

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 25/02/2018.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



INTENSIDADE DO ESTRESSE HÍDRICO MODULA A  
EXPRESSÃO DE AQUAPORINAS DURANTE A  
REIDRATAÇÃO EM *Sorghum bicolor*

**THAYSSA RABELO SCHLEY**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), área de concentração: Fisiologia Vegetal.

**BOTUCATU – SP  
2016**

Instituto de Biociências – Seção Técnica de Pós-Graduação  
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Botucatu-SP  
Brasil  
Tel (14) 3811-6148 fax (14) 3815-3744 posgraduacao@ibb.unesp.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"Júlio de Mesquita Filho"  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

INTENSIDADE DO ESTRESSE HÍDRICO MODULA A  
EXPRESSÃO DE AQUAPORINAS DURANTE A REIDRATAÇÃO  
EM *Sorghum bicolor*

**THAYSSA RABELO SCHLEY**

**PROF. DR. LUIZ FERNANDO ROLIM DE ALMEIDA**

ORIENTADOR

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia, Câmpus de Botucatu,  
UNESP, para obtenção do título de  
Mestre no Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Biológicas (Botânica),  
Área de concentração Fisiologia Vegetal.

**BOTUCATU – SP  
2016**

Instituto de Biotecnologia – Seção Técnica de Pós-Graduação  
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Botucatu-SP  
Brasil. Tel (14) 3811-6148 fax (14) 3815-3744  
posgraduacao@ibb.unesp.br

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Schley, Thayssa Rabelo.

Intensidade do estresse hídrico modula a expressão de aquaporinas durante a reidratação em *Sorghum bicolor* /  
Thayssa Rabelo Schley. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de  
Botucatu

Orientador: Luiz Fernando Rolim de Almeida  
Capes: 20303009

1. Sorgo. 2. Desidratação (Hídrica). 3. Expressão gênica.  
4. Aquaporinas.

Palavras-chave: Condutância estomática; Expressão gênica  
relativa; Limitação difusiva; Rendimento quântico.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

(Marthin Luther King)

**Dedico,**

À minha avó Silvia.

Aos meus pais Marcus e Simone.

Aos meus irmãos Nicholas, Alexia e Katherine.

## AGRADECIMENTOS

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Fernando Rolim de Almeida pela participação no meu processo de formação profissional e pessoal sempre com paciência, motivação e compreensão.

Aos meus pais, meus irmãos, meus avós, meus padrinhos e meus tios pelo amor incondicional e por me apoiarem sempre que precisei, em todos os momentos da minha vida.

Aos professores Dr. Gustavo Habermann, Dr. Ivan de Godoy Maia e Dr. João Pessoa de Araújo Júnior pelo auxílio teórico e metodológico.

Aos colegas de laboratório que se tornaram grandes amigos ao longo desses dois anos e auxiliaram sempre que precisei em cada obstáculo encontrado. Em especial à Angélica, Danilo, Luís Paulo, Angelo e Roberto que me ensinaram sem hesitar durante esses anos. Sem vocês eu não teria conseguido.

Aos profissionais Maria Helena, Kleber e Zé Du por toda ajuda burocrática e metodológica.

À família Convento por ter sido a melhor escolha feita em 2009. Agradeço pelas imensas alegrias, por cada risada compartilhada, por cada lágrima amparada, por cada abraço, pela paciência, amizade e companheirismo.

Às amigas de sempre Marianna, Emanuelle, Bruninha, Bruna, Dendê, Tchimi e Son por serem de sempre e para sempre.

Às amigas mais malucas Loba, Vegas, Isadora e Mococa pela liberdade e por me ensinarem que a normalidade não existe.

Aos colegas da Botânica e do IBTEC que contribuíram profissionalmente e divertidamente durante o Mestrado.

## Sumário

RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	2
1. INTRODUÇÃO .....	3
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	7
2.1. <i>Material biológico</i> .....	7
2.2. <i>Local do experimento</i> .....	7
2.3. <i>Determinação dos tratamentos</i> .....	7
2.4. <i>Preparo do solo e condições de crescimento</i> .....	7
2.5. <i>Delineamento experimental e coleta de dados</i> .....	8
2.6. <i>Variáveis ecofisiológicas analisadas</i> .....	9
2.7. <i>Análise da expressão gênica</i> .....	10
2.8. <i>Análise de dados</i> .....	11
3. RESULTADOS .....	12
3.1. <i>Relações hídricas</i> .....	12
3.2. <i>Trocas gasosas</i> .....	12
3.3. <i>Fluorescência da clorofila a</i> .....	13
3.4. <i>Análise da expressão gênica de aquaporinas</i> .....	13
4. DISCUSSÃO .....	14
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	20
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	21
7. FIGURAS E TABELAS .....	28
ANEXO .....	37

**Lista de abreviações**

- C:** tratamento controle
- DHM:** deficiência hídrica moderada
- DHS:** deficiência hídrica severa
- DHSP:** deficiência hídrica severa progressiva
- AQPs:** aquaporinas
- PIPs:** proteínas intrínsecas da membrana plasmática
- TIPs:** proteínas intrínsecas do tonoplasto
- ABA:** ácido abscísico
- Rubisco:** ribulose 1,5 bifosfato carboxilase/ oxigenase
- $\Psi_w$ : potencial químico da água
- CRA:** conteúdo relativo de água da folha
- PD:** período pré-manhã
- MD:** período meio-dia
- $A_{Net}$ : taxa de assimilação de CO<sub>2</sub>
- E:** taxa de transpiração
- gs:** condutância estomática
- Ci:** concentração interna de CO<sub>2</sub>
- A/E:** eficiência do uso da água
- A/Ci:** eficiência aparente de carboxilação
- DFFF:** densidade de fluxo de fótons fotossintéticos
- PSII:** fotossistema II
- Fv/Fm:** eficiência quântica máxima do PSII
- ΦPSII:** rendimento quântico efetivo do PSII
- ETR:** taxa de transporte de elétrons
- qP:** dissipação fotoquímica
- NPQ:** dissipação não – fotoquímica
- MST:** massa seca total
- AF:** área foliar
- AFE:** área foliar específica

## Lista de Figuras

- Figura 1:** Delineamento experimental realizado em plantas de *Sorghum bicolor* submetidas a diferentes intensidades de deficiência hídrica e subsequente reidratação.....27
- Figura 2:** Relações hídricas de *Sorghum bicolor* submetido aos tratamentos controle (C), deficiência hídrica moderada (DHM), deficiência hídrica severa (DHS) e deficiência hídrica severa progressiva (DHSP) ao longo do experimento.....28
- Figura 3:** Trocas gasosas de *Sorghum bicolor* submetido aos tratamentos controle (C), deficiência hídrica moderada (DHM), deficiência hídrica severa (DHS) e deficiência hídrica severa progressiva (DHSP) ao longo do experimento.....29
- Figura 4:** Curvas de luz dos parâmetros da fluorescência da clorofila *a* de *Sorghum bicolor* submetido aos tratamentos controle (C), deficiência hídrica moderada (DHM), deficiência hídrica severa (DHS) e deficiência hídrica severa progressiva (DHSP) no final da deficiência hídrica (dia 19) e quando houve a recuperação desses parâmetros após a reidratação (após 48 horas da reidratação)..... 30
- Figura 5:** Eficiência quântica máxima do PSII (Fv/Fm) de *Sorghum bicolor* submetido aos tratamentos controle (C), deficiência hídrica moderada (DHM), deficiência hídrica severa (DHS) e deficiência hídrica severa progressiva (DHSP) ao longo do experimento..... 31
- Figura 6:** Expressão relativa dos genes de aquaporinas nas folhas de *Sorghum bicolor* submetido aos tratamentos deficiência hídrica moderada (DHM), deficiência hídrica severa (DHS) e deficiência hídrica severa progressiva (DHSP) ao longo do experimento..... 32
- Figura 7:** Massa seca de *Sorghum bicolor* submetido aos tratamentos controle (C), deficiência hídrica moderada (DHM), deficiência hídrica severa (DHS) e deficiência hídrica severa progressiva (DHSP) no último dia de deficiência hídrica (dia 20) e no último dia de reidratação (dia 32).....33

**Lista de Tabelas**

- Tabela 1:** Iniciadores específicos das AQPs selecionadas analisados pelo ([http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr\\_primer\\_stats.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html))..... 34
- Tabela 2:** Área foliar (AF) e área foliar específica (AFE) de *Sorghum bicolor* submetido aos tratamentos controle, deficiência hídrica moderada (DHM), deficiência hídrica severa (DHS) e deficiência hídrica severa progressiva (DHSP) no último dia de deficiência hídrica (dia 20) e no último dia da reidratação (dia 32)..... 35

## RESUMO

Espera-se que os efeitos da seca aumentem e alterem a duração do estresse hídrico nos próximos anos em diferentes regiões agrícolas. A recuperação fisiológica após o estresse hídrico ainda não é compreendida e as aquaporinas (AQPs) participam do processo de recuperação. Nosso objetivo foi avaliar se as aquaporinas estão associadas com o processo de recuperação fisiológica nas folhas após a reidratação. Plantas de *Sorghum bicolor* L. (Moench) foram submetidas a diferentes intensidades de estresse hídrico durante 20 dias e posterior reidratação durante 12 dias. Durante estes períodos, as variáveis de relações hídricas, fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas e a expressão dos genes *PIP1,5*, *PIP2;2* e *TIP1;1* foram avaliados. Plantas submetidas ao déficit hídrico moderado (DHM) mostraram mesmos valores do controle em todas as variáveis fisiológicas e aumento da expressão das aquaporinas no final do déficit hídrico. Enquanto as plantas da deficiência hídrica severa (DHS) e severa progressiva (DHSP) apresentaram diminuição nas variáveis de relações hídricas, limitação estomática e não estomática da fotossíntese e baixa expressão das aquaporinas. Após a reidratação, as plantas desses tratamentos apresentam conjunto de ajustes fisiológicos que permitem o retorno da fotossíntese 144 horas após o fornecimento de água, sendo a limitação estomática a maior responsável pela recuperação. As AQPs analisadas são responsivas à reidratação somente nas plantas que não tiveram controle da reposição de água no solo (DHSP). Observamos um padrão das respostas dessas AQPs que depende da intensidade da deficiência hídrica e não da especificidade da AQP. Provavelmente elas influenciam diferentemente nos ajustes fisiológicos ocorridos durante a recuperação. Além disso, essas AQPs podem contribuir para manutenção de baixos valores de *g<sub>s</sub>* e conseqüentemente *A<sub>Net</sub>*, pois a recuperação dessas variáveis fisiológicas ocorre concomitantemente com a recuperação das AQPs em nível do controle 144 horas após a reidratação.

**Palavras-chave:** limitação difusiva, condutância estomática, rendimento quântico, expressão gênica relativa.

**ABSTRACT**

It is expected that the effects of drought increase and change the duration of water stress in the coming years in different agricultural regions. The physiological recovery after water stress is still not well understood and aquaporins (AQPs) participate in the recovery process. Our aim was evaluate whether aquaporins are associated with physiological recovery process in leaves after rehydration. *Sorghum bicolor* L. (Moench) plants were submitted to different intensities of water stress during 20 days and subsequent rehydration for 12 days. During these periods, variables of water relations, chlorophyll fluorescence, gas exchange and *PIP1;5*, *PIP2;2* and *TIP1;1* gene expression were evaluated. Moderate water deficit (DHM) plants showed same values of control in all physiological variables and increased aquaporins expression in the end of water deficit. While severe (DHS) and progressive severe water stress (DHSP) plants had decreased water relations, diffusive and non-diffusive limitation of photosynthesis and low aquaporins expression. After rehydration, plants of these treatments have set of physiological adjustments that enable the return of photosynthesis 144 hours after the water supply. Stomatal limitation was the most responsible for recovery. The AQPs analyzed are responsive to rehydration only in plants that did not have control of water replacement in the soil (DHSP). We observed a pattern of responses of these AQPs that depends on the intensity of water deficit and not the AQP specificity. Probably they influence differently in physiological adjustments that occur during recovery. Furthermore, these AQPs may contribute to maintaining low  $g_s$ , and thus, ANet values, because the recovery of these physiological variables occurs concurrently with the recovery of AQPs 144 hours after rehydration.

**Keywords:** water stress, stomatal conductance, quantum yield, relative gene expression.

## 1. INTRODUÇÃO

As mudanças climáticas, o aquecimento global e a variação da intensidade e da frequência da seca promovem a escassez de água na agricultura e afetam a demanda de alimentos para a população humana. A falta de disponibilidade de água é um dos fatores abióticos que mais interfere na produtividade dos cultivos agrícolas (Gleick 2003), pois na maioria das situações de estresse hídrico a difusão de CO<sub>2</sub> diminui nos sítios de carboxilação, altera o balanço de carbono da planta e reduz a fotossíntese (Galmés *et al.* 2007a). O fechamento estomático e a diminuição da condutância de CO<sub>2</sub> do mesófilo foliar são responsáveis por essa limitação difusiva da assimilação líquida (Ennahli e Earl 2005).

Segundo Sakai e Larcher (1987), o estresse é caracterizado por mudanças no aparato estrutural e na interação de vários processos em nível molecular e celular afetando as funções vitais da planta como um todo. Sob estresse hídrico, o transporte de água nas plantas, e conseqüentemente a manutenção de água nos tecidos, é afetado (Kudoyarova *et al.* 2013). Isso ocorre, pois o  $\Psi_w$  do solo diminui e interfere no contínuo solo-planta-atmosfera. Portanto, ajustes no processo de perda e absorção de água são acionados a fim de manter o estado hídrico das plantas. Para absorção de água é necessário o investimento no crescimento das raízes e aumento da eficiência da condutância hidráulica.

Já o controle da perda de água é determinado pela taxa de transpiração e permite a tolerância ao estresse hídrico uma vez que ocorre a diminuição da abertura estomática, sendo um dos principais mecanismos de controle da restrição hídrica. Sabe-se que o fechamento estomático pode ocorrer passivamente ou ativamente. O fechamento estomático ativo está relacionado com a mudança na atividade dos canais de íons presentes nas células-guardas, que alteram o potencial osmótico, aumentando o  $\Psi_w$  dessas células. A saída de água para as células vizinhas (células subsidiárias) provoca o fechamento estomático (Kaldenhoff *et al.* 2008). Esse autor ainda explica que o fechamento estomático é resultado de sinais químicos e hidráulicos. A sinalização química é caracterizada por rotas dependentes e independentes do Ácido Abscísico (ABA). As raízes são responsáveis pela sinalização desse hormônio, que atinge as células-guarda via xilema e provoca o fechamento estomático (Kudoyarova *et al.* 2013). No entanto, Kholodova *et al.* (2006) comprovaram que o estresse hídrico promove, inicialmente, a sinalização hidráulica oriunda das raízes. A falta de água nas raízes diminui drasticamente a pressão hidráulica no xilema e provoca diminuição da turgescência das células da folha, iniciando o processo de fechamento estomático.

O estudo dessas respostas estomáticas em relação às variações ambientais e fisiológicas da planta permite compreender a tolerância ao estresse, pois os estômatos

possuem papel importante nas trocas gasosas, interferindo no balanço entre água perdida e carbono assimilado (Chaves *et al.* 2003). Sendo assim, o fechamento estomático é o principal fator que diminui a captação de CO<sub>2</sub>, restringindo sua difusão, e conseqüentemente prejudicando a fotossíntese (Cornic 2000; Chaves *et al.* 2003).

Outro fator normalmente associado ao estresse hídrico que contribui para a diminuição da fotossíntese é o excesso de luz incidente nas folhas. Para diminuir os danos causados pelo excesso de luz, as plantas podem converter a luz absorvida para a etapa fotoquímica em outros processos, tais como dissipação térmica ou fluorescência (Demmig-adams e Adams 1996). Nessas condições, há diminuição da dissipação fotoquímica (qP), menor taxa de transporte de elétrons (ETR), e conseqüentemente menor rendimento quântico efetivo do fotossistema II ( $\Phi$ PSII). Também se observa maior dissipação não-fotoquímica (NPQ), indicando maior dissipação de calor pelas xantofilas presentes no complexo antena, e queda na eficiência quântica máxima do PSII ( $F_v/F_m$ ), indicando danos nos centros de reação (Chaves *et al.* 2003). Essas variáveis representam a fluorescência da clorofila *a* e permitem compreender a eficiência fotoquímica das plantas (Santos *et al.* 2013).

As características do estresse, tais como duração, severidade e número de exposições, interferem nas respostas fisiológicas das espécies vegetais (Chaves *et al.* 2003) e permitem entender como os principais processos metabólicos e bioquímicos são afetados. A maioria dos estudos enfoca o estresse hídrico severo, que normalmente resulta em queda da fotossíntese e perturbação do metabolismo momentos antes do ponto de murcha permanente (Shao *et al.* 2008). Outro tipo de estresse estudado é o estresse severo progressivo, onde fornecimento de água é suprimido até que os sinais de morte da espécie vegetal apareçam. Segundo Flexas *et al.* (2006a), esse tipo de estresse normalmente é utilizado para estudar os genes envolvidos na tolerância à seca, esclarecendo respostas fisiológicas e moleculares. Porém, em condições naturais a falta de água frequentemente ocorre durante diferentes fases de desenvolvimento da planta, de forma sazonal, por curtos períodos e permite que espécies tolerantes à seca sobrevivam e completem seu ciclo de vida (Harb *et al.* 2010). Isso explica a necessidade de se estudar o estresse hídrico moderado, mantendo-as em nível subletal para as plantas (Harb *et al.* 2010).

Sendo assim, a severidade da seca interfere em mecanismos que levam à aclimação, e posterior adaptação da planta ao estresse hídrico (Kudoyarova *et al.* 2013). De qualquer forma, o conjunto de respostas à seca não depende somente da capacidade de aclimação, mas também da capacidade de recuperação após o período de reidratação. A recuperação da espécie vegetal está intimamente relacionada com a completa recuperação

das taxas fotossintéticas. Sendo assim, respostas estomáticas após a reidratação devem possibilitar a abertura estomática, permitindo que as trocas gasosas e taxas fotossintéticas ocorram de forma semelhante às aquelas observadas antes do estresse. Essa recuperação fotossintética parece depender do grau e da velocidade do declínio da fotossíntese durante o período de estresse hídrico (Flexas *et al.* 2006a). No entanto, estudos que avaliam a capacidade de recuperação após diferentes intensidades de estresse hídrico, bem como investigam quais variáveis fisiológicas limitam a recuperação, são escassos e necessitam maior atenção (Flexas *et al.* 2006a).

Além da investigação das mudanças fisiológicas durante o estresse hídrico e o processo de recuperação, faz-se necessário a investigação da alteração da expressão de diversos genes que são responsáveis pela codificação de proteínas envolvidas com a tolerância das plantas (Silva *et al.* 2013). De acordo com os mesmos autores, dentre essas proteínas estão as aquaporinas (AQPs).

As AQPs são proteínas que têm como função facilitar e regular a passagem de água passivamente entre as membranas (Lian *et al.* 2004), sendo responsáveis por até 85% do transporte de água nos vegetais, regulando o componente radial deste transporte em raízes e folhas (Maurel *et al.* 2008). Logo, a presença das AQPs na membrana é essencial quando altas taxas de transporte de água são requeridas, como por exemplo, durante captação de água pela raiz, alongamento celular e movimento dos estômatos (Kaldenhoff *et al.* 2008).

O papel das AQPs no transporte de água tem sido comprovado através de sua expressão em *Xenopus laevis*, e os mesmos trabalhos indicam que além de água, algumas AQPs podem transportar outras moléculas pequenas como glicerol e íons (Tyerman *et al.* 2002). Em adição, com a descoberta da localização subcelular da *NtAQP1* na membrana dos cloroplastos, Uehlein *et al.* (2008) demonstraram o importante papel fisiológico dessas proteínas em facilitar o transporte de CO<sub>2</sub> para o seu sítio de assimilação no estroma dos cloroplastos. Esse e outros estudos (Terashima e Ono 2002; Flexas *et al.* 2006b; Uehlein *et al.* 2003) vêm ressaltando a capacidade das AQPs em alterar a condutância das células do mesófilo foliar devido essa função transportadora de CO<sub>2</sub>.

AQPs fazem parte da super família MIP (proteínas intrínsecas de membrana) e são classificadas em cinco sub-famílias: proteínas intrínsecas da membrana plasmática (PIPs), proteínas intrínsecas do tonoplasto (TIPs), proteínas NOD26 (NIPs), proteínas intrínsecas básicas (SIPs) e proteínas não caracterizadas (XIPs) (Danielson e Johanson 2008). Devido à distinta localização subcelular e perfil de regulação, PIPs e TIPs apresentam-se como principais AQPs relacionadas à regulação do transporte de água através da membrana plasmática e tonoplasto do vacúolo, respectivamente (Chrispeels e Maurel 1994). Nas

folhas, assim como nas raízes, a regulação das PIPs controla o movimento radial de água, enquanto que as TIPs determinam o padrão de ajuste osmótico entre vacúolo e citoplasma (Javot e Maurel 2002). Em *Sorghum bicolor*, a subfamília TIP é dividida em cinco subgrupos (TIP1 até TIP5) e a subfamília PIP em dois subgrupos (PIP1 e PIP2) (Reddy *et al.* 2015), sendo a PIP1 menos eficiente no transporte de água do que a PIP2 (Tyerman *et al.* 2002).

Os estudos moleculares envolvendo análise de expressão de AQPs e relações hídricas na planta vêm melhorando a compreensão dos mecanismos envolvidos no transporte de água, particularmente, nas raízes (Maurel *et al.* 2008). Por exemplo, estudos de condutividade hidráulica em raízes de sorgo (Liu *et al.* 2014), absorção de água pelas raízes de cevada (Knipfer *et al.* 2011) e regulação do transporte de água por pH citosólico em raízes de *Arabidopsis* (Tournaire Roux *et al.* 2003). No entanto, o papel AQPs na regulação do transporte de água e outras substâncias em processos fisiológicos da folha são escassos (Maurel *et al.* 2008). Por exemplo, o trabalho mais completo sobre aquaporinas em sorgo, Reddy *et al.* (2015) estudaram quatro órgãos diferentes, mas não descreveu as AQPs em folhas adultas.

O papel das aquaporinas em processos fisiológicos da planta também tem sido desvendado através de estudos com estresse hídrico (Vandeleur *et al.* 2009; Silva *et al.* 2013; Ocheltree *et al.* 2014). No entanto, esses estudos encontram resultados diversos, apresentando aumento, diminuição ou nenhuma alteração na expressão das AQPs (Tyerman *et al.* 2002). Para alguns pesquisadores, o aumento na expressão das AQPs melhora a capacidade das plantas em sobreviver com o estresse hídrico, outros acreditam que a inativação dessas proteínas esteja associada com a diminuição de perdas excessivas de água (Gaspar 2011). Outra explicação para a ocorrência desses resultados diversos é a diferença no tempo e na intensidade do estresse hídrico, que podem afetar a expressão (Galmés *et al.* 2007a), bem como se há ou não adaptação à seca (Lian *et al.* 2004).

Em adição, a função das AQPs na recuperação do estresse hídrico ainda não foi claramente revelada, podendo atuar como reguladores positivos ou negativos no processo de recuperação (Jang *et al.* 2013). Por exemplo, os mutantes de *Arabidopsis* com expressão reduzida de PIP1 e PIP2 submetidos a estresse hídrico não diferiram do controle nas variáveis fisiológicas analisadas. No entanto, durante o processo de recuperação, os mutantes recuperaram mais lentamente seus valores de condutividade hidráulica, taxa de transpiração e potencial da água da folha do que as plantas controle (Martre *et al.* 2002). Em contraste, a super expressão de PIP1;2 compromete a tolerância ao estresse no tabaco, levando-o à morte (Aharon *et al.* 2003).

Portanto, a investigação dos efeitos fisiológicos e moleculares nas respostas a diferentes intensidades de estresse e posterior recuperação permite compreender a capacidade de aclimatação das plantas e conseqüentemente a tolerância ao estresse hídrico. O objetivo do nosso trabalho foi avaliar como as AQPs participam do processo de recuperação fisiológica das folhas após diferentes intensidades de deficiência hídrica. Sendo nossa hipótese que as AQPs estão associadas com o processo de recuperação hídrica da folha e com a retomada da condutância estomática.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso estudo apresenta as respostas moleculares e fisiológicas ocorridas em *Sorghum bicolor* durante diferentes intensidades de estresse hídrico e seguinte recuperação após a reidratação. Apresentamos as limitações que ocorrem após a reidratação que impedem rápida recuperação fotossintética dessas plantas, destacando o papel das AQPs e da condutância estomática para tal recuperação fotossintética. Assim, esperamos ter sanado algumas lacunas do conhecimento sobre a recuperação hídrica das plantas.

Porém, destacamos aqui a dificuldade de interpretar os dados da expressão gênica das AQPs e sua relação com as variáveis ecofisiológicas, uma vez que os dados obtidos das AQPs aqui e na literatura são bem diversos e muitas vezes inconclusivos. Sendo assim, muito ainda precisa ser feito para que possamos entender o papel dessas proteínas na recuperação hídrica e fotossintética das plantas. Sugerimos estudos que abranjam mais tipos de AQPs, bem como aqueles que procuram desvendar funções e localizações específicas de AQPs já descobertas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHARON R., SHAHAK Y, WININGER S, BENDOV R, KAPULNIK Y, GALILI G. 2003. Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress. *The Plant Cell* **15**,439- 447.
- ALEXANDERSSON E, FRAYSSE L, SJOVALL-LARSEN S, GUSTAVSSON S, FELLERT M, KARLSSON M, JOHANSON U, KJELLBOM P. 2005. Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Molecular Biology* **59**, 469–484.
- ALVAREZ RCF, HABERMANN G, CRUSCIOL AC, NASCENTE AS, RODRIGUES JD. 2015. *Bragantia* **74** (1), 1-8.
- AROCA R, FERRANTE A, VERNIERI P, CHRISPPEELS, MJ. 2006. Drought, Abscisic Acid and Transpiration Rate Effects on the Regulation of PIP Aquaporin Gene Expression and Abundance in *Phaseolus vulgaris* Plants. *Annals of Botany* **98**, 1301–1310.
- BAKER NR. 2008. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 89-113.
- CHAVES MM, FLEXAS J, PINHEIRO C. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* **103**, 551–560.
- CHAVES MM, MAROCO JP, PEREIRA JS. 2003. Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* **30**, 239–264.
- CHRISPPEELS MJ, MAUREL C. 1994. Aquaporins: the molecular basis of facilitated water movement through living plant cells? *Plant Physiology* **105**, 9-13.
- COCHARD H, VENISSE JS, BARIGAH TS, BRUNEL N, HERBETTE S, GUILLIOT A, TYREE MT, SAKR S. 2007. Putative role of aquaporins in variable hydraulic conductance of leaves in response to light. *Plant Physiology* **143**, 122-133.
- COOK D, RIMANDO AM, CLEMENTE TE, SCHRÖDER J, DAYAN FE, NANAYAKKARA NPD, PAN Z, NOONAN BP, FISHBEIN M, ABE I, DUKE SO, BAERSON SR. 2010. Alkylresorcinol synthases expressed in sorghum bicolor root hairs play an essential role in the biosynthesis of the allelopathic benzoquinone sorgoleone. *The Plant Cell* **22**, 867–887.
- CORNIC G. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture – not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant Science* **5**, 187-188.
- COUPE SA, PALMER BG, LAKE JA, OVERY SA, OXBOROUGH K, WOODWARD FI, GRAY JE, QUICK WP. 2006. Systemic signaling of environmental cues in Arabidopsis leaves. *Journal of Experimental Botany* **57** (2), 329-341.

- CHOUDHARY S, SINCLAIR TR. 2014. Hydraulic conductance differences among sorghum genotypes to explain variation in restricted transpiration rates. *Functional Plant Biology* **41**, 270-275.
- DEMMIG-ADAMS B, ADAMS III WW. 1996. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science* **1**, 21–26.
- DANIELSON JAH, JOHANSON U. 2008. Unexpected complexity of the Aquaporin gene family in the moss *Physicomitrella patens*. *BMC Plant Biology* **8**, 45.
- DEL SOL A, ARAUZO-BRAVO MJ, AMOROS D, NUSSINOV R. 2007. Modular architecture of protein structures and allosteric communications: potential implications for signaling proteins and regulatory linkages. *Genome Biology* **8**, 92.
- ELSHEERY NI, CAO EKF. 2008. Gas exchange, chlorophyll fluorescence, and osmotic adjustment in two mango cultivars under drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, **30**, 769-777.
- ENNAHLI S, EARL HJ. 2005. Physiological limitations to photosynthetic carbon assimilation in cotton under water stress. *Crop Science* **45**, 2374–2382.
- FERRIO JP, POU A, FLOREZ-SARASA I, GESSLER A, KODAMA N, FLEXAS J, RIBAS-CARBO M. 2012. The Peclet effect on leaf water enrichment correlates with leaf hydraulic conductance and mesophyll conductance for CO<sub>2</sub>. *Plant, Cell & Environment* **35**, 611–625.
- FLEXAS J, BOTA J, CIFRE J, ESCALONA JM, GALMÉS J, GULÍAS J, LEFI EK, MARTÍNEZ-CANELLAS SF, MORENO MT, RIBAS-CARBÓ MT, RIERA D, SAMPOL B, MEDRANO H. 2004. Understanding down-regulation of photosynthesis under water stress: future prospects and searching for physiological tools for irrigation management. *Ann Applied Biology* **144**, 273–283.
- FLEXAS J, BARBOUR M, BRENDEL O, *et al.* 2012. Mesophyll diffusion conductance to CO<sub>2</sub>: an unappreciated central player in photosynthesis. *Plant Science* **193–194**, 70–84.
- FLEXAS J, BOTA J, GALMÉS J, MEDRANO H, RIBAS-CARBÓ M. 2006a. Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Physiol Plant* **127**, 343–352.
- FLEXAS J, RIBAS-CARBÓ M, HANSON DT, BOTA J, OTTO B, CIFRE J, MCDOWELL N, MEDRANO H, KALDENHOFF R. 2006b. Tobacco aquaporin NtAQP1 is involved in mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> in vivo. *The Plant Journal* **48**, 427-439.
- FRACASSO A, TRINDADE L, AMDUCCI S. 2016. Drought tolerance strategies highlighted by two Sorghum bicolor races in a dry-down experiment. *Journal of Plant Physiology* **190**, 1-14.

- GALLÉ A, HALDIMANN P, FELLER U. 2007. Photosynthetic performance and water relations in young pubescent oak (*Quercus pubescens*) trees during drought stress and recovery. *New phytologist* **174**, 799-810.
- GALMÉS J, POU A, ALSINA MM, TOMÁS M, MEDRANO H, FLEXAS J. 2007a. Aquaporin expression in response to different water stress intensities and recovery in Richter-110 (*Vitis* sp.): relationship with ecophysiological status. *Planta* **226**, 671-681.
- GALMÉS J, MEDRANO H, FLEXAS J. 2007b. Photosynthetic limitations in response to water stress and recovery in Mediterranean plants with different growth forms. *New Phytologist*, **175**, 81–93.
- GASPAR M. 2011. Aquaporinas: de canais de água a transportadores multifuncionais em plantas. *Revista Brasileira de Botânica* **34**, 481-491.
- GLEICK P. 2003. Global freshwater resources: soft-path solutions for the 21st century. *Science* **302**, 1524–1528.
- HABERMANN G, ELLSWORTH PFV, CAZOTO JL, SIMÃO E, BIERAS AC. 2011. Comparative gas exchange performance during the wet season of three Brazilian *Styrax* species under habitats conditions of cerrado vegetation types differing in soil water availability and crown density. *Flora* **206**, 351-359.
- HACHEZ C, HEINEN RB, DRAYE X, CHAUMONT F. 2008. The expression pattern of plasma membrane aquaporins in maize leaf highlights their role in hydraulic regulation. *Plant Molecular Biology* **68**, 337–353.
- HACHEZ C, ZELAZNY E, CHAUMONT F. 2006. Modulating the expression of aquaporin genes in planta: a key to understand their physiological functions? *Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes* **1758**, 1142–1156.
- HARB A, KRISHNAN A, MADANA MR, PEREIRA A, PEREIRA A. 2010. Molecular and physiological analysis of drought stress in *Arabidopsis* reveals early responses leading to acclimation in plant growth. *Plant Physiology* **154**, 1254-1271.
- HEINEN RB, YE Q, CHAUMONT F. 2009. Role of aquaporins in leaf physiology. *Journal of Experimental Botany* **60**(11), 2971-2985.
- HUSSAIN SS, IQBAL MT, ARIF MA, AMJAD M. 2011. Beyond osmolytes and transcription factors: drought tolerance in plants *via* protective proteins and aquaporins. *Biologia Plantarum* **55** (3), 401-413.
- JANG HY, YANG SW, CARLSON JE, KU YG, AHN SJ. 2013. Two aquaporins of *Jatropha* are regulated differentially during drought stress and subsequent recovery. *Journal of Plant Physiology* **170**, 1028-1038.
- JAVOT H, MAUREL C. 2002. The role of aquaporins in root water uptake. *Annals of*

*Botany* **90**, 301-313.

KALDENHOFF R, RIBAS-CARBO M, FLEXAS J, LOVISOLO C, HECKWOLF M, UEHLEIN N. 2008. Aquaporins and plant water balance. *Plant, Cell and Environment* **31**, 658–666.

KALDENHOFF R, FISCHER M. 2006. Aquaporins in plants. *Acta Physiologica* **187**, 169–176.

KELLY G, SADE N, ATTIA Z, SECCHI F, ZWIENIECKI M, HOLBROOK NM, LEVI A, ALCHANATIS V, MOSHELION M, GRANOT D. 2014. Relationship between hexokinase and the aquaporin PIP1 in the regulation of photosynthesis and plant growth. *Plos one* **9**(2) e87888.

KHOLODOVA VP, MESHCHERYAKOV AB, RAKITIN VYU, KARYAGIN VV, KUZNETSOV VLV. 2006. Hydraulic Signal as a “Primary Messenger of Water Deficit” under Salt Stress in Plants. *Doklady Biological Sciences* **407**, 155–157.

KNIPFER T, BESSE M, VERDEIL JL, FRICKE W. 2011. Aquaporin-facilitated water uptake in barley (*Hordeum vulgare* L.) roots. *Journal of Experimental Botany* **62** (12), 4115-4126.

KUDOYAROVA GR, KHOLODOVA VP, VESELOV DS. 2013. Current state of the problem of water relations in plants under water deficit. *Russian Journal of Plant Physiology* **60**(2), 165–175.

LI GW, PENG YH, YU X, ZHANG MH, CAI WM, SUN WN, SU WA. 2008. Transport functions and expression analysis of vacuolar membrane aquaporins in response of various stresses in rice. *Journal of Plant Physiology* **165** (18) 1879-1888.

LIAN HL *et al.* 2004. The role of aquaporin RWC3 in drought avoidance in rice. *Plant Cell Physiology* **45**(4), 481-489.

LIU P, YIN L, WANG S, ZHANG M, DENG X, ZHANG S, TANAKA K. 2015. Enhanced root hydraulic conductance by aquaporin regulation accounts for silicon alleviated salt-induced osmotic stress in *Sorghum bicolor* L. *Environment and Experimental Botany* **111**, 42- 51.

LOU LP, YU ZW, WANG D, ZHANG YL, SHI Y. 2011. Effects of plant density and soil moisture on photosynthetic characteristics of flag leaf and accumulation and distribution of dry matter in wheat. *Acta Agronomica Sinica* **37**(6), 1049-1059.

LUDLOW MM, NG TT, FORD CW. 1980. Recovery after water stress of leaf gas exchange in *Panicum maximum* var. trichoglume. *Australian Journal of Plant Physiology* **7**, 299-313.

MANTOAN LPB, FERREIRA G, BOARO CSF. 2015. Chlorophyll *a* fluorescence in

- Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer plants subject to water stress and after rehydration. *Scientia Horticulturae* **184**, 23-30.
- MARTRE P, MORILLON R., BARRIEU F, NORTH GB, NOBEL PS, CHRISPEELS MJ. 2002. Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit. *Plant Physiology* **130**, 2101–2110.
- MAUREL C, VERDOUCQ L, LUU DT, SANTONI V. 2008. Plant Aquaporins: Membrane Channels with Multiple Integrated Functions. *Annual Review Plant Biology* **59**, 595–624.
- MAUREL C, REIZER J, SCHROEDER JI, CHRISPEELS MJ. 1993. The vacuolar membrane protein gamma-TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes. *The EMBO Journal* **12**(6), 2241-2247.
- MAXWELL K, JOHNSON GN. 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* **51**(345), 659 – 668.
- MINIUSSI M, DEL TERRA L, SAVI T, PALLAVICINI A, NARDINI A. 2015. Aquaporins in *Coffea arabica* L.: Identification, expression, and impacts on plant water relations and hydraulics. *Plant Physiology and Biochemistry* **95**, 92-102.
- OCHELTREE TW, NIPPERT JB, KIRKHAM MB, PRASAD PVV. 2014. Partitioning hydraulic resistance in *Sorghum bicolor* leaves reveals unique correlations with stomatal conductance during drought. *Functional of Plant Biology* **41**, 25-36.
- PEREZ-MARTIN A, MICHELAZZO C, TORRES-RUIZ JM, FLEXAS J, FERNÁNDES JE, SEBASTIANI L, DIAZ-ESPEJO A. 2014. Regulation of photosynthesis and stomatal and mesophyll conductance under water stress and recovery in olive trees: correlation of gene expression of carbonic anhydrase and aquaporins. *Journal of Experimental Botany* **65**(12), 3143-3156.
- POU A, MEDRANO H, FLEXAS J, TYERMAN SD. 2013. A putative role for TIP and PIP aquaporins in dynamics of leaf hydraulic and stomatal conductances in grapevines under water stress and re-watering. *Plant, Cell and Environment* **36**, 828-843.
- RAKIĆ T, GAJIĆ G, LAZAREVIĆ M, STEVANOVIĆ B. 2015. Effects of different light intensities, CO<sub>2</sub> concentrations, temperatures and drought stress on photosynthetic activity in two paleoendemic resurrection plant species *Ramonda serbica* and *R. nathalie*. *Environmental and Experimental Botany* **109**, 63-72.
- REDDY PS, RAO TSRB, SHARMA KK, VADEZ V. 2015. Genome-wide identification and characterization of the aquaporin gene family in *Sorghum bicolor* (L.). *Plant Gene* **1**, 18-28.
- RODRIGUES MI, BRAVO JP, SASSAKI FT, SEVERINO FE, MAIA IG. 2013. The tonoplast intrinsic protein (TIP) subfamily of *Eucalyptus grandis*: Characterization of

- EgTIP2, a root specific and osmotic stress-responsive gene. *Plant Science* **213**, 106-113.
- RODRÍGUEZ P, TORRECILLAS A, MORALES MA, ORTUNO MF, SÁNCHEZ-BLANCO MJ. 2005. Effects of NaCl salinity and water stress on growth and leaf water relations os *Asteriscus maritimus* plants. *Environmental and Experimental Botany* **53**, 113-123.
- SALEKDEH GH, SIOPONGCO J, WADE LJ, GHAREYAZIE B, BENNETT J. 2002. Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics* **2**, 1131- 1145.
- SANCHEZ AC, SUBUDHI PK, ROSENOW DT, NGUYEN HT. 2002. Mapping QTLs associated with drought resistance in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Plant Molecular Biology* **48**, 713-726.
- SANTOS CM, VERISSIMO V, WANDERLEY FILHO HCL, FERREIRA VM, CAVALCANTE PGS, ROLIM EV, ENDRES L. 2013. Seasonal variations of photosynthesis, gas exchange, quantum efficiency of photosystem II and biochemical responses of *Jatropha curcas* L. grown in semi-humid and semi-arid areas subject to water stress. *Industrial Crops and Products* **41**, 203– 213.
- SARDA X, TOUSCH D, FERRARE K, LEGRAND E, DUPUIS JM. et al. 1997. Two TIP-like genes encoding aquaporins are expressed in sunflower guard cells. *Plant Journal* **12**, 1103–1111.
- SAKAI A, LARCHER W. 1987. **Frost survival of plants. Responses and adaptation to freezing stress.** In: BILLINGS, W.D.; GOLLOY, F.; LARGE, D.L.; OLSEN, J.S.; RAMMENT H. Ecological Studies **62**. Springer, Berlin, Germany.
- SHAO HB, CHU LY, SHAO MA, ABDUL JALEEL C, HONG-MEI M. 2008. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *Comp. Rend. Biology* **331**, 433–441.
- SILVA MD, SILVA RLO, NETO JR CF, GUIMARÃES ACR VEIGA, DT, CHABREGAS SM, BURNQUIST WL, KAHL G, BENKO-ISEPPON AM, KIDO EA. 2013. Expression analysis of sugarcane aquaporin genes under water deficit. *Journal of Nucleic Acid* **2013**, 1- 14.
- SMART R.E, BINGHAM GE. 1974. Rapid estimates of relative water content. *Plant Physiology* **53**, 258-260.
- SOUZA RP, MACHADO EC, SILVA JAB, LAGÔA AMMA, SILVEIRA JAG. 2004. Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associate changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. *Environmental of Experimental Botany* **51**, 45–56.

- TERASHIMA I, ONO K. 2002. Effects of HgCl<sub>2</sub> on CO<sub>2</sub> dependence of leaf photosynthesis: Evidence indicating involvement of aquaporins in CO<sub>2</sub> diffusion across the plasma membrane. *Plant Cell Physiology* **43**, 70-78.
- THAMEUR A, LACHIHEB B, FERCHICHI A. 2012. Drought effect on growth, gas exchange and yield, in two strains of local barley Ardhaoui, under water deficit conditions in southern Tunisia. *Journal of Environmental Management* **13**, 495-500.
- TOURNAIRE-ROUX C, SUTKA M, JAVOT H, GOUT E, GERBEAU P, LUU DT, BLIGNY R, MAUREL C. 2003. Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature* **425**, 393-397.
- TSUDA M, TYREE MT. 2000. Plant hydraulic conductance measured by the high pressure flow meter in crop plants. *Journal of Experimental Botany* **51**, 823–828.
- TYERMAN SD, NIEMIETZ CM, BRAMLEY H. 2002. Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant, Cell & Environment* **25**, 173–194.
- UEHLEIN N, LOVISOLO C, SIEFRITZ F, KALDENHOFF K. 2003. The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO<sub>2</sub> pore with physiological functions. *Nature* **425**, 734-737.
- UEHLEIN N, OTTO B, HANSON DT, FISCHER M, MCDOWELL N, KALDENHOFF K. 2008. Function of *Nicotiana tabacum* aquaporins as chloroplast gas pores challenges the concept of membrane CO<sub>2</sub> permeability. *Plant Cell* **20**, 648–657.
- VANDELEUR RK, MAYO G, SHELDEN MC, GILLIHAM M, KAISER BN, TYERMAN SD. 2009. The role of plasma membrane intrinsic protein aquaporins in water transport through roots: diurnal and drought stress responses reveal different strategies between isohydric and anisohydric cultivars of grapevine. *Plant Physiology* **149**, 445-460.
- WANG W, VINOCUR B, ALTMAN A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* **218**, 1-14.
- ZARROUK O, GARCIA-TEJERO I, PINTO C, GENEBRA T, SABIR F, PRISTA C, DAVID TS, LOUREIRO-DIAS MC, CHAVES MM. 2015. Aquaporins isoforms in cv. Touriga Nacional grapevine under water stress and recovery – Regulation of expression in leaves and roots. *Agricultural Water Management* **164**, 167-175.
- ZELAZNY E, BORST JW, MUYLEAERT M, BATOKO H, HEMMINGA MA, CHAUMONT F. 2007. FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization. *PNAS* **104**(30), 12359-12364.