

**VARIABILIDADE GENÓTIPICA DE AMENDOIM SUBMETIDO AO
ESTRESSE HÍDRICO BASEADA EM DESCRITORES BIOQUÍMICOS**

GERCKSON MACIEL RODRIGUES ALVES

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA

**CAMPINA GRANDE-PB
FEVEREIRO DE 2013**

**VARIABILIDADE GENÓTIPICA DE AMENDOIM SUBMETIDO AO
ESTRESSE HÍDRICO BASEADA EM DESCRITORES BIOQUÍMICOS**

GERCKSON MACIEL RODRIGUES ALVES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Ciências Agrárias/Área de concentração: Agrobioenergia e Agricultura Familiar.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Roseane Cavalcanti dos Santos

**Coorientadores: Prof^º. Dr. Péricles de A. Melo filho e Prof^ª. Dra. Liziane
Maria de Lima**

**CAMPINA GRANDE-PB
FEVEREIRO DE 2013**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL-UEPB

A474v

Alves, Gerckson Maciel Rodrigues.

Variabilidade genotípica de amendoim submetido ao estresse hídrico baseada em descritores bioquímicos. [manuscrito] / Gerckson Maciel Rodrigues Alves. – 2013.

41 f.; il.

Digitado

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Centro de Ciências Humanas e Agrárias, Universidade Estadual da Paraíba, 2013.

“Orientação: Profa. Dra. Roseane Cavalcanti dos Santos, EMBRAPA”

1. Genética vegetal. 2. Enzimas antioxidativas. 3. Solutos orgânicos. 4. *Arachis hypogaea L* I. Título.

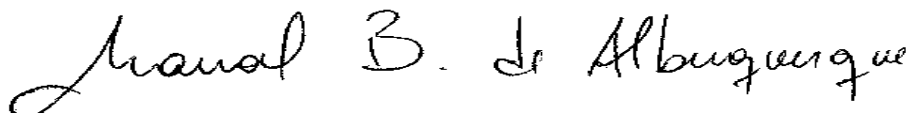
21. ed. CDD 581.3

VARIABILIDADE GENÓTIPICA DE AMENDOIM SUBMETIDO AO ESTRESSE HÍDRICO BASEADA EM DESCRITORES BIOQUÍMICOS

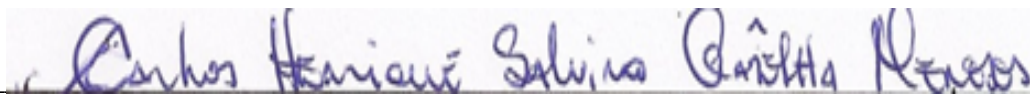
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Ciências Agrárias/Área de concentração: Agrobioenergia e Agricultura Familiar.

Aprovada em 28 de Fevereiro de 2013.

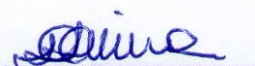
Banca Examinadora:



Prof^o Dr. Manoel Bandeira de Albuquerque (D.Sc., Biologia) - UFPB



Dr. Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses (D.Sc., Ciências Agrárias) - UEPB



Prof^a. Liziane Maria de Lima (D. Sc. Biologia Molecular) Embrapa Algodão
Coorientadora



Prof^a. Roseane Cavalcanti dos Santos (D. Sc. Biologia Molecular) Embrapa Algodão
Orientadora

A DEUS por estar ao meu lado em todos os momentos de minha vida; a minha mãe, ao meu pai, meus irmãos e irmãs e a todos que estiveram do meu lado, me dando forças e que nunca me abandonaram nos momentos difíceis que enfrentei durante a caminhada para chegar até aqui.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela minha vida e oportunidades proporcionadas, pela minha família, pela compreensão de minhas dificuldades e estando sempre ao meu lado em todos os momentos me possibilitando forças para superá-las e alcançar mais uma vitória em minha vida.

A minha família em especial aos meus pais José e Maria aos meus irmãos (Marcelo e Jadson) e as minhas irmãs (Mariana e Mayra) por todo incentivo, paciência, por acreditarem em mim, pelo apoio prestado e independente de qualquer coisa sei que posso contar com eles.

A minha orientadora, Prof^a. Roseane Cavalcante dos Santos, pelo carinho que me acolheu em sua equipe, pelo apoio, por confiar em meu trabalho, orientação, pelos conhecimentos passados que ajudaram em meu crescimento profissional, que levarei por toda a minha vida.

A minha namorada Ana Clézia, pelo amor, compreensão, incentivo, companheirismo, força prestada nos momentos difíceis, e por nunca ter me abandonado mesmo ficando muito tempo longe dela.

Aos meus Coorientadores Prof. Péricles A. Melo Filho e Liziane Maria de Lima pelo apoio, atenção e sugestões.

Aos meus tios pela força, apoio e confiança depositada em mim.

Aos meus amigos Ivomberg Dourado, Marcelo Barbosa, Renner Ferraz, Flávio Costa, Rosinaldo Sousa, Sebastião Maia, Savigny Barreto, pelo apoio prestado, amizade, sinceridade e humildade; Thiago Prates e Du Lopes por terem me acolhido em sua casa como se fosse um membro de sua família; Kaline Veiga, Rosana Muniz, Jacqueline Pereira, Maria Isabel, Yrlânia Guerra, Jessica Oliveira, Thiago Oliveira, que considero como irmãos e em especial a Nilson, Augusto Fernandes e Felipe Telles por toda ajuda prestada durante a montagem do experimento e desenvolvimento do mesmo e Jacqueline Pereira por está ao meu lado das análises a escrita deste trabalho, pelos seus ensinamentos prestados, paciência, compreensão e apoio.

A seu “Ivaldo” pelos seus conhecimentos repassados.

A todos os Professores do programa que contribuíram para a minha formação acadêmica.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa que viabilizou parte dos estudos.

A todos os motoristas que me deram carona durante essa jornada.

A todos os meus amigos que me ajudaram de forma direta ou indireta pela torcida e apoio para chegar a essa vitória.

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Objetivo Geral.....	16
1.2. Objetivos Específicos.....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. Mercado e cultivares de amendoim no Brasil.....	18
2.2. Fisiologia do amendoim diante do estresse hídrico.....	19
2.3. Papel dos componentes celulares em resposta ao estresse hídrico.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Condução do experimento.....	24
3.2. Análises bioquímicas.....	25
3.4. Análise estatística.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5. CONCLUSÕES	34
REFERÊNCIAS	35

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Síntese de alguns descritores agronômicos dos genótipos de amendoim deste estudo.....	24
TABELA 2.	Síntese da análise de variância para os descritores bioquímicos de amendoim submetidos ao estresse hídrico.....	28
TABELA 3.	Média dos solutos orgânicos PT, AA, PRO, CARB, analisados em folhas de genótipos de amendoim submetidos ao déficit hídrico.....	29
TABELA 4.	Média das atividades das enzimas antioxidativas CAT, GPX, APX ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$) analisadas em folhas de genótipos de amendoim submetidos a déficit hídrico.....	31
TABELA 5.	Parâmetros genéticos e ambientais gerados a partir das médias dos descritores.....	32

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Detalhe da casa de vegetação onde o experimento foi conduzido e arranjo dos genótipos durante o cultivo..... 25
- FIGURA 2.** Detalhe de um dos genótipos (Senegal 55437) submetido a estresse hídrico. A-7 dias de estresse, B. 15 dias de estresse..... 27

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT - catalase

APX - ascorbato peroxidase

GPX - glutamato peroxidase

EROs - espécies reativas de oxigênio

$O_2^{\bullet-}$ - superóxido de hidrogênio

H_2O_2 - peróxido de hidrogênio

$\bullet OH$ - radical hidroxílico

1O_2 - oxigênio singleto

SOD - superoxido dismutase

O_2 - oxigênio

CO_2 - gás carbônico

PT- proteínas totais

AA- aminoácidos

PRO- prolina

CARB- carboidratos

RESUMO

ALVES, GERCKSON MACIEL RODRIGUES. M.Sc; Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão, Fevereiro)2013. **Variabilidade genotípica de amendoim submetido ao estresse hídrico baseado em descritores bioquímicos.** Roseane Cavalcanti dos Santos (Orientadora); Péricles de Albuquerque Melo filho e Liziane Maria de Lima (Coorientadores).

As variantes relacionadas aos mecanismos de adaptação das plantas a estresses ambientais, associados a outros processos fisiológicos e bioquímicos, têm sido largamente estudados em várias culturas, visando compreendê-los para, posteriormente, guiar os melhoristas nas melhores estratégias para avançar nos programas de melhoramento visando tolerância a estresses ambientais. Embora a maioria das respostas dependa da herança de genes envolvidos e de sua expressão em nível tissular, os vários eventos em cascata que são desencadeados durante o estresse dependem de outros fatores, sendo os bioquímicos de fundamental importância devido a participação dos solutos orgânicos em resposta ao dano celular causado devido ao estresse. O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma oleaginosa herbácea cultivada em várias regiões do Brasil, apresentando larga adaptação ambiental, tanto em ambientes de clima tropical quanto semiárido. Apesar desta plasticidade, vários estudos tem demonstrado que, em condições de regime hídrico normal, a capacidade de produção do amendoim é naturalmente elevada, sendo que, em ambientes onde há tendência de veranicos, a produção pode sofrer impacto entre 30% a 40% dependendo da duração e da fase fonológica em que o evento ocorre. Considerando-se a importância desta cultura, especialmente para agricultores do segmento familiar, situados na região Nordeste, é imprescindível que se identifiquem, nos processos de seleção dos programas de melhoramento, linhagens de larga variabilidade genética, com perspectiva de serem posteriormente indicadas para atender as demandas dos agricultores regionais. Neste trabalho, uma população gerada por meio de cruzamentos interespecíficos, composta de quatro linhagens avançadas, foi utilizada para estimar sua habilidade de tolerar estresse hídrico moderado, visando estimar a variabilidade genotípica para este caráter, baseando-se em descritores enzimáticos e

solutos orgânicos. Os genótipos foram cultivados em vasos, em casa de vegetação. Aos 20 dias após a emergência, procedeu-se a diferenciação dos tratamentos, sendo discriminados em Controle, as plantas rega durante 15 dias. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, com esquema bi-fatorial 6x2 (genótipos x tratamentos hídricos), e 5 repetições. As variáveis bioquímicas avaliadas foram: atividades das enzimas catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e da glutamato peroxidase (GPX), teores de prolina livre, carboidratos totais, proteínas solúveis e aminoácidos. Baseado nos resultados das análises bioquímicas e de estimativa da variabilidade genotípica, a prolina demonstrou ser o descritor mais adequado para seleção de genótipos tolerantes ao estresse hídrico, contribuindo para indicar as linhagens L81V e L108V como mais promissoras, para um programa de melhoramento visando tolerância a seca.

Palavras-chave: enzimas antioxidativas, solutos orgânicos, tolerância a seca, *Arachis hypogaea* L.

ABSTRACT

ALVES, GERCKSON MACIEL RODRIGUES. M.Sc; Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão, Fevereiro)2013. **Penaut genotypic variability subjected to water estress based biochemical descriptors.** Roseane Cavalcanti dos Santos (Orientadora); Péricles de Albuquerque Melo filho e Liziane Maria de Lima (Coorientadores).

The variants related to the mechanisms of plant adaptation to environmental stresses associated with other physiological and biochemical processes, have been widely studied in several crops in order to understand them and further, to guide the breeders on best strategies to advance in improvement programs related to tolerance to environmental stresses. Although most of the answers depend on the inheritance of genes involved and their expression in tissue level, the various cascade events that are triggered during stress depend on other factors, and biochemical is quite relevant due to the participation of organic solutes in response to cellular damage caused by stress. Peanut (*Arachis hypogaea* L.) is an oilseed herbaceous cultivated in various Brazilian regions, with broad environmental adaptation in both environments as semi-arid and tropical climates. Despite this plasticity, several studies have shown that under normal watering, the production is often high, but in environments with tendency to 'short summer's, production can be impacted between 30% to 40% depending on duration and phase in which phonological event occurs. Considering the importance of this crop, especially for short farmers located in the Northeast region, it is essential to identify, in breeding programs, lines of wide genetic variability, for further recommendation to regional farmers. In this work we use a bulk, generated by interspecific crosses and composed of four advanced lines, to estimate their ability to tolerate moderate water stress, aiming to estimate the genotypic variability for this character, based on descriptors enzymatic and organic solutes. The genotypes were grown in pots in a greenhouse. At 20 days after emergence, we proceeded to the differentiation of treatments discriminated in Control, plants maintained with daily watering, and Stress, plants subjected to full suspension of watering for 15 days. The experimental design was completely randomized

bi-factorial scheme with 6 x 2 (genotype x water treatments) and with 5 repetitions. The biochemical variables were assessed: catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and glutamate peroxidase (GPX) activities, free proline, total carbohydrates, soluble proteins and amino acids contents. Based on the results of biochemical analysis and estimation of genotypic variability, proline proved to be the most appropriate descriptor for selection of genotypes tolerant to water stress, contributing to indicate strains L81V and L108V as the most promising for a breeding program aimed to drought tolerance.

Keywords: oxidative enzymes, organic solutes, drought tolerance, *Arachis hypogaea* L.

1. INTRODUÇÃO

A região Nordeste do Brasil é caracterizada pela ocorrência de chuvas irregulares e por temperaturas elevadas, que podem levar a longos períodos de estiagem. Tais condições limitam a maior expressividade da cultura, além de aumentar os riscos de diminuição da safra, principalmente quando estas são cultivadas em regime de sequeiro (SANTOS et al., 2010).

As plantas cultivadas sob condições de baixa disponibilidade hídrica desenvolvem mecanismos de adaptação, morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, na tentativa de minimizar os efeitos causados pelo estresse (FAROOQ et al., 2009; MAFAKHERI et al., 2010; WASEEM et al., 2011).

A velocidade e intensidade da resposta são o que diferenciam um material tolerante de um mais sensível. De acordo com Munns (2002), a redução no crescimento e na produção das plantas em ambientes com limitação hídrica é resultante dos efeitos osmóticos e das diferenças nas respostas de ativação de fatores fisiológicos e bioquímicos para combater o estresse.

Entre as respostas bioquímicas, o acúmulo de solutos orgânicos tais como, aminoácidos, carboidratos e amido, é um dos mais expressivos em função dos vários metabólitos que são desencadeados no processo de transdução de defesa. Nesse aspecto, as enzimas desempenham papel fundamental na resposta à injúria, especialmente as antioxidativas, envolvidas na proteção celular contra as espécies reativas de oxigênio - EROs (SHARMA et al., 2012).

As EROs são formas reduzidas do oxigênio molecular altamente reativas, que incluem o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxílico ($\cdot OH$) e o oxigênio singleto (1O_2). Todas essas formas se encontram na célula vegetal como subprodutos normais do metabolismo aeróbico e de processos fotooxidativos (APEL; HIRT, 2004; KARUPPANAPANDIAN et al., 2009; PEREIRA et al., 2012). Por serem altamente reativos, podem alterar o metabolismo celular devido aos danos oxidativos aos lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (AZEVEDO NETO et al., 2009; FOYER; NOCTOR, 2005).

Em plantas, várias enzimas antioxidativas estão envolvidas na defesa celular contra os radicais livres, sendo mais importantes a superóxido dismutase (SOD), catalisadora da

dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 , a catalase (CAT) e a ascorbato peroxidase (APX) que podem quebrar o H_2O_2 em H_2O e O_2 . Segundo alguns esta regulação se perde em condições de estresse severo uma vez que ocorre aumento na produção de radicais livres, desencadeando uma série de eventos, iniciando-se com a peroxidação de lipídeos, seguidos de degradação de membranas e morte celular (APEL; HIRT, 2004; AZEVEDO NETO et al., 2009; KARUPPANAPANDIAN et al., 2009; PEREIRA et al., 2012).

Em programas de melhoramento que visem obtenção de genótipos tolerantes a estresses abióticos, o entendimento destes mecanismos bioquímicos contribui para nortear as etapas de seleção uma vez que tais procedimentos baseados só em descritores agrônômicos podem ficar mascarado em função das variáveis extrínsecas associadas ao manejo.

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma oleaginosa herbácea de larga adaptação ambiental e habilidade de se ajustar fisiologicamente quando detecta situação de estresse hídrico (AZEVEDO NETO et al., 2009). Dentre as habilidades, citam-se o aprofundamento das raízes, a rápida recuperação dos estômatos que ocorre, com o alívio do estresse e a capacidade de acumular prolina, sendo que a expressão desse soluto é maior nas plantas resistentes. Apesar da larga adaptação, a resposta de tolerância do amendoim ao estresse é genótipo-dependente, sendo maior na espécie *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* e menor na *A. hypogaea* subsp. *hypogaea* (SANTOS; GODOY; FÁVERO 2005).

A identificação de materiais tolerantes auxilia não apenas na seleção de genitores para cruzamento como também na indicação de genótipos superiores para avançar nos trabalhos de melhoramento. Utilizando ferramentas moleculares para selecionar genitores aptos para gerar populações divergentes, Santos et al., (2013), focalizando em descritores associados a tolerância ao semiárido, geraram uma população a partir da cultivar BR 1 (*A. hypogaea* subsp. *fastigiata*) e a linhagem LViPE- 06 (*A. hypogaea* subsp. *hypogaea*), cujos descendentes revelaram elevada variabilidade genética para vários descritores agrônômicos de interesse para o melhoramento. Neste trabalho, as quatro melhores linhagens desse cruzamento foram submetidas a estresse hídrico moderado, visando estimar a variabilidade genotípica para este caráter, baseando-se em descritores enzimáticos e solutos orgânicos.

1.1. Objetivo geral

Estimar a variabilidade genotípica em linhagens de amendoim, baseando-se em descritores enzimáticos e solutos orgânicos.

1.2. Objetivos específicos

✓ Estimar a resposta dos genótipos ao estresse hídrico quanto à atividade enzimática, baseando-se nas atividades da catalase, ascorbato peroxidase e guaiacol peroxidase.

✓ Estimar a resposta dos genótipos ao estresse hídrico quanto aos solutos orgânicos, com enfoque em: prolina livre, carboidratos solúveis, aminoácidos e proteínas solúveis.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Mercado e cultivares de amendoim no Brasil

O amendoim cultivado (*Arachis hypogaea* L.) é uma oleaginosa que contém em suas sementes importante fonte de proteína e óleo, cujos grãos são utilizados para consumo *in natura* e para atender o mercado de alimentos, especialmente nos segmentos de confeitaria e da indústria de óleo, gerando divisas e empregos diretos e indiretos (FREIRE et al., 2005; PARENTE et al., 2003). Trata-se de lavoura mundialmente cultivada, com uma produção de 31,48 milhões de toneladas em grãos e de 6 milhões de toneladas de óleo, sendo China, Índia e EUA os principais produtores mundiais (FAO, 2010; USDA, 2010).

No Brasil, a produção do amendoim situa-se em 300.000 toneladas, obtida nas regiões Sudeste, Sul, Centro-Oeste e Nordeste (CONAB 2012). Nesta última região, a lavoura do amendoim é uma atividade de grande interesse por parte de pequenos e médios agricultores que vivem da agricultura familiar. O fácil manejo, ciclo curto e preço atraente do produto no mercado, com possibilidades de agregação de renda, são fatores que têm contribuído para expansão da área cultivada na região, atualmente situada em 15.000 ha, correspondendo a cerca de 14% da área nacional.

No aspecto de consumo, as regiões de maior demanda são Sudeste e Nordeste. Nesta última, o maior volume de comercialização ocorre nos meses de maio a julho, devido às festividades juninas e eventos populares que ocorrem no período. Todavia, a produção obtida na região, na faixa de 15.000 t, atende apenas a 28% da demanda do mercado, equivalente a 50.000 t em grãos destinados para os mercados de alimento (consumo *in natura* e confeitaria) e óleo. Outro fator importante, especialmente para agricultura familiar, é o uso da matéria seca como alternativa na alimentação animal devido ao alto teor nutritivo, com cerca de 13% de proteína bruta, superior a palha de feijão e o capim elefante com 5% e 18%, respectivamente (ROCHA e HEMP, 1995). As cascas de amendoim são importante fonte de fibras, correspondendo 30% do peso total da planta após o beneficiamento (MELOTTI et al., 1998).

De acordo com Santos et al., (2005), o mercado de grãos de amendoim está muito diversificado em relação aos padrões da matéria-prima. A cor da película é um critério fundamental, dependendo do segmento de mercado. Para o de consumo *in natura*, por exemplo, os grãos de película vermelha são os preferidos. Para o mercado de confeitaria ou oleoquímico, a maior demanda é por cultivares rasteiras, do tipo *runner*, que possuem película clara, ciclo longo e elevado teor de óleo nas sementes, acima de 48% (GODOY et al., 2005; GODOY et al., 1999; SANTOS et al., 2005).

As pesquisas envolvendo melhoramento genético do amendoim tiveram início na década de 40, quando o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) introduziu e avaliou germoplasma nativo ou cultivares americanas para distribuição aos agricultores (GOMES, 2007). No final da década de 80, tiveram início as pesquisas desenvolvidas pela Embrapa Algodão, focalizada na região Nordeste, cujos principais objetivos são obter cultivares com produções estáveis, com larga adaptação ambiental e com resistência a fatores bióticos e abióticos (SANTOS, et al., 2005).

Atualmente há 25 cultivares registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA, a maioria desenvolvida pelo Instituto Agrônomo de Campinas, IAC, para a região Sudeste, e pela Embrapa, para o Nordeste. Entre as cultivares comerciais, cerca de 60% são eretas para atender o mercado de alimentos; as restantes são do tipo *runner* que se destacam pela elevada produção e alto teor de óleo. São, contudo, materiais de ciclo longo, acima de 120 dias, e hábito de crescimento rasteiro, adaptados a colheita mecanizada.

Apesar da grande versatilidade dessa cultura em termos de adaptação ambiental, torna-se necessário o conhecimento do potencial produtivo de genótipos, especialmente os de ciclo curto, para fugir das intempéries climáticas, de modo a se recomendar, posteriormente, com maior confiabilidade, cultivares de alta estabilidade às condições fisiogeográficas regionais.

2.2. Fisiologia do amendoim diante do estresse hídrico

As plantas quando mantidas em condições ideais de ambiente tem funcionamento metabólico normal garantindo seu crescimento e, conseqüentemente, sua produção. Contudo, durante sua fenologia, as maiorias das plantas estão sujeitas a algum tipo de estresse, biótico e/ou abiótico, cujo período e intensidade vão influenciar na produção final da cultura (MANAJAN e TUTEJA, 2005).

Dentre os estresses de maior impacto negativo na produção, citam-se os de origem abiótica, em especial o hídrico. Isso porque a baixa disponibilidade hídrica no solo afeta diretamente a cultura e, conseqüentemente, diversos processos fisiológicos e bioquímicos são comprometidos. Normalmente, o estresse causado pela seca impõe à planta alterações no crescimento, nas relações hídricas e nutricionais, na fotossíntese e na produtividade (FAROOQ et al., 2009). Segundo Pimentel (2004), o estresse causado pela deficiência hídrica ocorre devido a fatores sazonais envolvendo redução da disponibilidade de água no solo ou a variações da demanda transpiratória da região. Independentemente da situação, o estresse hídrico é o principal fator limitante para o avanço das lavouras, em ambientes de clima semiárido.

O amendoim é uma oleaginosa herbácea conhecida pela sua habilidade em conviver em ambientes com baixa disponibilidade hídrica (PEREIRA et al., 2012; NOGUEIRA e SANTOS, 2000; SANTOS, 2005). Segundo Farooq et al., (2009), em resposta ao déficit hídrico, o amendoim apresenta mecanismos fisiológicos e morfológicos intrínsecos para manter a turgescência, entre eles, a redução do potencial hídrico, o fechamento dos estômatos e o acúmulo de solutos orgânicos. Nogueira e Santos (2000), complementam esses mecanismos, incluindo a grande habilidade da planta em aprofundar suas raízes para extração de água. Desta forma, ocorre um adiamento da dissecação durante a estação da seca; a produção, entretanto, provavelmente será reduzida, uma vez que a absorção de água de maior profundidade pode não ser suficiente para suprir toda a demanda evaporativa da cultura (BOOTE et al., 1982). Alguns autores citam que a raiz é a primeira parte da planta que percebe o estresse e através de sinais bioquímicos, sinaliza às folhas para o fechamento dos estômatos, evitando a perda de água através da transpiração (MORGAN, 1990; TAYLOR, 1991; TURNER et al., 2001).

A habilidade de tolerar mais ou menos restrição hídrica está associada com o tipo botânico da cultura, sendo as plantas eretas, de ciclo curto, mais tolerante (SANTOS et al., 2010). Independente dessa característica, em resposta a falta de água, as plantas desencatilham vários eventos fisiológicos sendo mais comum o ajustamento osmótico onde elas se ajustam para manter o potencial hídrico e a turgescência das células próximas ao nível adequado. Tais processos são conseguidos por meio do acúmulo de solutos orgânicos de baixo peso molecular no citosol, destacando-se açúcares solúveis, prolina e aminoácidos livres (NEPOMUCENO et al., 2001).

Para Nogueira e Távora (2005), mesmo apresentando mecanismos de adaptação a seca, a planta do amendoim é mais afetada quando a seca ocorre na fase reprodutiva, mais especificamente nas fases envolvendo a floração e enchimento dos frutos. Tais eventos tem sido amplamente estudados em cultivares nacionais e internacionais, cujos resultados tem servido de

base para nortear o programa de melhoramento de amendoim para o semiárido, desenvolvido pela Embrapa Algodão. Um exemplo do aproveitamento destes estudos culminou com o desenvolvimento da cultivar BRS 151 L7, a mais precoce da Embrapa e de larga adaptação ao ambiente semiárido (GOMES et al., 2007; NOGUEIRA et al., 2006; SANTOS, 2000). Tal cultivar foi gerada por meio de cruzamentos entre um genitor paulista (IAC TUPÃ) e africano (Senegal 55437), esse último indicado por Nogueira et al., (1998), como altamente tolerante ao estresse hídrico.

2.3. Papel dos componentes celulares em resposta ao estresse hídrico

Os componentes celulares dos tecidos vegetais tem uma dinâmica de atividade permanente, constituída de vários eventos genéticos, bioquímicos e fisiológicos, dos quais, os metabólitos primários e secundários tem papel fundamental. A partir da percepção de ‘risco’, oriundo de um evento biótico ou abiótico, a maquinaria de defesa celular toma seu lugar de modo a defender a célula, desencadeando eventos em cascata com a participação efetiva dos solutos orgânicos e das enzimas antioxidativas. A produção de tais componentes na célula dependerá, quase que exclusivamente, do nível de tolerância da planta ao agente causador do dano. Em termos fisiológicos, quanto mais adulta estiver a planta, a possibilidade da resposta de defesa será um tanto maior, embora, a constatação da tolerância dependerá da herança dos genes envolvidos para responder a tal ação.

Um dos danos mais prejudiciais às células, causados tanto por estresse biótico ou abiótico, é a produção de radicais livres, essencialmente, as espécies reativas de oxigênio (EROs). Tais espécies são produzidas constantemente por processos fisiológicos, sendo consideradas principais mediadoras dos danos oxidativos aos componentes celulares. As moléculas tóxicas são formadas nas plantas enquanto as funções metabólicas acontecem ou, ainda, quando elas se expõem a fatores ambientais, tais como exposição a níveis elevados de luminosidade, seca, metais pesados, alta concentração de sais, extremos de temperatura, radiação UV, poluição do ar, herbicidas, estresse físico e mecânico e também como resposta a estresses bióticos tais como o ataque de patógenos (MALLICK e RAI, 1999; MITTLER, 2002; EAUX, 2007).

Em nível de localização, as espécies reativas de oxigênio acontecem, principalmente, nos cloroplastos e mitocôndrias, devido a alta atividade de oxidação, sendo que, a geração de nos cloroplastos está associada à fotossíntese (SOARES e MACHADO, 2007).

De acordo com Mittler (2002), as EROs funcionam como mensageiros secundários

envolvidos na via de transdução de sinais na resposta ao estresse e podem ser vistas como indicadores de estresse. Estas espécies são responsáveis por danos, muitas vezes irreversíveis, em componentes celulares, caracterizando o chamado estresse oxidativo. Tais espécies incluem superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxílico ($\cdot OH$) e oxigênio singlete (1O_2), os quais se encontram na célula vegetal como subprodutos normais do metabolismo aeróbico e de processos fotooxidativos (APEL e HIRT, 2004; GILL et al., 2010; KARUPPANAPANDIAN et al., 2011).

O peróxido de hidrogênio tem a sua importância para os meios biológicos devido a sua capacidade de gerar um radical hidroxila quando está sobre a presença de metais pesados, por esse motivo o peróxido é considerada uma ERO. É um radical livre de carga, o que facilita a passagem pela camada da membrana celular (CAVERZAN, 2008). Como consequência, o peróxido de hidrogênio pode oxidar várias moléculas orgânicas como o ascorbato (ASC) (REZENDE, 2003).

O sistema de defesa das plantas contra o estresse biótico ou abiótico envolve várias enzimas antioxidativas nos diferentes compartimentos celulares, além de sistemas não enzimáticos. O sistema enzimático envolve a formação de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX), além de guaicol peroxidase (GPX). Nos eventos de cascata de defesa, a SOD é a primeira enzima envolvida, tendo como função catalisar a dismutação do superóxido, para manter baixos níveis desse radical. A seguir, têm-se as APX e GPX que atuam na conversão do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (APEL e HIRT, 2004).

Focalizando, especificamente, no estresse hídrico, alguns autores reportam que, sob estresse moderado, há limitação da fotossíntese devido a menor difusão de CO_2 para o interior da folha, devido o fechamento estomático (BOYER, 1978).

Com o dessecamento dos tecidos, o transporte de elétrons, a fotofosforilação a síntese de ATP são reduzidos, diminuindo, por sua vez, a capacidade de regeneração da RuBP (PIMENTEL, 2005). Outros eventos que ocorrem envolvem distorções na parede celular, ruptura e lise de membranas do cloroplasto e mitocôndrias, além de outras organelas. Em nível de metabolitos primários, há redução na síntese de RNA e aumento das ribonucleases, interferindo na redução da síntese proteica e atividade enzimática da célula (VIEIRA da SILVA, 1976). De acordo com Bray (2002), que procedeu a um estudo de expressão diferencial de genes durante o estresse hídrico em *Arabidopsis thaliana*, pelo menos 130 genes são ativados no nível do metabolismo celular em resposta ao estresse hídrico. Liu e Vance, (2003), que procederam ao mesmo estudo em girassol, identificaram cinco sequências de genes homólogos relacionadas a

estresse hídrico e salinos, entre eles alguns genes de kinases, *Lyt B*, poliproteínas e outras ainda estudadas quanto às suas funções. Em amendoim, Jain et al., (2001) identificaram transcritos sub e superexpressos a partir de genótipos resistente a seca. Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki (1999) sugeriram que genes induzidos pela falta d'água são ativados por duas rotas de percepção e transmissão do sinal de estresse: um ABA-dependente e ou outro ABA-independente.

À medida que o estresse hídrico se intensifica, a fotoinibição é aumentada e os efeitos podem ser irreversíveis (BJORKMAN e POWLES, 1994). De acordo com Long et al., (1994), só a fotoinibição responde por 10% de redução no potencial produtivo das culturas. Em termos de solutos orgânicos, sob estresse moderado, a concentração de carboidratos solúveis (sacarose, frutose e glicose) é aumentada devido a manutenção de uma certa taxa de assimilação de CO₂, com paralisação do crescimento (BOYER, 1978). Tal alteração vai ativar as respostas da planta à deficiência hídrica, como no ajustamento osmótico, o qual é realizado apenas por algumas plantas (KRAMER e BOYER, 1995).

O ajuste osmótico e o acúmulo de prolinas são mecanismos de resposta fisiológico/moleculares bastante estudados e diretamente relacionados à capacidade das plantas superiores em resposta ao déficit hídrico (DUARTE et al., 2011). Os açúcares solúveis, principalmente a trealose, são conhecidos como osmoprotetores envolvidos, estando relacionados à tolerância e à desidratação (MULLER et al., 1995).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Condução do experimento

Seis genótipos de amendoim, constituídos de duas cultivares tolerantes a seca (BR 1 e Senegal 55 437) e quatro linhagens intraespecífica (L59V, L37V, L81V e L108 V), descendentes de cruzamento da cultivar BR 1 e da LViPE- 06. Uma síntese da genealogia e de alguns descritores dos genótipos encontra-se na Tabela 1

Tabela 1 - Síntese de alguns descritores agronômicos dos genótipos de amendoim deste estudo

Genótipo	Genealogia/Origem	Ciclo (dias)	IF (dae)	HC	Semente			
					Cor	Forma	Tamanho	Nº/vagem
55 437	Cultivar/África	80-85	20-22	E	B	Ar	P	2
BR 1	Cultivar/Brasil	85-87	22-24	E	V	Ar	M	3-4
L -59V	<i>Top line</i> /Brasil	110-112	24-26	E	V	Ar	M	2-3
L-37 V	<i>Top line</i> /Brasil	90-95	28-30	SR	V	Ar	M	2-3
L-81V	<i>Top line</i> /Brasil	100-102	26-28	E	B	Al	M	2
L-108V	<i>Top line</i> /Brasil	93-95	25-27	E	V	Ar	P	2-3

IF: início de floração, dae - dias após a emergência; HC - hábito de crescimento; E – ereto, SE – semi ereto, Cor: B- bege, V - vermelha; Forma: Ar- arredondada, Al - alongada; Tamanho: P- pequeno, M – médio.

Os genótipos foram cultivados em casa de vegetação, situada no departamento de Agronomia da UFRPE. Sementes de cada genótipo foram cultivadas em vasos (15 L) contendo substrato (Plantmax®) complementado com 80 g de calcário dolomítico, 15 g de superfosfato simples e 8 g de cloreto de potássio. (Figura 1)

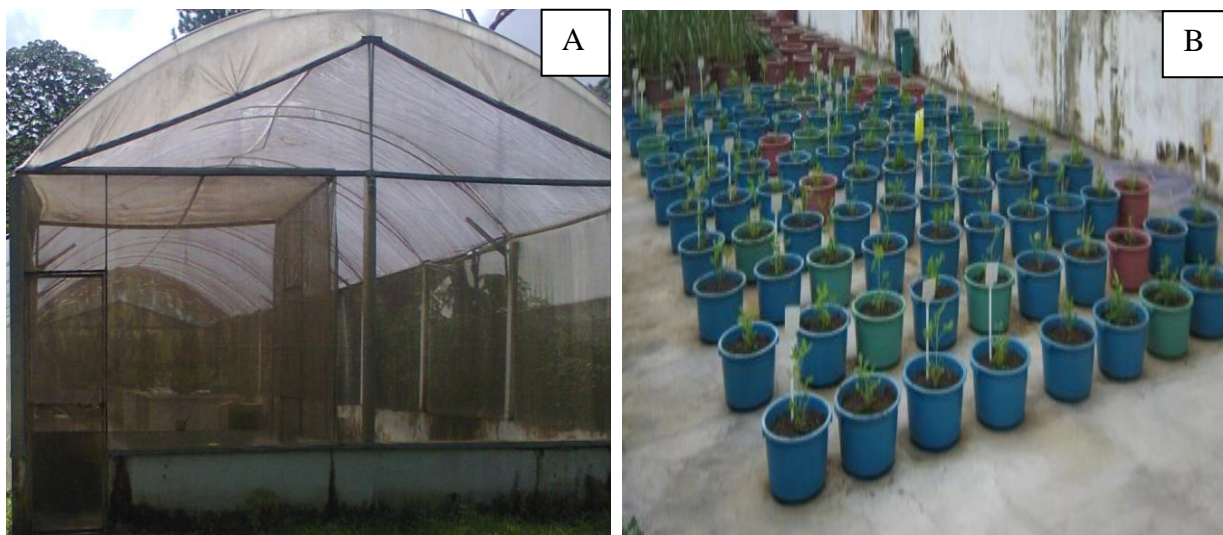


Figura 1. Detalhe da casa de vegetação onde o experimento foi conduzido (A) foto: (Gerckson Maciel) e arranjo dos genótipos durante o cultivo (B) foto: (Jacqueline Pereira).

As regas foram realizadas diariamente, mantendo-se a umidade próxima à capacidade de campo. Aos 15 dias após a emergência, os tratamentos foram diferenciados em Controle (rega normal) e Estresse (suspensão total de rega) durante 15 dias. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, com esquema bi-fatorial 6 x 2, com 5 repetições. A unidade experimental consistiu de um vaso contendo duas plantas de cada genótipo.

Ao final do período de estresse hídrico, folhas situadas no terço superior da haste principal foram coletadas para análises bioquímicas, constituídas de análises enzimáticas e de solutos orgânicos. Um detalhe da distribuição dos vasos encontra-se na figura 2. Todos os testes foram realizados no Laboratório de Expressão Gênica, da UFRPE, sendo os dados obtidos por espectrofotometria. (Mod. BIOMATE 3, Thermo Scientific).

3.2. Análises bioquímicas

O extrato bruto das amostras foi preparado por meio de maceração de 1g de tecido (folhas) em seguida macerado em 4 ml de tampão fosfato de potássio monobásico (100 mM) e EDTA (0,1 mM) (pH 7,0). Esse extrato foi utilizado para determinação de prolina livre, carboidratos solúveis, aminoácidos, proteínas solúveis e para análise das atividades enzimáticas.

A concentração das proteínas totais foi determinada segundo metodologia de Bradford (1976), sendo a leitura realizada a 595 nm; os aminoácidos foram determinados segundo

metodologia de Yemm; Cocking (1955), utilizando-se Ninhidrina (5%) + KCN (0,2 mM) como solução reveladora. A leitura foi realizada a 570 nm. Os carboidratos solúveis foram determinados segundo metodologia de Dubois et al., (1956), adicionando-se aos 500 µL do extrato bruto, 500 µL de fenol (5%) e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A concentração foi estimada a 490 nm.

Para estimar a concentração de prolina livre, adotou-se a metodologia de Bates (1973). Para a reação, utilizou-se 1 mL do extrato, 1 mL de ninhidrina ácida e 1 mL de ácido acético glacial, estocados em banho-maria a 100°C durante 1 hora. A reação foi interrompida em banho de gelo. Em seguida, adicionou-se 2 mL de tolueno sob agitação. A fase menos densa foi utilizada para estimar a concentração, a 520 nm.

Para as reações enzimáticas, a catalase foi determinada seguindo metodologia de Beers Júnior; Sizer (1952). A reação (1,5 mL) consistiu de 100 mM de tampão Fosfato monobásico e 0,1 µM de EDTA (pH 7,0), 20 mM de H₂O₂ e 50 µL do extrato proteico. A atividade foi determinada pela degradação do H₂O₂ no intervalo de 1 minuto, a 240 nm. A quantificação foi feita adotando-se o coeficiente molar de extinção de 36 M⁻¹ cm⁻¹; as peroxidases, ascorbato peroxidase (APX) e glutamato peroxidase (GPX), foram determinadas seguindo-se a metodologia de Nakano; Asada (1981) e Urbanek et al., (1991), respectivamente. A atividade da APX foi determinada pela oxidação do ascorbato no intervalo de 1 minuto a 290 nm. Para quantificação utilizou-se o coeficiente molar de extinção 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ do ascorbato. A GPX foi estimada pela quantidade de tetraguaiacol formado usando o coeficiente extinção de 26,6 mM⁻¹ cm⁻¹.

A variabilidade genotípica foi estimada a partir da base de dados de todas as variáveis bioquímicas e enzimáticas, estimando-se: S²_g- variabilidade genotípica; H² - coeficiente de determinação genotípico; H²_m - coeficiente de determinação genotípico na média de família (análise conjunta) e Iv - Índice de variação (CV_g/CV_e)..

3.3. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos a ANOVA em modelo fatorial com dois fatores, controle e estresse, e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). Com base em um modelo fixo, foram estimados parâmetros populacionais para variabilidade genotípica (S²) e coeficiente de determinação genotípico (H²) com vistas a caracterização dos genótipos para fins de melhoramento. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa estatístico Genes versão 2009.7.0. (CRUZ, 2006).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as plantas submetidas a estresse hídrico revelaram alteração fenotípica logo a partir da primeira semana, refletida por perda de turgescência nas folhas e redução no crescimento, sendo os efeitos de sensibilidade variados em função da maior ou menor tolerância falta de água. Na Figura 2 vê-se um detalhe das plantas da cultivar Senegal 55437 aos 7 e 15 dias após a supressão hídrica.

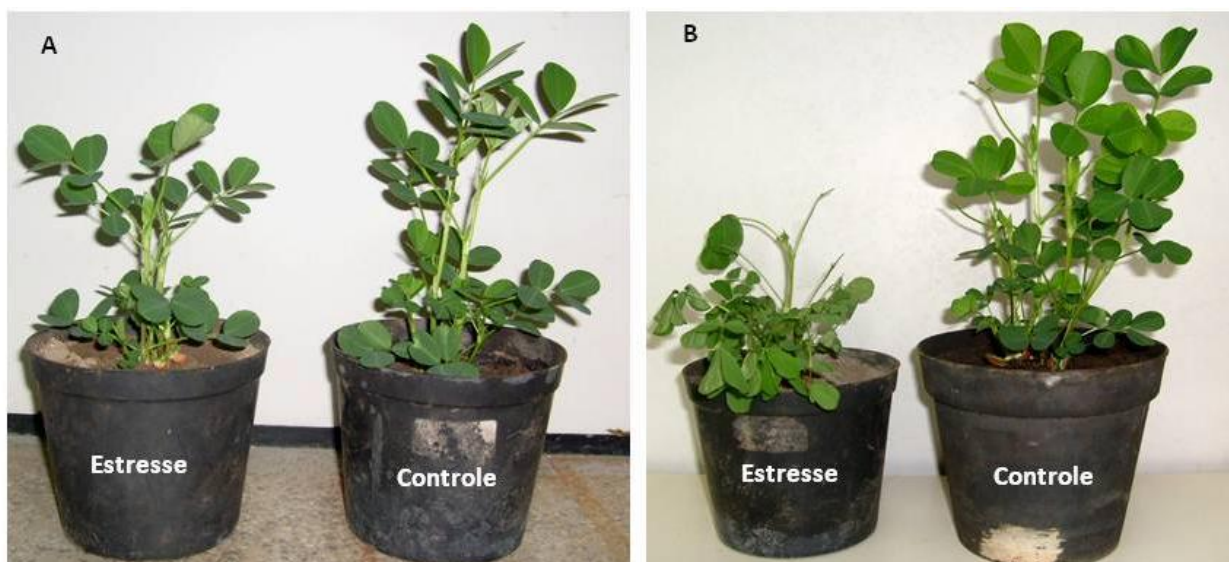


Figura 2. Detalhe de um dos genótipos (Senegal 55437) submetido a estresse hídrico. A-7 dias de estresse, B. 15 dias de estresse. Foto: (Roseane C Santos)

Uma síntese da análise de variância, obtida a partir dos dados dos solutos orgânicos e enzimáticos em folhas de seis genótipos de amendoim avaliados encontra-se na tabela 2. Verificou-se diferença estatística significativa entre os genótipos para todas as variáveis. Efeito significativo de interação também foi observado indicando que os genótipos responderam diferencialmente aos descritores selecionados quando submetidos a déficit hídrico moderado.

Tabela 2. Síntese da análise de variância para os descritores bioquímicos de amendoim submetidos ao déficit hídrico.

F.V	G.L	QUADRADO MÉDIO					
		PT	AA	PRO	CARB	CAT	APX
T	4	127,31 ^{ns}	0,17 ^{ns}	17,17 ^{ns}	1911,04 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,89 ^{ns}
G	5	573,40*	0,18*	119,47*	9251,64*	0,56*	5,28*
GT	5	120,10*	11,98*	224,62*	1373,57*	0,18*	1,10*
Resíduo	20	102,32 ^{ns}	5,73 ^{ns}	88,34 ^{ns}	3682,68 ^{ns}	0,09 ^{ns}	2,54 ^{ns}
Média		39,87	2,73	47,04	286,6	0,97	3,59
CV %		25,36	27,47	19,97	21,16	30,86	34,39

T - tratamento hídrico; G -genótipos; GT- genótipos dentro tratamentos; FV - fator de variação; GL - grau de liberdade; QM - quadrado médio;PT - Proteína Solúvel; AA - Aminoácidos solúveis;PRO - Prolina;CARB - Carboidratos;CAT - Catalase;GPX - Guaiacol Peroxidase; APX - Ascorbato Peroxidase; CV - Coeficiente de Variação; * significativo, ^{ns} - não significativo pelo teste F ($p \leq 0,05$).

O comportamento de cada genótipo para os solutos orgânicos, proteínas totais (PT), aminoácidos (AA), prolina (PRO) e carboidratos (CARB) encontra-se na Tabela 3. Observou-se que, para PT e AA, apenas em duas linhagens detectou-se diferenças nas concentrações, sendo estas elevadas em 43% e 66%, respectivamente, para L59V, e 24% e 77% para L108V, quando as plantas encontravam-se sob déficit hídrico. Ainda nas plantas sob estresse, verificou-se que a prolina foi expressivamente elevada em todos os genótipos, destacando-se BR1, L108V e Senegal 55437 com aumento de 3, 4 e 7 vezes em relação às controles, respectivamente. Quanto as concentrações de CARB, verificou-se que, com exceção da L37V, todos os genótipos exibiram elevação nas concentrações sendo maiores em BR 1, L81V e L108V, com 42%, 34% e 35%.

Tabela 3. Média dos solutos orgânicos PT, AA, PRO, CARB, analisados em folhas de genótipos de amendoim submetidos ao déficit hídrico.

Genótipo	PT ($\mu\text{g/gMF}$),		AA $\mu\text{mol/gMF}$		PRO $\mu\text{mol/gMF}$		CARB $\mu\text{mol/gMF}$	
	C	E	C	E	C	E	C	E
55437	61,5 Aa	67,6 Aab	39,4 Aa	41,3 Ab	1,6 Bb	6,3 Aa	38,8 Aab	48,6 Bb
BR 1	66,7 Aa	59,7 Ab	24,7 Ab	32,0 Ab	1,5 Bb	6,8 Aa	44,8 Aa	63,7 Bb
L59 V	52,8 Bab	75,8 Aa	43,0 Ba	71,3 Aa	2,6 Ba	5,3 Aab	43,7 Aa	54,5 Bab
L37 V	62,5 Aa	54,4 Ab	32,2 Aab	38,6 Ab	1,3 Bbc	1,8 Acd	41,7 Aa	43,8 Aa
L81 V	62,8 Aa	66,1 Aab	36,4 Aab	47,2 Ab	0,8 Bc	2,0 Ac	39,2 Aab	52,7 Bab
L108 V	47,9 Ab	59,5 Bb	29,7 Bb	52,6 Aab	0,5 Bc	2,3 Ac	38,3 Aab	51,7 Bab

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Letras maiúsculas comparam entre tratamento hídrico (C- controle, E- estresse) e minúsculas, entre genótipos. PT- Proteína Solúvel, AA- Aminoácidos solúveis, PRO- Prolina, CARB- Carboidratos

A elevação de alguns solutos orgânicos em tecidos vegetais sob estresse abiótico é um processo natural em resposta a alterações nas condições normais do metabolismo celular (AZEVEDO NETO et al., 2009; WASEEM et al., 2011; PEREIRA et al., 2012). De acordo com Waseem et al., (2011), para manter o curso do balanço hídrico, as plantas alteram seu metabolismo acumulando solutos orgânicos, aminoácidos, ácidos orgânicos e íons, especialmente o potássio. Entre os quais, a prolina é um dos mais estudados em função a sua resposta diferencial quando as plantas detectam sinais de estresse, tanto biótico quanto abiótico (GILL et al., 2010; MAFAKHERI et al., 2010).

No amendoim, o maior acúmulo de prolina é uma característica frequentemente observada em plantas submetidas ao déficit hídrico (AZEVEDO NETO et al., 2009; PEREIRA et al., 2012); entretanto, a magnitude da expressão, varia em função da fase fisiológica e do tempo em que elas se encontram sob esse tipo de estresse.

Pereira et al., (2012) submeteu a cultivar Senegal 55 437 a apenas sete dias de suspensão hídrica, a partir do 15º dia da emergência, e verificaram elevação no acúmulo de prolina nas folhas na ordem de 105% ; Já com estresse severo, de 45 dias, Azevedo Neto et al., (2009) detectaram acúmulo de prolina na ordem de 233%, com a mesma cultivar e tecido. Segundo estes autores, nas raízes também houve acúmulo, porém, menos expressivo do que nas folhas.

Em trabalhos de melhoramento conduzidos para o semiárido nordestino, a Senegal 55 437, de origem africana, junto com a BR 1, tem sido utilizada como progenitores para obtenção de genótipos tolerantes ao déficit hídrico e salinidade, e o acúmulo de prolina tem sido adotado

como critério fisiológico de seleção para tolerância a seca (NOGUEIRA; SANTOS, 2000; SANTOS et al., 2010; GRACIANO et al., 2011; PEREIRA et al., 2012). As linhagens derivadas destes cruzamentos tem demonstrado larga variabilidade genética para este caráter. As cultivares BRS 151 L7 e BRS Pérola Branca, desenvolvidas pela Embrapa, são descendentes da Senegal 55 437 e da BR 1, respectivamente, e foram previamente selecionadas devido apresentarem elevado acúmulo de prolina, quando submetidas a déficit hídrico curto e moderado; ambas são de elevada precocidade e recomendadas para o ambiente semiárido (GOMES et al., 2007; NOGUEIRA et al., 2006; PEREIRA et al., 2012).

A atividade das enzimas antioxidativas encontra-se na Tabela 4. Verificou-se que, em condições de estresse, todos os genótipos revelaram redução média de 26% na atividade da CAT com exceção da linhagem L59V, que não diferiu estatisticamente entre os tratamentos hídricos. Nessas mesmas condições, a atividade da GPX foi reduzida na ordem de 29%, 38%, 64% e 39%, para os genótipos Senegal 55 437, BR 1, L81V e L108V, respectivamente. Comportamento inverso, contudo, foi visto com estes mesmos genótipos para APX, com aumento de atividade em torno de 85%, 28%, 30% e 34%, respectivamente.

De acordo com a literatura, a atividade da CAT varia em função da duração e intensidade do estresse. Em situações de déficit hídrico moderado, há um incremento na atividade desta enzima; a medida que o estresse torna-se mais severo, esse comportamento é invertido. No trabalho de Pereira et al., (2012), que avaliaram a atividade da CAT em genótipos de amendoim após 7 dias de déficit hídrico, os autores verificaram aumento de atividade tanto nas folhas quanto nas raízes em todos os genótipos, sendo mais expressiva na Senegal 55 437 e na BR 1. Sankar et al., (2007) também verificaram elevação da CAT de 23% e 43% nos genótipos de amendoim ICG 669 476 e ICG 221, após 10 dias de déficit hídrico. Contudo, com a imposição de um estresse mais prolongado, de 20 dias, Azevedo Neto et al., (2009) constataram redução de 52% na atividade da CAT na cv. Senegal 55 437. Tal comportamento assemelha-se ao observado no presente estudo, onde a maioria dos genótipos reduziram a atividade da CAT após 15 dias de déficit hídrico.

Em relação a peroxidase APX, o incremento em sua atividade ocorre tanto sob condições de estresse moderado quanto sob estresse severo (AKCAY et al., 2010; AZEVEDO NETO et al., 2009; PEREIRA et al., 2012; SANKAR et al., 2007). No presente estudo, a redução das atividades da CAT e GPX podem estar relacionadas ao fato de que as plantas utilizam outros componentes enzimáticos e/ou não enzimáticos para neutralizar as diferentes ROS. No trabalho de Sankar et al., (2007), que também usaram descritores enzimáticos para estudar a resposta de tolerância ao estresse hídrico em genótipos de amendoim, os autores verificaram aumento de alguns

componentes não-enzimáticos nos genótipos estressados, tais como, ácido ascórbico, α -tocoferol e glutatona reduzida.

Apesar de ter se constatado neste trabalho comportamento de maior tolerância ao estresse imposto nas linhagens L81V e L108V, um aspecto interessante foi visto com a linhagem L59V. Verificou-se que, embora essa linhagem não tenha apresentado diferença significativa entre os tratamentos, sua atividade basal com as enzimas GPX e APX, foi superior aos demais genótipos, inclusive a cultivar resistente Senegal 55 437, na mesma condição. Isto sugere que, mesmo não diferindo entre os tratamentos, a produção dessas duas enzimas na condição normal já foi suficiente para manter a degradação do peróxido de hidrogênio e proteger a célula dos efeitos provocados pelo estresse oxidativo. Assim sendo, é de se supor que, em condições de manejo dependente das águas, seu ajuste a um veranico moderado seja mais rápido com poucas consequências nos caracteres fenotípicos.

Tabela 4. Média das atividades das enzimas antioxidativas CAT, GPX, APX ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ MF) analisadas em folhas de genótipos de amendoim submetidos a déficit hídrico.

Genótipos	CAT		GPX		APX	
	C	E	C	E	C	E
55437	344,07 Ab	222,59 Bbc	1,32 Aab	0,93 Bab	2,61 Bbc	4,83 Aab
BR 1	418,89 Aa	298,14 Ba	1,25 Aab	0,78 Bb	3,21 Bb	4,10 Aab
L59V	298,89 Abc	245,55 Ab	1,45 Aa	1,23 Aa	5,25 Aa	5,48 Aa
L37V	321,48 Ab	254,44 Bb	1,25 Aab	1,13 Aa	2,67 Abc	3,04 Ab
L81V	269,26 Ac	208,88 Bc	1,02 Abc	0,37 Bc	2,33 Bbc	3,04 Ab
108V	317,77 Ab	240,00 Bb	1,37 Aab	0,83 Bab	2,29 Bbc	3,06 Ab

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Letra maiúscula comparada entre tratamento (C- controle e E- estressado), e em minúsculo entre genótipos. CAT: Catalase; GPX: Guaiacol Peroxidase; APX: Ascorbato Peroxidase.

Apesar de se ter observado neste trabalho tendência de aumento dos níveis de solutos orgânicos e redução das enzimas antioxidativas, com exceção da APX, nas plantas submetidas ao déficit hídrico, ficou evidenciado que a resposta em nível de atividade para cada descritor é genótipo-dependente, sendo mais expressiva nas cultivares tolerantes a seca, Senegal 55437 e BR1, e nas linhagens descendentes da BR 1, L81V e L108V, indicando que ambas herdaram o caráter de tolerância a seca de sua genitora materna. Munne-Bosch; Alegre (2004) e

Karuppanapandian et al., (2009) reportam que a tolerância relativa de cada genótipo ao estresse hídrico é refletida pelas características intrínsecas de cada um em relação a baixa peroxidação de lipídeos, alta estabilidade da membrana e alto conteúdo de clorofila e carotenóides, juntamente com o sistema enzimático de antioxição.

Com base nas médias obtidas de cada descritor, procedeu-se a análise de variabilidade genética, tomando-se como base as duas situações em que os genótipos foram cultivados, sob regas normais até o final do ciclo (controle) e sob estresse hídrico durante 15 dias. Conforme pode ser visto na Tabela 5, verifica-se que o componente quadrático genotípico (S^2g), análogo a variância genética, porém estimado em um modelo fixo, mostrou considerada variação para cada descritor, indicando que uma seleção baseada nesses descritores pode gerar indivíduos promissores, especialmente se eles forem tomados conjuntamente ou escolhendo-se um representante para cada classe bioquímica.

Tabela 5. Parâmetros genéticos e ambientais gerados a partir das médias dos descritores bioquímicos estimados em plantas controle e submetidas ao déficit hídrico.

Descritor	Parâmetros				
	TT	S^2g	H^2	H^2m	Iv
PT	C	35,63	0,70	40,10	0,33
	E	28,93	0,42		
AA	C	32,02	0,78	82,15	0,87
	E	130,92	0,68		
PRO	C	0,47	0,87	95,28	1,83
	E	5,05	0,94		
CARB	C	70,57	0,73	26,05	0,24
	E	-14,76	-0,77		
CAT	C	1188,03	0,45	60,19	0,50
	E	-101,42	-0,10		
GPX	C	0,66	0,88	84,05	0,93
	E	0,12	0,77		
APX	C	0,37	0,35	51,83	0,42
	E	0,05	0,05		

PT - Proteína Solúvel; AA - Aminoácidos; PROL - Prolina; CARB; Carboidratos; CAT - Catalase; GPX- Guiacol Peroxidase APX- Ascorbato Peroxidase; TT tratamento (C- controle; E-estressado); S^2g - variância genética; H^2 coeficiente de determinação genotípico; H^2m - Coeficiente de Determinação Genotípico na média da família(análise conjunta); Iv Índice de variação CVg/CVe.

Nesse caso, PRO e CAT seriam os mais indicados para representar os solutos orgânicos e as enzimas antioxidativas, respectivamente, até porque, conhecidamente ambos se acumulam nos tecidos vegetais em resposta ao estresse hídrico, atuando no mecanismo de proteção ao estresse oxidativo (MOLINARI et al., 2007; KARUPPANAPANDIAN et al., 2009).

O coeficiente de determinação genotípico (H^2), análogo a herdabilidade, porém estimado em modelo fixo, representa uma ideia da herdabilidade dos descritores estudados. Para AA e PRO este índice mostrou-se de elevada magnitude (82.15 e 95.28), respectivamente, evidenciando possibilidade de seleção para estes descritores, como solutos orgânicos e, entre as enzimas, GPX e CAT, com H^2 de 60.19 e 84.05, respectivamente. Estimativas de H^2 para descritores de ordem bioquímica em amendoim são pouco descritos na literatura, de modo que os dados mostrados neste trabalho representam um relevante suporte para orientar programas de melhoramento para tolerância a seca. O índice de variação resume a precisão experimental uma vez que é obtido pela razão entre CV_g/CV_e (coeficiente de variação genotípico e ambiental). Valores de I_v próximos a unidade refletem uma maior porção de variabilidade genotípica em relação a ambiental, assim as variáveis AA, PRO e GPX apresentam uma elevada confiabilidade em relação as demais. Essa informação é útil para as linhagens aqui avaliadas, todas descendentes de cruzamento entre a precoce BR 1 e a tardia LViPE-06, porque denota a proporção da variância fenotípica total que foi passada para elas. Assim, entre as quatro selecionadas, L81V e L108V são as de maior contribuição para os trabalhos de melhoramento visando tolerância ao déficit hídrico.

5. CONCLUSÕES

As linhagens L81V e L108V, ambas descendentes da precoce BR 1, são as mais tolerantes ao déficit hídrico a que foram submetidas. Sendo indicadas para o avanço nos trabalhos de melhoramento da cultura.

Entre os descritores bioquímicos utilizados, a prolina é o descritor mais adequado para seleção de genótipos tolerantes ao estresse hídrico, baseando-se nos valores de S^2 g e H^2 .

REFERÊNCIAS

- AKCAY, U. C.; Ercan, O.; Kavas, M.; Yildiz, L.; Yilmaz, C.; Oktem, H. A.; Yucel, M. Drought-induced oxidative damage and antioxidant responses in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seedlings. **Plant Growth Regulation**, v.61, p.21-28, 2010.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, 2004.
- AZEVEDO NETO, A. D.; NOGUEIRA, R. J. M. C.; MELO FILHO, P. A.; SANTOS, R. C. Physiological and biochemical responses of peanut genotypes to water deficit, **Journal of Plant Interactions**, v. 05, n. 01, p. 01-10, 2009.
- BATES, L. S. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, n. 01, p. 205-207, 1973.
- BEERS JUNIOR, R. F.; SIZER, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxidase by catalase. **Journal of Biological Chemistry**, v.195, n.2, p.133-140, 1952.
- BJÖRKMAN, O.; POWLES, S.B. Inhibition of photosynthetic reactions under water stress: Interaction with light level, **Planta** v.161, p. 490-504, 1994.
- BOOTE, K.J.; STANSELL, J.R.; SCHUBERT, A.M.; STONE, J.F. Irrigation, water use and water relation. In: PATEE, H.E.; YOUNG, C.T. (ed). **Peanut Science and Technology**. Texas: American Press, 1982, p.164-205.
- BOYER, J. S. Water deficits and photosynthesis. In: Kozlowski, T.T. (ed.) Water deficits and plant growth. New York: **Academic Press**, v.4, p.154-191, 1978.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRAY, E.A. Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: An analysis using microarray and differential expression data. **Ann. Bot.** v.89, p.803-811, 2002.
- CAVERZAN, A. **Caracterização funcional dos genes de ascorbato peroxidase de arroz (*Oriza sativa* L.) nas interações entre estresse oxidativo e estresses abióticos**. 2008. 91 f.

Dissertação (Biologia celular e Molecular) – programa de pós- graduação em biologia celular e molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira: 8º levantamento de grãos - safra 2011/2012 – Maio/2012** disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_05_10_08_49_52_boletim_804_maio_2012.pdf> Acesso: 10 Set. 2012.

CRUZ, C.D. **Programa Genes** - Biometria. 1. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2006. v. 1. 382 p.

DUARTE, E.A.A.; MELO FILHO, P.A.; NOGUEIRA, R.J.M.C.; LIMA, L.M.; SANTOS, R.C. prospecting of transcripts expressed differentially using issr markers in peanut submitted to water stress. **Revista brasileira oleaginosa fibrosa**, Campina Grande, v.15, n.1, p.1-7, jan./abr. 2011.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

ÉAUX, B.; TOLEDANO, M.B. Ros as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, p. 813–824, 2007.

FAO - ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN - FAO. **FAOSTAT**, 2010. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=636&lang=es#ancor>>. Acesso: 15 junho 2010.

FAROOQ, M.; WAHID, A.; KOBAYASHI, N.; FUJITA, D.; BASRA S.M.A. Plant drought Stress: Effects, mechanisms and management, **Agronomy for Sustainable and Development**, v. 29, p. 185–212, 2009.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox homeostis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **Plant Cell**, v.17, p. 1866-1875, 2005.

FREIRE, R. M. M.; NARAIN, N.; SANTOS, R. C. Aspectos Nutricionais de Amendoim e seus derivados. In: SANTOS, R.C. (ed.): **O Agronegócio do amendoim no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005, p. 389-420.

GILL, T.; KUMAR, S.; AHUJA, P. S.; SREENIVASULU, Y. Over-expression of Potentilla superoxide dismutase improves salt stress tolerance during germination and growth in Arabidopsis thaliana. **J. Plant Genet & Transgenics** 1 (1): 1-10 **Academy Journals**, 2010.

GODOY, I. J. ; MORAES, S. A.; ZANOTTO, M. D.; SANTOS, R. C. Melhoramento do amendoim. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 2005. p.54-95. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 7p. Embrapa Algodão. (Circular técnica, 102).

GODOY, I. J.; MORAES, S.A.; ZANOTTO, M. D.; SANTOS, R. C. Melhoramento do amendoim. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de Espécies Cultivadas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p.51-94, 1999.

GOMES, L. R. **Estabilidade de genótipos de amendoim e análise bromatológica da matéria seca com potencial forrageiro**. 2007. 56.f Dissertação (Melhoramento Genético de Plantas) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco - Pernambuco, 2007.

GOMES, L. R.; SANTOS, R. C.; ANUNCIÇÃO FILHO, C. J.; MELO FILHO, P. A. Adaptabilidade e estabilidade fenotípica de genótipos de amendoim de porte ereto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.42, n.7, p.985-989, jul. 2007.

GRACIANO, E. S. A.; NOGUEIRA, R. J. M. C.; LIMA, D. R. M.; PACHECO, C. M.; SANTOS, R. C. Crescimento e capacidade fotossintética da cultivar de amendoim BR 1 sob condições de salinidade. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.15, n.8, p.794-800, 2011.

JAIN A.K.; BASHA S.M.; HOLBROOK C.C. Identification of drought-responsive transcripts in peanut (*Arachis hypogaea* L.) **Journal of Biotechnology** n. 4: p.59-67, 2001.

KARUPPANAPANDIAN, T.; MOON, J.C.; KIM, C.; MANOHARAN, K.; KIM, W. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. **Australian Journal of Crop Science**, v.5, n.6), p.709-725, 2011.

KARUPPANAPANDIAN, T., SINHA, P.; HANIYA, K.; MANOHARAN, K. Chromium-induced accumulation of peroxide content, stimulation of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in green gram 867 (*Vigna radiata* L. cv. Wilczek) leaves. **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.3, p 475-479, 2009.

KRAMER, P. J.; BOYER, J. S. Water relations of plants and soils. **Academic Press**, New York: p.495, 1995.

LIU, X.; VANCE B. Differential Expression of Genes Regulated in Response to Drought or Salinity Stress in Sunflower. **Crop Science**. v. 43, p. 678-687, 2003.

LONG, S.P.; HUMPHRIES, S.; FALKOWSKI, P.G. 'Photoinhibition of photosynthesis 882 in nature', **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 45,633-662, 1994.

MAFAKHERI A.; SIOSEMARDEH, A.; BAHRAMNEJAD, B.; STRUIK, P.C.; SOHRABI, Y. Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. **Australian Journal of Crop Science**, v.4, p580- 585, 2010.

MAHAJAN, S. e TUTEJA, N. Cold, Salinity and Drought Stresses: An Overview, **Archives of Biochemistry and Biophysics** v. 444, p. 139-158, 2005.

MALLICK, N.; RAI, L.C. Response of the antioxidant systems of the nitrogen fixing cyanobacterium *Anabaena doliolum* to the copper. **Journal of Plant Physiology**, v. 155, p. 146-149, 1999.

MELOTTI, L.; LUCCI, C. S.; MORGULLIS, C. F.; CASTRO, A. L.; RODRIGUES, P.H.M. Degradabilidade ruminal de camas de frangos pela técnica dos sacos de náilon *in situ* com bovinos. **Journal of Veterinary Animal Science**, v.35, n.10, p.92-95, 1998.

- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v.7, p.405-410, 2002.
- MOLINARI, H. B. C. et al. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum spp.*): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiology Plant**, v.130, p. 218-229, 2007.
- MORGAN, P.W. Effects of Abiotic Stresses on Plant Hormone Systems, in: **Stress Responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms**, p. 113–146, 1990.
- MÜLLER, J.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Trehalose and trehalase in plants: recent developments. **Plant Science**. n. 112: p. 1-9, 1995.
- MUNNE-BOSCH, S.; ALEGRE, L. Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. **Functional Plant Biology**, v. 31, p.203-216, 2004.
- MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**, v.25, p.239-250, 2002.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplast. **Plant Cell Physiology**, v.22, n.05, p.867-880, 1981.
- NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B.; OYA, T. Tolerância à seca em plantas: Mecanismos fisiológicos e moleculares. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 04, n. 23, p. 12-18, 2001.
- NOGUEIRA, R. J. M. C., SANTOS, R. C., BEZERRA NETO, E., SANTOS, V. F. Comportamento fisiológico de duas cultivares de amendoim submetidas a diferentes regimes hídricos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 12, p. 1963- 1969, 1998.
- NOGUEIRA, R. J. M. C.; TÁVORA, F. J. A. F. Ecofisiologia do Amendoim (*Arachis hypogaea* L.). In: SANTOS, R.C. (ed.): **O Agronegócio do amendoim no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005, p.. 71-122.
- NOGUEIRA, R.J.M.C., MELO FILHO, P. A., CARVALHO, R., ALBUQUERQUE, M. B., SANTOS, R.C. Comportamento estomático e potencial da água da folha em amendoim cv. BRS 151 L7 submetido a estresse hídrico. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 10, n. 1/2, p. 985-991, 2006.
- NOGUEIRA, R.J.M.C.; SANTOS, R.C. Alterações fisiológicas no amendoim submetido ao estresse hídrico. **Revista Engenharia Agrícola**, Campina Grande, v.4, p.41-45, 2000.
- PARENTE, E. J. S. Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado. **Tecbio**, Fortaleza-CE, 2003.
- PEREIRA, J. W. L.; MELO FILHO, P. A.; ALBUQUERQUE, M. B.; NOGUEIRA, R. J. M. C.; SANTOS, R. C. Mudanças bioquímicas em genótipos de amendoim submetidos a déficit hídrico moderado. **Revista Ciência Agronômica**, v.43, n.4, p.766-773, 2012.
- PIMENTEL, C. **A relação da planta com a água**. Seropedia, RJ: Edur. 191p. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2004.

PIMENTEL, C. Respostas fisiológicas a falta d'água: limitação difusiva ou metabólica? IN: NOGUEIRA, R.J.M.C.; ARAUJO, E. L.; WILLADINO, L. G.; CAVALCANTE, U. M. T. (Eds.). **Estresses ambientais: danos e benefícios nas plantas**. Recife: MXM Editora. 2005. pp. 13-21.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, 28: 123-130, 2003.

SANKAR, B.; JALEEL, C.A.; MANIVANNAN, P.; KISHOREKUMAR, A.; SOMASUNDARAM, R.; PANNEERSELVAM, R. Effect of paclobutrazol on water stress amelioration through antioxidants and free radical scavenging enzymes in *Arachis hypogaea* L. Colloids and Surfaces B: **Biointerfaces**, v.60, p.229-235, 2007.

SANTOS, R. C. BRS 151 17: Nova cultivar de amendoim para o nordeste brasileiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. BRASILIA, v. 35, n.3, p. 665-670, 2000.

SANTOS, R.C.; QUEIROZ, C.M.; BATISTA, V.G.L.; SILVA, C.R.C.; PINHEIRO, M.P.N.; GALVAO FILHO, A.L.A.; MELO FILHO, P.A.; LIMA, L.M. Selection of divergent genotypes based on PCR-ISSR by using in peanut interespecific crossings. **Revista Ciência Agronômica**, v.44, n.3, 2013.

SANTOS, R. C.; GODOY, J. I.; FÁVERO, A. P. Melhoramento do Amendoim. In: SANTOS, R. C. **O Agronegócio do Amendoim no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005, cap. 4, p. 124-192.

SANTOS, R.C. Melhoramento genético do amendoim para resistência a seca via hibridação com espécies cultiva e selvagens de *Arachis*. IN: NOGUEIRA, R.J.M.C.; ARAUJO, E.L.; WILLADINO, L.G.; CAVALCANTE, U.M.T. (Eds.). **Estresses ambientais: danos e benefícios nas plantas**. Recife: MXM Editora. 2005. pp. 351-360.

SANTOS, R.C.; REGO, G.M.; SILVA, A.P.G.; VASCONCELOS, J.O.L.; COUTINHO, J. L. B.; MELO FILHO, P. A. Produtividade de linhagens avançadas de amendoim em condições de sequeiro no Nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.14, n.6, p.589-593, 2010.

SHARMA, P.; JHA, A.B.; DUBEY, R.S.; PESSARAKLI, M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, p.1-26, 2012.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to drought stress. In: Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants. **Biotechnology Intelligence Unit**, Landes Company, USA, 1999.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O.L.T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas** V.1, n. 1, p. 9, 2007.

TAYLOR I.B. Genetics of ABA Synthesis, in: DAVIES W.J., JONES, H. G., (Eds.), Abscisic acid: Physiology and Biochemistry, **Bios Scientific Publishers Ltd**. UK, p. 23–38, 1991.

TURNER N.C., WRIGHT G.C., SIDDIQUE K.H.M. Adaptation of Grain legumes (Pulses) to Water-Limited Environments, **Advances in Agronomy**, v. 71, p. 123-23, 2001.

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA, K. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 13, n. 01, p. 43-50, 1991.

USDA. **United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service.** Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdreport.aspx?hidReportRetrievalName=BVS&hidReportRetrievalID=918&hidReportRetrievalTemplateID=1#ancor>>. Acesso em: 14/06/2010.

VIEIRA da SILVA, J. Water stress, ultrastructure and enzymatic activity. In: Ecological studies 19. analysis and synthesis. IN: LANGE, O. L., L.; KAPPEN, E.; SCHULZE, D. (Eds.). **Ecological studies. Water and plant life: problems and modern approach.** Berlin: Springer-Verlag, 1976. v.19, pp.207-224. 1976. p. 207-224.

WASEEM, M.; ALI, A.; TAHII, M.; NADEEM, M.; AYUB, M.; TANVEER, A.; AHMAD, R.; HUSSA, M. Mechanism of drought tolerance in plant and its management through different methods. **Continental Journal Agricultural Science**, v.5, n.1, p.10-25, 2011.

YEMM, E.W.; COCKING, E.F. The determination of amino acids with ninhydrin. **Analyst**, v. 80, p. 209-213, 1955.

YORDANOV, I.; VELIKOVA, V.; TSONEV, T.; - Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance **Review**. *Photosynthetica* 38 (1): 171-186, 2000.