H.; SCHRADER, J.; COUTINHO, P. M. Carbohydrate-active enzymes involved in the secondary cell wall biogenesis in hybrid Aspen. **Plant Physiology**, v. 137, p. 983-997, 2005.

BANDURSKA, H.; PLACHTA, M.; WOSZCZYK, M. Seasonal patterns of free proline and carbohydrate levels in cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) and ivy (*Hedera helix*) leaves and resistance to freezing and water deficit. **Dendrobiology**, v. 62, p. 3-9, 2009.

BIELESKI, R. L. Sugar alcohols. In: Loewus A, Tanner W, eds. Encyclopedia of plant physiology. **Plant carbohydrates**, v. 13, p. 158-192, 1982.

BINDER, B. M.; BLEECKER, A. B. A model for ethylene receptor function and 1-methylcyclopropene action. **Acta Horticulturae**. v. 628, p. 177-187, 2003.

BOUTON, S.; LEBOEUF, E.; MOUILLE, G. QUASIMODO1 encodes a putative membrane-bound glycosyltransferase required for normal pectin synthesis and cell adhesion in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 14, p. 2577-2590, 2002.

CASTILLO, E. M.; DE LUMEN, B. O.; REYES, P. S.; DE LUMEN, H. Z. Raffinose synthase and galactinol synthase in developing seeds and leaves of legumes, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 351-355. 1990.

CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 11, p. 113-116, 1993.

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

FACHINELLO, J. C.; BIANCHI, V. J. **Porta-enxertos para frutas de caroço: banco ativo de germoplasma (BAG) e atividades de pesquisa na UFPel**. In: Simpósio Brasileiro de Recursos Genéticos, 2005, Pelotas. Resumos e Palestras. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. v. 1, p. 3-107, 2005.

GAO, Z.; MAUROUSSET, L.; LEMOINE, R.; YOO, S. D.; VAN NOCKER, S.; LOESCHER, W. Cloning, expression, and characterization of sorbitol transporters from developing sour cherry fruit and leaf sink tissues. **Plant Physiology**. v. 131, p. 1566-1575, 2003.

GIL, P. M.; GUROVICH, L.; SCHAFFER, B.; GARCIA, N.; ITURRIAGA, R. Electrical signaling, stomatal conductance, ABA and ethylene content in avocado trees in response to root hypoxia. **Plant Signaling & Behavior**, v. 4, p. 100-108, 2009.

GIMENO, J.; GADEA, J.; FORMENT, J. Shared and novel molecular responses of mandarin to drought. **Plant Molecular Biology**, v. 70, p. 403-420, 2009.

GÓMEZ-CADENAS, A.; TADEO, F. R.; TALON, M.; PRIMO-MILLO, E. Leaf abscission induced by ethylene in water-stressed intact seedlings of Cleopatra mandarin & requires previous abscisic acid accumulation in roots. **Plant Physiology**, v. 112, p. 401-408, 1996.

HIRAI, M. Seasonal changes in sorbitol-6-phosphate dehydrogenase in loquat leaf. **Plant Cell Physiology**. v. 24, p. 925-931, 1983.

HUA, J.; MEYEROWITZ, E. M. Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Cell**, v. 94, p. 261-271, 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Banco de Dados**. Disponível em:

<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp?t=2&z=t&o=11&u1=34&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u2=34>. Acesso em 22 de julho de 2015.

JIMÉNEZ, S.; DRIDI, J.; GUTIÉRREZ, D.; MORET, D.; IRIGOYEN, J. J.; MORENO, M. A.; GOGORCENA, Y. Physiological, biochemical and molecular responses in four *Prunus* rootstocks submitted to drought stress. **Tree Physiology**, v. 33, p. 1061-1075, 2013.

KANAMARU, N.; ITO, Y.; KOMORI, S.; SAITO, M.; KATO, H.; TAKAHASHI, S., OMURA, M.; SOEJIMA, J.; SHIRATAKE, K.; YAMADA, K.; YAMAKI, S. Transgenic apple transformed by sorbitol-6-phosphate dehydrogenase cDNA switch between sorbitol and sucrose supply due to its gene expression. **Plant Science**. v. 167, p. 55-61, 2004.

KIM, J. Y.; PARK, S. J.; JANG, B.; JUNG, C. H.; AHN, S. J.; GOH, C. H.; CHO, K.; HAN, O.; KANG, H. Functional characterization of a glycine-rich RNA-binding protein 2 in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. **The Plant Journal**, v. 50, p. 439- 451, 2007.

KRASENSKY, J.; JONAK, C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. **Journal Experimental Botany**. v. 63, p. 1593-1608, 2012.

KISHOR, P. B. K. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current Science**, v. 88, p. 424-438, 2005.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: RIMA, 2000, 531p.

LARRAINZAR, E.; MOLENAAR, J. A.; STEFANIE WIENKOOP, S.; QUINTANA, E.G.; ALIBERT, B.; LIMAMI, A. M.; ARRESE-IGOR, C.; GONZÁLEZ, E. M. Drought stress provokes the down-regulation of methionine and ethylene biosynthesis pathways in *Medicago truncatula* roots and nodules. **Plant Cell and Environment**, v. 37, p. 2051-2063, 2014.

LEUCCI, M. R.; LENUCCI, M. S.; PIRO, G.; DALESSANDRO, G. Water stress and cell wall polysaccharides in the apical root zone of wheat cultivars varying in drought tolerance. **Journal Plant Physiology**, v. 165, p. 1168-1180, 2008.

LI, T. H.; LI, S. H. Leaf responses of micropropagated apple plants to water stress: nonstructural carbohydrate composition and regulatory role of metabolic enzymes. **Tree Physiology**, v. 25, p. 495-504, 2005.

LIU, F.; VANTOAI, L.; MOY, P. M.; BOCK, G.; LINFORD, L. D.; QUACKENBUS, J. Global transcription profiling reveals comprehensive insights into hypoxic response in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 137, p. 1115-1129, 2006.

LOESCHER, W. H. Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants. **Plant Physiology**, v. 70, p. 553-557, 1987.

LUO, X.; SHI, T.; SUN, H.; SONG, J.; NI, Z.; GAO, Z. Selection of suitable inner reference genes for normalization of microRNA expression response to abiotic stresses by RT-qPCR in leaves, flowers and young stems of peach. **Scientia Horticulturae**, v. 165, p. 281-287, 2014.

MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: an overview, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 444, p. 139-158, 2005.

MALLONA, I.; LISCHEWSKI, S.; WEISS, J.; HAUSE, B.; EGEE-CORTINES, M. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida*. **BMC Plant Biology**, v. 10:4, p. 1-11, 2010.

MARIJUAN, M. P.; BOSCH, S. M. Ecophysiology of invasive plants: osmotic adjustment and antioxidants. **Trends in Plant Science**, v. 18, p. 660-666, 2013.

MARTINAZZO, E. G.; PERBONI, A. T.; OLIVEIRA, P. V.; BIANCHI, V. J.; BACARIN, M. A. Atividade fotossintética em plantas de ameixeira submetidas ao déficit hídrico e ao alagamento. **Ciência Rural**, v. 43, p. 35-41, 2013.

MATSUMURA, H.; ITO, A.; SAITOH, H.; WINTER, P.; KAHL, G.; REUTER, M.; KRUGER, D. H.; TERAUCHI, R. SuperSAGE. **Cell Microbiology**, v. 7, p. 11-18, 2005.

MENESES, C. H. S. G.; LIMA, L. H. G. M.; LIMA, M. M. A.; VIDAL, M. S. Aspectos genéticos e moleculares de plantas submetidas ao déficit hídrico. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibras**, v. 10, p. 1039-1072, 2006.

MERCIER, V.; BUSSI, C.; LESCOURRET, F.; GENARD, M. Effects of different irrigation regimes applied during the final stage of rapid growth on an early maturing peach cultivar. **Irrigation Science**, v. 27, p. 297-306, 2009.

MOING, A.; CARBONNE, F.; ZIPPERLIN, B.; SVANELLA, L.; GAUDILLÈRE, J.P. Phloem loading in peach: symplastic or apoplastic?. **Plant Physiology**, v. 101, p. 489-496, 1997.

NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 1-7, 2014.

NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER N.; FARIAS, J. R. B. Tolerância à seca em plantas: Mecanismos fisiológicos e moleculares. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 23, p. 12-18, 2001.

PAN, Q.; QUEBEDEAUX, B. Effects of elevated CO₂ on sorbitol partitioning in sink and source of apple leaves. **HortScience**, v. 30, p. 770, 1995.

PETERBAUER, T.; RICHTER, A. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. **Seed Science Research**, v. 11 p. 185-197, 2001.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression algorithm tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 1-10, 2002.

PISTELLI, L.; LACONA, C.; MIANO, D.; CIRLLI, M.; COLAO, M. C.; MENSUALI-SODI, A.; MULEO, R. Novel *Prunus* rootstock somaclonal variants with divergent ability to tolerate waterlogging. **Tree Physiology**, v. 32, p. 355-368, 2012.

RASMUSSEN, R. P. Quantification on the Light Cycler. In: Meuer S, Wittwer CT and Nakagawara K (eds) Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications. 1st edition. Springer Press, Heidelberg, p. 21-34, 2001.

RIPOLL, J.; URBAN, L.; STAUDT, M.; LOPEZ-LAURI, F.; BIDEL, L. P. R.; BERTIN, N. Water shortage and quality of fleshy fruits-making the most of the unavoidable. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, p. 2-21, 2014.

ROCHA, M. D. S.; BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C.; SCHMITZ, J. D.; PASA, M. S.; SILVA, J. B. Comportamento agrônômico inicial da cv. Chimarrita enxertada em cinco porta-enxertos de pessegueiro. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 29, p. 583-588, 2007.

ROSS, J.; LI, Y.; LIM, E.; BOWLES, D.J. Higher plant glycosyltransferases. **Genome Biology**, v. 2, p. 1-6, 2001.

SALAZAR, C.; HERNÁNDEZ, C.; PINO, M. T. Plant water stress: Associations between ethylene and abscisic acid response. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 75, p. 71-79, 2015.

SANTOS, T. T.; SANTOS, M.; MENDONÇA, M.; SILVA JUNIOR, C.; SILVA-MANN, R.; ARRIGONI-BLANK, M. D. F.; BLANK, A. F. Efeito do estresse hídrico na produção de massa foliar e teor de óleo essencial em sambacaitá (*Hyptis pectinata* L.). **Anais do Congresso Brasileiro de Olericultura**, 44, Campo Grande: SOB, v. 22, 2004, p.1-4.

SCHMITZ, J. D.; BIANCHI, V. J.; PASA, M. S. P.; SOUZA, A. L. K.; FACHINELLO, J. C. Vigor e produtividade do pessegueiro 'Chimarrita' sobre diferentes portaenxertos. **Revista Brasileira Agrociência**, v. 18, p.1-10, 2012.

SHAO, H. B.; CHU, L. Y.; JALEEL, C. A.; ZHAO, C. X. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, p. 215-225, 2008.

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

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**, v. 69, p. 279-285, 2010.

SLEWINSKI, T. L.; BRAUN, D. M. Current perspectives on the regulation of whole-plant carbohydrate partitioning. **Plant Science**, v. 178, p. 341-349, 2010.

STRECK, E. V.; KÄMPF, N.; DALMOLIN, R. S. D.; KLAMT, E.; NASCIMENTO, P. C.; SCHNEIDER, P.; GIASSON, E.; PINTO, L. F. S. **Solos do Rio Grande do Sul**. 2.ed. Porto Alegre: UFRGS, 2008. 222p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 918p.

TIMM, LUÍS CARLOS et al. **Manejo da Irrigação na Cultura do Pessegueiro**: manual técnico. Pelotas: Ed. da Universidade Federal de Pelotas, 2007a, 110p.

TIMM, L. C.; JUNIOR, C. R.; TAVARES, V. E. Q.; MADAIL, J. C. M.; MANKE, G.; LEMOS, F. D.; TAVARES, L. C.; RADUNZ, A. L.; LISBOA, H.; PRESTES, R. B.; MORO, M. Caracterização dos persicultores irrigantes e dos métodos de irrigação no pólo produtivo de pêsego da região de Pelotas. **Revista Brasileira Agrociência**, v. 13, p. 413-417, 2007b.

TRAN, L. S. P.; NAKASHIMA, K.; SAKUMA, Y.; OSAKABE, Y.; QIN, F.; SIMPSON, S. D.; MARUYAMA, K.; FUJITA, Y.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Coexpression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the ERD1 gene in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 49, p. 46-63, 2007.

VERBRUGGEN, N.; VILLARROEL, R.; VAN MONTAGU, M. Osmoregulation of a pyrroline-5 carboxylate reductase gene in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology** v.1 03, p. 771-781, 1993.

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

WANG, H.; WANG, F.; WANG, G.; MAJOURHAT, K. The responses of photosynthetic capacity, chlorophyll fluorescence and chlorophyll content of nectarine (*Prunus persica* var. *Nectarina Maxim*) to greenhouse and field grown conditions **Scientia Horticulturae**, v. 112, p. 66-72, 2007.

WANG, D.; GARTUNG, J. Infrared canopy temperature of early-ripening peach trees under postharvest deficit irrigation. **Agricultural Water Management**, v. 97, p. 1787-1794, 2010.

YAMAGUCHI, T.; BLUMWALD, E. Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. Trends in **Plant Science**, v. 10, p. 615-620, 2005.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p.7 81-803, 2006.

ZHANG, J. Y.; TIAN, R. R.; DONG, J. L.; ZHAO, K.; LI, T. H.; WANG, T. Response and regulation of the *S6PDH* gene in apple leaves under osmotic stress. **Journal Horticultural Science Biotechnology**, v. 86, p. 563-568, 2011.

ZHANG, X.; TANG, W.; LIU, J.; LIU, Y. Co-expression of rice *OsP5CS1* and *OsP5CS2* genes in transgenic tobacco resulted in elevated proline biosynthesis and enhanced abiotic stress tolerance. **Chinese Journal of Applied and Environmental Biology**, v. 20, p. 717-722, 2014.

Considerações Finais

O presente trabalho permitiu obter dados bastante valiosos e auxiliou na elucidação de algumas respostas fisiológicas e moleculares em plantas de pessegueiro (*Prunus persica*) submetidos ao déficit hídrico. Foi possível observar diferentes comportamentos a nível fisiológico e molecular na combinação da cultivar copa Chimarrita enxertada sobre dois portaenxertos, sendo que essas respostas ao déficit hídrico induzida por diferentes portaenxertos são ainda muito escassas. Estudos que visem à tolerância de portaenxertos à estresses abióticos, entre eles, o déficit hídrico, são fundamentais para a descoberta de novos marcadores moleculares.

Para tanto, é de fundamental importância que outras análises sejam realizadas para complementação deste estudo, tais como análises moleculares do sistema radicular para verificar a expressão dos genes envolvidos na tolerância ao déficit hídrico. Também é de grande valia, quantificar os principais açúcares e correlacioná-los com o nível de expressão gênica, além do mais, quantificar também os níveis de prolina tanto em raízes como nas folhas.

Genes envolvidos em outras rotas metabólicas, tais como na biossíntese de ABA, Poliaminas, no metabolismo fotossintético, assim como as aquaporinas, poderiam ampliar o entendimento das respostas, a fim de obter marcadores para auxiliar na identificação e seleção de genótipos com maior tolerância ao estresse por déficit hídrico. Tudo isso corrobora a grande necessidade de ampliar as pesquisas nessa área, sobretudo em função das mudanças climáticas globais que vêm ocorrendo a fim de obter portaenxertos de *Prunus* sp. com características bem adaptadas às condições climáticas das principais regiões produtoras de pessegueiro, para atender a demanda crescente de consumo desta fruta.