

Influência do potencial hídrico induzido por polietilenoglicol *in vitro* na morfologia do trigo

Fernando Furlan¹, Kléber Saatkamp², Maik C. Wiest²,
Marise F. dos Santos², Eliane C. G. Vendruscolo²

¹ Colégio Cecília Meireles, Rua 1 de Janeiro, Centro, CEP 85950-000, Palotina-PR, Brasil. E-mail: fernandofurlan_@hotmail.com

² Universidade Federal do Paraná, Rua Pioneiro, 2153, Dallas, CEP 85950-000, Palotina-PR, Brasil: E-mail: klebersaatkamp@gmail.com; maikwiest@gmail.com; marise@ufpr.br; vendruscolo@ufpr.br

RESUMO

O desenvolvimento de uma planta depende de vários fatores ambientais que determinam a sua produtividade. O déficit hídrico é um dos principais fatores limitante na agricultura. O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de avaliação do efeito do estresse hídrico em plântulas de trigo cultivadas *in vitro*. Os tratamentos constituíram da simulação dos seguintes potenciais (-0,1; -0,2; -0,3 e -0,4 MPa) com o uso de PEG - 6000 e da testemunha. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 5 repetições. Foram avaliados como parâmetros fisiológicos e morfológicos: teor relativo de água (TRA), índice de estabilidade de membrana (IEM) e morfologia microscópica da raiz. Como resultados obtidos foi observado que o potencial osmótico de -0,3 MPa (PEG 6000 151,41g L⁻¹) e o período de 5 dias propiciaram efeitos similares ao estresse hídrico em vaso, sendo este osmoregulador indicado para simular este estresse abiótico em condições laboratoriais.

Palavras-chave: estresse hídrico, potencial osmótico, sistema radicular, *Triticum aestivum* L.

In vitro influence of water potential induced by polyethylene glycol on the morphophysiology of wheat

ABSTRACT

Plant's growing depends on several environmental factors that determine their productivity. Drought is a limiting factor for crop production. The aim of this study was the establishment of a protocol for evaluating *in vitro*, the water stress effect on wheat seedlings. Treatments consisted of simulating the following water potentials (-0.1; -0.2; -0.3 and -0.4 MPa) using PEG - 6000 and the control. The experimental design was completely randomized with five treatments and five repetitions. It was evaluated morphological and physiological parameters such as: relative water content (RWC), membrane stability index (MEI) and the roots morphology by microscopy. As results, we observed that -0.3 MPa (PEG 6000 151.41 g L⁻¹) osmotic potential and the 5 days period provided similar effects of water shortage as that one occurring at green house conditions, which is suitable for simulating this abiotic stress at laboratory conditions.

Key words: drought stress, osmotic potential, root system, *Triticum aestivum* L.

Introdução

O trigo é um dos alimentos essenciais à dieta humana. Direta ou indiretamente é utilizado por 35% da população mundial e cultivado em aproximadamente 200 milhões de hectares, anualmente, correspondendo a 17% da terra cultivável em todo o mundo (Jones, 2005). Devido à importância deste cereal os estudos sobre o comportamento desta cultura frente aos estresses bióticos e abióticos, são estratégicos (Vendruscolo, 2007).

A seca ou estresse hídrico, é o fator abiótico de maior limitação para o crescimento vegetal e produtividade (Hamayoun et al., 2011). Deste modo, entender as resposta das plantas ao déficit hídrico é de grande importância e parte fundamental na obtenção de plantas mais tolerantes a esse estresse. Para que isto ocorra, é necessário o estabelecimento de protocolos que simulem as condições de campo em laboratório visando à compreensão dos mecanismos de resposta vegetal a condições ambientais adversas.

Embora os estresses abióticos possuam características específicas todos apresentam, como principal consequência, a redução no potencial hídrico (Hasegawa et al., 2000). Os mecanismos que conduzem à tolerância à seca em plantas, podem ser divididos em dois grupos: a) mecanismos de fuga: em que a planta evita a falta de água nos tecidos durante a seca por meio da manutenção de turgor e volume celular. Através da absorção de água por um sistema radicular abundante ou redução da sua perda por transpiração ou por vias não estomáticas, através da cutícula da folha (Sanchez et al., 2002, Verslues et al., 2006). E, b) mecanismo de tolerância na qual a planta mantém o metabolismo, mesmo sob baixos potenciais de água no solo devido sobretudo ao ajuste osmótico (AO) e à capacidade antioxidante (Sanchez et al., 2002). As relações hídricas podem fornecer subsídios para explicar o comportamento fisiológico de plantas e é importante que sejam investigados os padrões e relações entre os genótipos e o potencial hídrico em diferentes cultivares, visto que vários níveis de restrição hídrica podem afetar o crescimento vegetal e, em consequência, a produtividade. Esses tipos de experimento têm ajudado a identificar cultivares mais tolerantes a esse tipo de condição adversa (Creus et al., 2004; Meneses et al., 2007).

As reações fisiológicas e bioquímicas das plantas variam significativamente nos vários níveis organizacionais e dependem da intensidade, da duração do estresse, da espécie vegetal e do seu estágio de desenvolvimento (Holtman et al., 1994; Jayakumar et al., 2007).

A cultura *in vitro* tem a vantagem de minimizar as variações ambientais pelo uso de meio de cultura determinado, condições controladas e homogêneas de aplicação do estresse. Além disto, permite a otimização dos estudos envolvendo grandes populações em um espaço físico limitado e curto período de tempo (Hassanein, 2010).

Uma das soluções mais utilizadas para o estudo de restrição hídrica controlada, é o Polietilenoglicol (PEG). Este polímero pode ser encontrado com grande variação de pesos moleculares (4000-8000); é quimicamente inerte, atóxico para as sementes e raízes das plantas e por ser agente osmótico é utilizado para vários estudos de restrição hídrica em plantas, simulando a

seca (Hassanpanah, 2010, Stanton et al., 2012; Soliman & Hendawy, 2013).

O PEG tem sido utilizado para estudos de restrição hídrica envolvendo a avaliação da germinação e seleção de genótipos tolerantes à salinidade e/ou seca em diferentes culturas (Hamayoun et al., 2011; Boyd & Hughes, 2011; Stanton et al., 2012; Hassanpanah, 2010; Hassanein, 2010; Soliman & Hendawy, 2013; Verma et al., 2013).

Na literatura, o PEG surge para compor o meio de cultura descrito na forma de concentração (p/v) ou sob o efeito de potencial osmótico (MPa). Diferentes concentrações do PEG (6000) têm sido usadas em várias culturas: 0 a 25% em *Vigna aconitifolia* (Soni et al., 2011); 0 a 25% em *Pelargonium spp* (Hassanein, 2010); 4-6% em soja (Sakhivelu et al., 2008); 0 a -1,2MPa em trigo (Mahmood et al., 2012).

Apartir de calos embriogênicos no cultivo *in vitro* (Mahmood et al., 2012), a regeneração de plântulas sob potencial osmótico é inversamente proporcional ao aumento das concentrações de PEG utilizadas nos meios de seleção. Portanto, o screening de genótipos submetidos ao estresse osmótico induzido por PEG é fundamental para a obtenção de plantas tolerantes à seca e esses estudos sobre o desenvolvimento de plântulas de trigo são escassos na literatura. Ante o exposto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de avaliação do efeito do déficit hídrico em plântulas de trigo cultivadas *in vitro*.

Material e Métodos

As sementes da cultivar de trigo Frontana, do banco de germoplasma da COODETEC foram utilizadas. Esta cultivar é um ancestral comum dos diversos genótipos produzidos pela COODETEC. A obtenção de plântulas de trigo foi realizada a partir da extração de embriões maduros de trigo, em que as sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio acidificado (NaOCl 2,5%; KH₂PO₄ 1 M; HCL 6 M e Tween 80) por 20 min. Posteriormente, as sementes foram imersas em água destilada autoclavada e armazenadas durante 24 h na geladeira. Após este período, as sementes foram levadas à câmara de fluxo laminar para lavagem em etanol 75% (v/v) por 5 min. Em seguida, as sementes foram dispostas em placas de Petri contendo ágar-água (5 g L⁻¹) e mantidas no escuro em sala de cultura vegetal até sua pré-germinação. Com o auxílio de um estereoscópio binocular e bisturi, os embriões maduros tiveram seus coleóptilos excisados e dispostos com o escutelo para cima, em meio de indução.

O meio de indução foi o meio MS (Murashige & Skoog, 1962) com 30 g L⁻¹ de sacarose, sem reguladores vegetais e pH ajustado para 5.8. Os meios foram solidificados com 2,2 g L⁻¹ de Phytigel™ e mantidos em sala de cultura com fotoperíodo de 16/8 h (claro/escuro) e temperatura de 25 °C, por 28 dias. Após os 28 dias as plântulas de trigo foram dispostas individualmente em tubos de ensaio com meio MS ¼ e acrescido das diferentes concentrações de PEG, foram considerados 5 diferentes tratamentos, segundo a Tabela 1.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 5 tratamentos e 5 repetições, totalizando 25 plantas. Avaliaram-se os seguintes parâmetros fisiológicos e morfológicos: Teor Relativo de Água (TRA) segundo

Tabela 1. Especificação dos tratamentos utilizados quanto à concentração de Polietilenoglicol (PEG - 6000) segundo Meneses et al., (2007)

Tratamentos	Potencial Hídrico Ψ_w (Mpa)	Concentração PEG - 6000 (g L ⁻¹)
1	0	0
2	-0,10	78,498
3	-0,20	119,57
4	-0,30	151,41
5	-0,40	178,34

Tratamentos: 1 - Testemunha; 2 - Com PEG na concentração de -0,1 MPa; 3 - Com PEG na concentração de -0,2 MPa; 4 - Com PEG na concentração de -0,3 MPa e 5 - Com PEG na concentração de -0,4 MPa

Schonfeld et al. (1988), Índice de Estabilidade de Membrana (IEM) seguindo o protocolo de Chandra Babu et al. (2004). Também foram avaliadas a morfologia microscópica da raiz e a abertura/fechamento dos estômatos tomando-se uma planta, e a visualização realizada em microscópio óptico no mesmo horário, entre 9 e 10 h, seguindo o protocolo de Spaepen et al. (2008). Para a visualização dos estômatos foi adicionada, em uma lâmina, cola adesiva e nesta foi colocada uma folha durante 2 min; em seguida, a folha foi retirada e a lâmina levada ao microscópio óptico. As avaliações ocorreram aos 3, 5 e 7 dias após a transferência das plântulas de trigo para tubos de ensaio contendo meio MS $\frac{1}{4}$ com PEG - 6000.

Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA e suas médias comparadas pelo teste Tukey, a 5% de significância, utilizando-se o programa estatístico GENES (Cruz, 2006).

Resultados e Discussão

Os dados obtidos visando à determinação da melhor concentração de PEG - 6000 na simulação do déficit hídrico pela diminuição do potencial osmótico, variaram nos períodos avaliados. Plântulas controle obtiveram 88,8% de teor relativo de água (TRA). Os dados obtidos apontam que plantas controle mantiveram comportamento similar em todos os tratamentos realizados com pequenas alterações observadas, mas não diferindo estatisticamente. Creus et al. (2004) observaram, em condições similares e em plantas controle, um TRA de 92% podendo significar diferenças nas cultivares usadas, estágio fenológico avaliado, entre outras. Os resultados apontam que o potencial hídrico de -0,1 MPa não foi suficiente para promover o efeito de déficit hídrico (Figura 1A; Figura 1B; Figura 1C).

No período de 3 dias de deficiência hídrica, promovido pelo PEG - 6000, verificou-se que somente nas concentrações de -0,3 e -0,4 MPa houve diferenças significativas quanto ao TRA apresentando valores de 72,1 e 54,2%, respectivamente. O menor potencial hídrico foi obtido na maior concentração de PEG avaliada (Figura 1A).

No período de 5 dias de exposição ao agente osmorregulador (Figura 1B) constatou-se a ocorrência de diferenças significativas em relação ao TRA, a partir da concentração de -0,2 MPa (57,5%) e, à medida que o potencial hídrico diminuiu, ocorreu aumento na percepção do déficit pela redução do TRA (38%). Exceção foi o potencial de -0,4 MPa que apresentou menor redução em relação ao controle (10%) sendo ainda, porém, distinto do controle. A mesma tendência de diminuição do TRA foi observada no 7º dia de avaliação, em que os

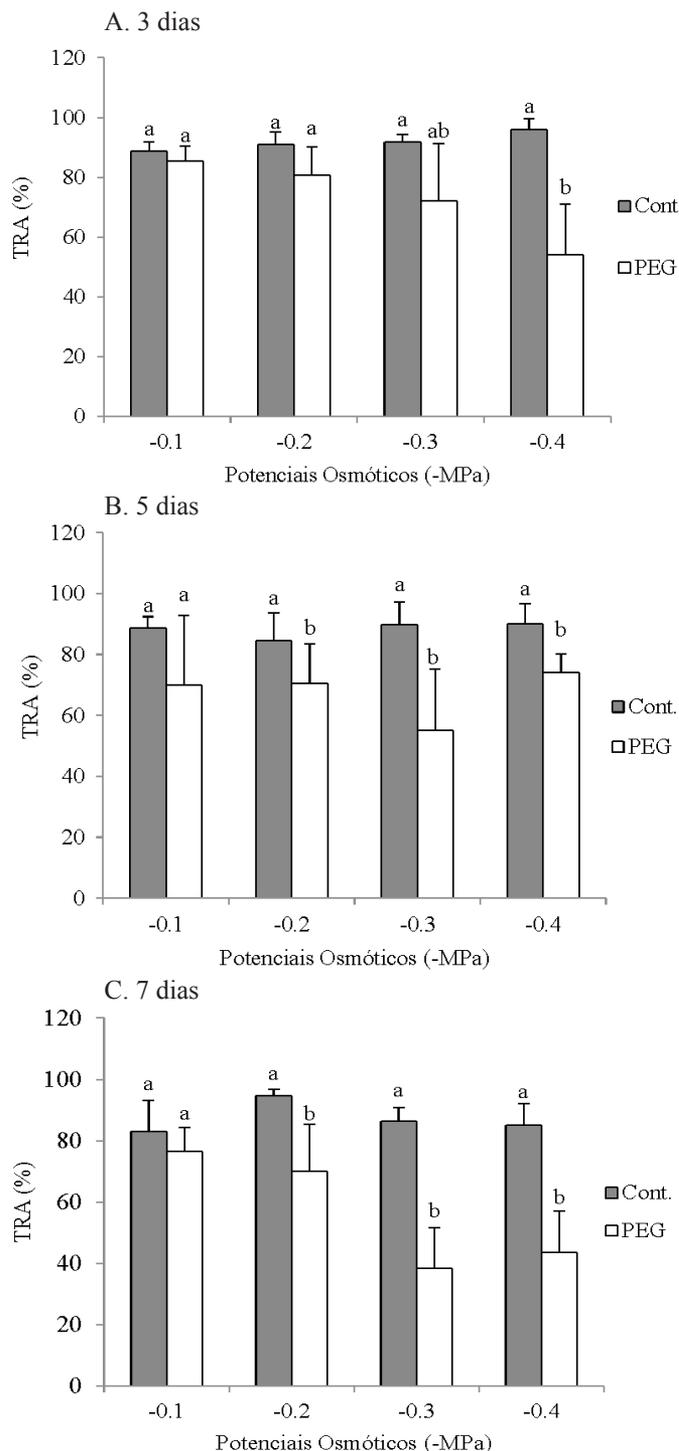


Figura 1. Teor Relativo de Água - TRA (%). Efeito das diferentes concentrações de PEG em função do período de: (A) 3 dias, (B) 5 dias e (C) 7 dias

potenciais de -0,3 e -0,4 MPa promoveram as maiores reduções de potenciais (54 e 50%) respectivamente.

Nayyar (2003) determinou, em trigo, valores de potencial osmótico de -0,4 MPa em condições em vaso na cultura do trigo, como aqueles que proporcionaram déficit hídrico leve, demonstrando a alta sensibilidade desta cultura à seca. Também na mesma cultura (cv CD 200126), Vendruscolo et al., (2007) observaram potenciais totais de água de -0,35 MPa em 8 dias de restrição hídrica como déficit severo em

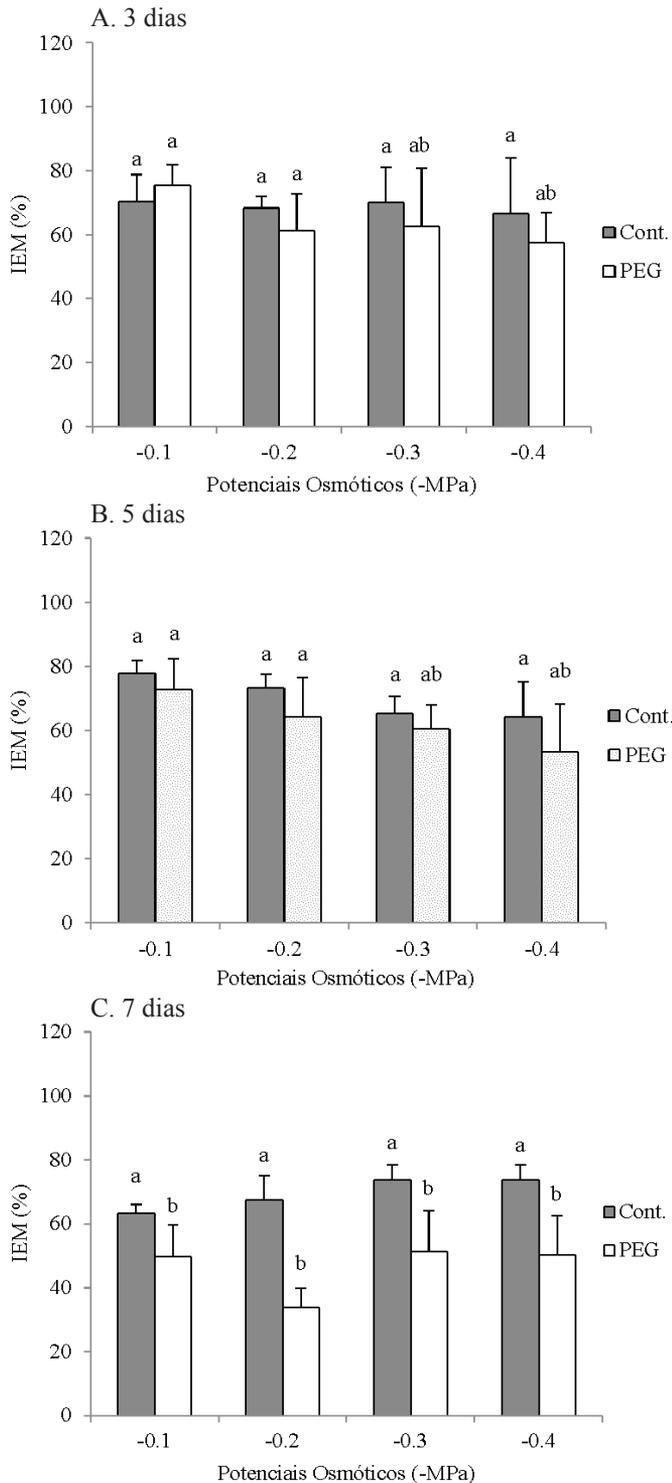


Figura 2. Índice de Estabilidade de Membrana - IEM (%). Efeito das diferentes concentrações de PEG em função do período de: (A) 3 dias, (B) 5 dias e (C) 7 dias

condições de vaso. Essas diferenças podem ser atribuídas a diferentes genótipos e condições de avaliação utilizadas. Os valores de potencial osmótico simulado neste experimento demonstram que potencial osmótico de $-0,3$ MPa ($151,41 \text{ g L}^{-1}$) e o período de 5 dias propiciaram efeitos similares ao déficit hídrico obtido em vasos.

Em relação ao Índice de Estabilidade de Membrana (IEM) os dados obtidos demonstraram que o potencial hídrico de $-0,1$

MPa não foi suficiente para causar o efeito de déficit hídrico nas plântulas avaliadas apenas nos períodos de 3 e 5 dias (Figura 2A; Figura 2B; Figura 2C). Aos 3 e 5 dias não houver diferenças significativas, porém se pode observar tendência de redução nos índices de estabilidade de membrana, nas diferentes concentrações de PEG - 6000 avaliadas (Figura 2A). Diferenças significativas foram observadas no período avaliado de 7 dias, em todos os potenciais hídricos avaliados, originando reduções de 17, 47, 33 e 36,6% nos valores dos IEM, respectivamente, em relação à planta controle.

Um dos fatores fisiológicos que a planta utiliza para evitar a seca, é o aprofundamento radicular, aumentando a capacidade de captação de água, sendo, assim, um mecanismo fundamental para a adaptação à seca (Liu et al., 2005). Neste trabalho verificou-se o aumento de pelos radiculares em todos os tratamentos, principalmente naqueles com o potencial osmótico $-0,3$ e $-0,4$ MPa (Figura 3), não concordando com os resultados

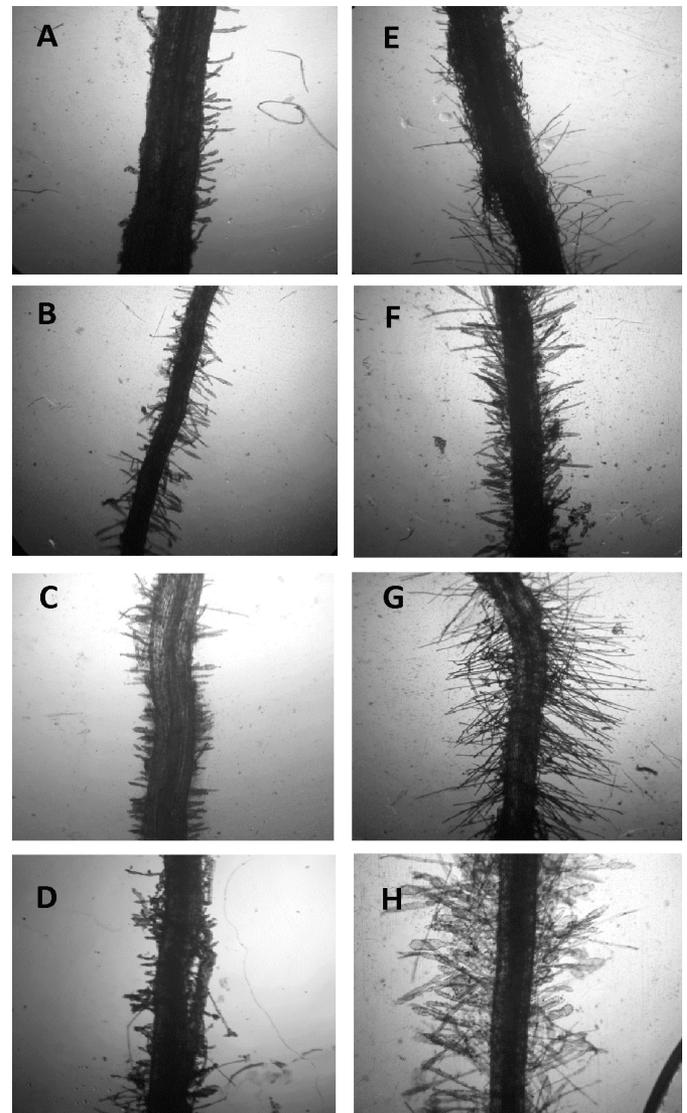


Figura 3. Raízes de plântulas de trigo avaliadas após 5 dias de exposição do PEG. (A, B, C e D) Plantas Controle; (E) Plantas cultivadas com PEG na concentração de $-0,1$ MPa; (F) Plantas cultivadas com PEG na concentração de $-0,2$ MPa; (G) Plantas cultivadas com PEG na concentração de $-0,3$ MPa; (H) Plantas cultivadas com PEG na concentração de $-0,4$ MPa (Aumento 100X)

encontrados por Noctor & Foyer (1998), nos quais não ocorreu crescimento de raízes de trigo e milho sob estresse. Morgan (1984) relatou que houve aumento da proporção raiz/parte aérea em condições de estresse hídrico, facilitando a absorção de água.

Na literatura são escassos os trabalhos através dos quais se avaliou o potencial hídrico induzido por PEG - 6000 *in vitro* na cultura do trigo. Em outras culturas, como feijão, constatou-se que, nas mesmas condições de déficit, o crescimento da radícula foi maior até o nível de -0,4 MPa (Meneses et al., 2007, Aazami et al., 2010). PEG - 6000 apresentou grande efeito de diminuição de germinação enquanto no crescimento de plântulas de feijão e beterraba (Queiroz et al., 1998, Sadeghian & Yavari, 2004), também se verificou, para a cultura da beterraba, diminuição severa no crescimento dessas plântulas. Fonseca & Perez (2003), também verificaram que sementes de *Adenanthera pavonina* germinaram até o potencial osmótico de -0,4 e -0,5 MPa. Níveis maiores que -0,4 MPa resultaram em plântulas menores e menos vigorosas, comprometendo seu estabelecimento em condições de campo (Meneses et al., 2007).

Já está bem documentado, na literatura, o fechamento dos estômatos por ocasião do déficit hídrico (Taiz & Zeiger, 2009). Neste experimento os estômatos das plantas controle permaneceram abertos, porém plântulas em meio com PEG apresentaram estômatos fechados (Figura 4) demonstrando que essas plântulas sofreram o déficit hídrico e mantiveram seus estômatos fechados para não perder água para o meio. Sadras & Connor (1993) e Tahir et al. (2003) verificaram que o potencial de água na folha e o potencial osmótico diminuíram em plantas estressadas, em todos os estágios de crescimento em sorgo.

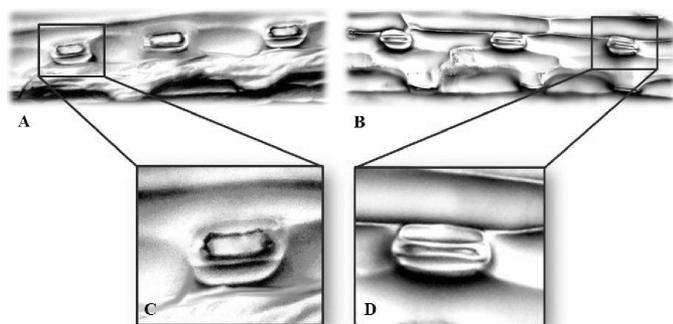


Figura 4. Imagens das folhas trigo (A) controle e (B) com PEG, com aumento de 100X. Em (C) e (D), zoom das imagens sobre o estômato de cada tratamento

Conclusão

O PEG - 6000 é um osmorregulador potente, que pode ser usado para simular as condições de déficit hídrico na cultura do trigo *in vitro* em que a concentração de -0,3 MPa e o período de 5 dias são suficientes para promover modificações morfológicas e de potenciais osmóticos nas plântulas de trigo.

Literatura Citada

- Aazami, M. A.; Torabi, M.; Jalili, E. *In vitro* response of promising tomato genotypes for tolerance to osmotic stress. *African Journal of Biotechnology*, v.9, n.26, p.4014-4017, 2010. <<http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/download/82552/72715>>. 23 Out. 2012
- Boyd, N. S.; Hughes, A. Germination and emergence characteristics of spreading dogbane (*Apocynum androsaemifolium*). *Weed Science*, v.59, n.4, p.533-537, 2011. <<http://wssajournals.org/doi/pdf/10.1614/WS-D-11-00022.1>> 28 Mar. 2014.
- Babu, R. C.; Zhang, J.; Blum, A.; David-Ho, T. H.; Wu, R.; Nguyen, H. T. HVA1, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. *Plant Science*, v.166, n.4, p.855-862, 2004. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.11.023>> 23 Out. 2012.
- Creus, C. M.; Sueldo, R. J.; Barasi, C. A. Water relations and yield in *Azospirillum*-inoculated wheat exposed to drought in the field. *Canada Journal Botanic*, v.82, p.273-281, 2004. <<http://www.bashanfoundation.org/barassi/barassidrought.pdf>>. 12 Out. 2012
- Cruz, C. D. Programa Genes: estatística experimental e matrizes. Viçosa: UFV - Universidade Federal de Viçosa, 2006. v.1, p. 285.
- Fonseca, S. C. L.; Perez, S. C. J. G. A. Ação do polietilenoglicol na germinação de sementes de *Adenanthera pavonina* L. e o uso de poliaminas na atenuação do estresse hídrico sob diferentes temperaturas. *Revista Brasileira de Sementes*, v.25, n.1, p.1-6, 2003. <<http://www.scielo.br/pdf/rbs/v25n1/19622.pdf>> 23 Out. 2013.
- Hamayoun, H.; Daliri, M. S.; Mehrabi, P. Study of PEG stress effects on wheat (*Triticum aestivum*) cultivars at germination stage. *Middle-East Journal of Scientific Research*, v.9, n.1, p.71-74, 2011. <[http://www.idosi.org/mejsr/mejsr9\(1\)11/12.pdf](http://www.idosi.org/mejsr/mejsr9(1)11/12.pdf)> 28 Mar. 2014.
- Hasegawa, P. M.; Bressan, R. A.; Zhu, J. K.; Bohnert, H. J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Plant Molecular Biology*, v.51, p.463-499, 2000. <http://www.ufv.br/dbv/pgfvg/bve684/htms/pdfs_revisao/estresse/review_saltstress.pdf> 02 Nov. 2012.
- Hassanein, M. A. Establishment of efficient *in vitro* method for drought tolerance evaluation in *Perlargonium spp* *Journal of Horticultural Science and Ornamental Plants*: v.2, n.1, p.8-15, 2010. <[http://www.idosi.org/jhsop/2\(1\)10/2.pdf](http://www.idosi.org/jhsop/2(1)10/2.pdf)> 28 Mar. 2014.
- Hassanpanah, D. Evaluation of potato advanced cultivars against water deficit stress under *in vitro* and *in vivo* condition. *Biotechnology*, v.9, n.2, p.164-169, 2010. <<http://scialert.net/qredirect.php?doi=biotech.2010.164.169&linkid=pdf>> 28 Mar. 2014.
- Holtman, W. L.; Heistek, J. C.; Mattern, K. A.; Bakhuizen, R.; Dumas, A. C. Oxidation of fatty acids is linked to the glyoxylate cycle in the aleurone but in the embryo of germinating barley. *Plant Science*, v.99, p.43-53, 1994. <[http://dx.doi.org/10.1016/0168-9452\(94\)90119-8](http://dx.doi.org/10.1016/0168-9452(94)90119-8)> 28 Mar. 2014.
- Jayakumar, K.; Jallel, C. A.; Vijayarengan, P. Changes in growth, biochemical constituents and antioxidant potentials in radish (*Raphanus sativus* L.) under cobalto stress. *Turk Journal Biology*, v.31, p.112-117, 2007. <<http://journals.tubitak.gov.tr/biology/issues/biy-07-31-3/biy-31-3-1-0703-11.pdf>> 18 Fev. 2013
- Jones, H. D. Wheat transformation: current technology and applications to grain development and composition. *Journal of Cereal Science*, v.41, n.2, p.137-147, 2005. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2004.08.009>>, 23 Out. 2012.

- Liu, F.; Christian, R.; Shahanzari, J. A.; Andersen, M. N.; Jacobsen, E. E. ABA regulated stomata control and photosynthetic water use efficiency of potato (*Solanum tuberosum* L.) during progressive soil drying. *Plant Science*, v.168, n.3, p.831-836, 2005. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.10.016>> 17 Out. 2012.
- Mahmood, I.; Razzaq, A.; Hafiz, I. A.; Kaleem, S.; Ali Khan, A.; Qayyum, A.; Ahmad, M. Interaction of callus selection media and stress duration for in vitro selection of drought tolerant callus of wheat. *African Journal of Biotechnology* v.11, n.17, p.4000-4006, 2012. <<http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/101043>> 29 Mar. 2014.
- Meneses, C. H. S. G.; Lima, L. H. G. M.; Lima, M. M. A.; Fernandes, P. D.; Bruno, R. L. A.; Vidal, M. S. Potencial hídrico induzido por Polietilenoglicol 6000 no vigor de sementes de algodoeiro. *Embrapa Agroecologia*, v.1, p.5-17, 2007. <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/629710/1/bot022.pdf>> 14 Set. 2012.
- Murashige, T.; Skoog, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962. <<http://garfield.library.upenn.edu/classics1978/A1978FR51700002.pdf>> 10 Out. 2011.
- Nayar, H. Accumulation of osmolytes and osmotic adjustment in water-stressed wheat (*Triticum aestivum* L.) and maize (*Zea mays*) as affected by calcium and its antagonists. *Environmental and Experimental Botany*, v.50, n.3, p.253-264, 2003. <http://journals.ohiolink.edu/ejc/article.cgi?issn=00988472&issue=v50i0003&article=253_aooaoabcaia> 25 Mar. 2013.
- Noctor, G.; Foyer, C. H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Ver. Journal of Plant Physiology*, v.49, p.249-279, 1998. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15012235>> 26 Mar. 2013.
- Queiroz, M. F.; Almeida, F. A. C.; Fernandes, P. D. Efeito do condicionamento osmótico no vigor de plântulas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.2, n.2, p.148-152, 1998. <<http://www.agriambi.com.br/revista/v2n2/148.pdf>> 14 Mar. 2013.
- Sadeghian, S. Y.; Yavari, N. Effect of water-deficit stress on germination and early seedling growth in sugar beet. *Journal of Agronomy and Crop Science*, v.190, n.2, p.138-144, 2004. <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-037X.2004.00087.x/abstract>> 16 Mai. 2013.
- Sadras, V. O.; Connor, D. J.; Whitfield, D. M. Yield, yield componentes and source-sink relationship in water stressed sunflower. *Field Crops Research*, v.31, p.27-39, 1993. <http://www.researchgate.net/publication/223317760_Yield_yield_components_and_source-sink_relationships_in_water-stressed_sunflower?ev=prf_cit> 19 Mai. 2013.
- Sakthivelu, G.; Akitha Devi, M. K.; Giridhar, P.; Rajasekaran, T.; Ravishankar, G. A.; Nedev, T.; Kosturkova, G. Drought-induced alterations in growth, osmotic potential and *in vitro* regeneration of soybean cultivars *Gen Applied Plant Physiology*, special issue. v.34, n.1-2, p.103-112, 2008. <http://www.bio21.bas.bg/ipp/gapbfiles/v-34_pisa-08/08_pisa_1-2_103-112.pdf> 30 Mar. 2014.
- Sanchez, A. C.; Subudhi, P. K.; Rosenow, D. T. Mapping QTLs associated with drought resistance in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Plant Molecular Biology*, v.48, n.5, p.713-726, 2002. <<http://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1014894130270>> 08 Abr. 2013.
- Schonfeld, M. A.; Johnson, R. C.; Breet, F. C.; Dolores, W. M. Water relations in winter wheat as drought resistance indicators. *Crop Science*, v.28, n.3, p.526-531, 1988. <<https://www.crops.org/publications/cs/abstracts/28/3/CS0280030526>> 14 Mar. 2013.
- Soliman, H. L. A.; Hendawy, M. H. Selection for drought tolerance genotypes in durum wheat (*Triticum durum* Desf) under *in vitro* conditions. *Middle-East Journal of Scientific Research*, v.14, n.1, p.69-78, 2013. <[http://www.idosi.org/mejsr/mejsr14\(1\)13/12.pdf](http://www.idosi.org/mejsr/mejsr14(1)13/12.pdf)> 30 Mar. 2014.
- Soni, P.; Rizwan, M.; Bhatt, K. V.; Mohapatra, T.; Singh, G. In vitro response of *Vigna aconitifolia* to drought stress induced by PEG-6000. *Journal of Stress physiology and Biochemistry*, v.7, n.3, p.108-121, 2011. <http://www.jspb.ru/issues/2011/N3/JSPB_2011_3_108-121.html> 29 Mar. 2014.
- Spaepen, S.; Dobbelaere, S.; Croonenborghs, A.; Vanderleyden, J. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant and Soil*, v.312, n.2, p.15-23, 2008. <<http://link.springer.com/article/10.1007%2F11104-008-9560-1>> 20 Jun. 2013.
- Staton, R.; Wu, H.; Lemerle, D. Factors affecting silverleaf nightshade (*Solanum elaeagnifolium*) germination. *Weed Science*. v.60, p.42-47, 2012. <<http://wssajournals.org/doi/pdf/10.1614/WS-D-11-00105.1>> 28 Mar. 2014.
- Tahir, F. M.; Ibrahim, M.; Hamid, K. Effect of drought stress on vegetative and reproductive growth behaviour of mango (*Mangifera indica* L.). *Asian Journal Plant Science*, v.2, p.116-118, 2003. <<http://scialert.net/abstract/?doi=ajps.2003.116.118>> 15 Jun. 2013.
- Taiz, L.; Zeiger, E. *Fisiologia Vegetal*. Porto Alegre. Artmed, 2009, 722p.
- Vendruscolo, E. C. G.; Schuster, I.; Pileggi, M.; Scapim, C. A.; Molinari, H. B. C.; Marur, C. J.; Vieira, L. G. E. Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *Journal of Plant Physiology*, v.164, n.10, p.1367-1376, 2007. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17604875>> 11 Mai. 2013.
- Verma, D.; Ansari, M. W.; Agrawal, G. K.; Rakwal, R.; Shukla, A.; Tuteja, N. *In vitro* selection and field responses of somaclonal variant plants of rice cv PR113 for drought tolerance. *Plant Signaling and Behavior*. v.8, n.4, 2013. <<http://www.landesbioscience.com/journals/psb/article/23519/>> 29 Mar. 2014.
- Verslues, P. E.; Agarwai, M.; Katiyae-Agarwai, S. Methods and concept in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant Journal*, v.46, n.6, p.523-539, 2006. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16441347>> 28 Mai. 2013.