



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
- Ψ_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 CO₂
- E:** taxa de transpiração
- gs:** condutância estomática
- Ci:** concentração interna de CO₂
- 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)..... 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_s* e conseqüentemente *A_{Net}*, 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 CO₂ 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 CO₂ 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 Ψ_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 Ψ_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 CO₂, 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 (Φ 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 CO₂ 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 CO₂.

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 aclimação 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.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material biológico

Plantas jovens de *Sorghum bicolor* L. (Moench) (sorgo), do tipo sacarino, variedade BRS-511, foram utilizadas para o nosso estudo porque o sorgo é considerado uma espécie tolerante a períodos de estresse hídrico (Fracasso *et al.* 2016). Suas características diante da seca o tornam um dos alimentos mais importantes em regiões áridas e semiáridas do mundo (Sanchez *et al.* 2002), sendo foco de diversos estudos sobre tolerância a seca e produtividade (Fracasso *et al.* 2016). Além disso, a espécie tem genoma quase todo sequenciado por este ser relativamente pequeno e possuir elevada densidade genética (Sanchez *et al.* 2002), permitindo o uso de técnicas moleculares. E por isso, muitos programas de melhoramento genético vêm estudando sorgo para tentar elucidar os mecanismos envolvidos na melhora da produtividade agrícola diante das mudanças ambientais atuais (Fracasso *et al.* 2016).

2.2. Local do experimento

Casa de vegetação do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP - Campus de Botucatu/SP. A casa de vegetação possui sistema controlado com umidade relativa do ar de 50 - 70%, temperatura de 25 - 29°C e DFFF até $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

2.3. Determinação dos tratamentos

Após realizarmos estudo preliminar com *Sorghum bicolor*, determinamos as porcentagens de água em 45% e 30% para deficiência hídrica moderada (DHM) e severa (DHS), respectivamente. Não controlamos a porcentagem de água no solo das plantas em deficiência hídrica progressiva severa (DHSP) e atingiu valores menores que 30%.

2.4. Preparo do solo e condições de crescimento

Utilizamos o solo do tipo médio, caracterizado entre argiloso e arenoso. O solo foi devidamente preparado quanto à secagem, adubação e correção química do pH. Para sabermos o peso inicial de cada vaso antes de adicionarmos água, colocamos a mesma

quantidade de solo (10 Kg) em cada vaso, e pesamos cada vaso utilizado. Para obtermos o peso dos vasos em capacidade de campo, pesamos todos os vasos no dia seguinte da adição de água, logo pela manhã (Thameur *et al.* 2012). O solo em cada vaso foi mexido para evitar a compactação enquanto as sementes de sorgo se desenvolviam em placas de crescimento de isopor com substrato vegetal. Após 15 dias, as plantas jovens foram transplantadas para os vasos apresentando 2 a 3 folhas completamente expandidas.

2.5. *Delineamento experimental e coleta de dados*

Mantivemos todas as plantas em capacidade de campo até o início do experimento. No primeiro dia de experimento, 45 dias após a semeadura, as plantas apresentavam aproximadamente seis folhas completamente expandidas e $65,3 \text{ cm} \pm 1,9$ de altura e foram separadas por sorteio em quatro tratamentos: controle (C), que permaneceu em capacidade de campo por todo experimento; deficiência hídrica moderada (DHM), que teve o fornecimento de água interrompido inicialmente até atingir 45% de água no solo, a qual foi mantida até o final do estresse hídrico; deficiência hídrica severa (DHS), que teve o fornecimento de água interrompido inicialmente até atingir 30% de água no solo, a qual foi mantida até o final do estresse hídrico; e deficiência hídrica severa progressiva (DHSP), que teve seu fornecimento de água interrompido até o final do período de estresse hídrico. Controlamos a porcentagem de água no solo pela pesagem dos vasos, de acordo com Lou *et al.* (2011). E determinamos o final da deficiência hídrica (dia 20) quando as plantas em DHSP apresentaram sinais de murcha permanente, de acordo com as variáveis ecofisiológicas analisadas. Ao final da deficiência hídrica, reidratamos todas as plantas até capacidade de campo, mantendo-as assim até o final de experimento. Definimos o final do experimento pela total recuperação das plantas submetidas ao estresse (dia 32). Veja na figura 1 um esquema desse delineamento.

Durante o período de estresse hídrico, em cada tratamento, fizemos medições de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* duas vezes por semana, potencial da água (folha e solo) e conteúdo relativo de água das folhas uma vez por semana, e também coleta de folhas para análise genética no último dia de estresse hídrico. Após a reidratação, em cada tratamento, realizamos cinco dias de coletas: 24h, 48h, 72h, 144h e 288h. Em cada um desses dias analisamos trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, potencial da água (folha), conteúdo relativo de água, e coletamos folhas para análise genética. Para análise de crescimento, coletamos massa seca das plantas e medimos área foliar no último dia de estresse hídrico (dia 20) e no último dia de experimento (dia 32).

Para realizarmos tais coletas, utilizamos 140 vasos organizados aleatoriamente dentro da casa de vegetação para evitar diferenças dependentes da localização entre os

grupos. Foram 35 vasos para cada tratamento: 5 vasos para medições das trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* durante todo experimento e 30 vasos para as demais variáveis citadas acima, havendo amostras destrutivas em cada dia de coleta.

2.6. Variáveis ecofisiológicas analisadas

Relações hídricas: coletamos conteúdo relativo de água da folha (CRA) de cada amostra em forma de retângulo e pesamos imediatamente para obtenção do peso fresco (PF). Em seguida, colocamos as amostras em placas de Petri, com papel de filtro, imersas em água deionizada e acondicionadas por 24 horas a 5°C para reidratação de acordo com Elsheery e Cao (2008). Após esse período, pesamos as amostras obtendo o peso túrgido (PT) e em seguida levamos para estufa (temperatura \approx 60°C até peso constante), obtendo peso seco (PS). Utilizamos balança de precisão de 0,0001 g para determinação dos PF, PT e PS. Determinamos o CRA de acordo com Smart e Bingham (1974), utilizando-se a fórmula: $CRA (\%) = (PF-PS) / (PT-PS) \times 100$. Medimos o potencial da água foliar (Ψ_w da folha, MPa) através das folhas coletadas e posteriormente analisadas em Analisador de Potencial Água com Controlador de Temperatura, WP4-T. As análises aconteceram logo após a coleta do material biológico nos horários de pré-manhã (6 horas) e meio dia (12 horas). Com o mesmo equipamento, medimos o potencial da água do solo ao meio dia. Calculamos a condutividade hidráulica da planta (K_{planta}) de acordo com Tsuda e Tyree (2000), utilizando os valores de Ψ_w do solo, Ψ_w da folha e taxa de transpiração (E).

Trocas gasosas: realizamos as avaliações de trocas gasosas utilizando equipamento com sistema aberto de fotossíntese com analisador de CO₂ e vapor d'água por radiação infra- vermelha (Infra Red Gas Analyser – IRGA). Realizamos as medidas no período das 10:00 às 11:00 horas em dia ensolarado, selecionando uma planta de cada repetição (totalizando cinco repetições), nas quais escolhemos e padronizamos as 2^a ou 3^a folhas com limbo totalmente expandido. Medimos taxa de transpiração (E , mmol vapor d'água m⁻² s⁻¹), condutância estomática (g_s , mol m⁻² s⁻¹), taxa de assimilação de CO₂ (A_{Net} , μ mol m⁻² s⁻¹) e concentração interna de carbono (C_i , μ mol mol⁻¹) na intensidade de 1500 μ mol/m²s de densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF). Também calculamos a eficiência do uso da água (A/E , μ molCO₂ mmol⁻¹H₂O) e eficiência aparente de carboxilação (A/C_i , mol m⁻² s⁻¹).

Fluorescência da clorofila a: cobrimos as folhas com papel alumínio, sendo mantidas no escuro durante aproximadamente 30 minutos, antes de obtemos as variáveis da fluorescência da clorofila *a* com auxílio do fluorômetro PAM – Junior. Avaliamos os

parâmetros durante o período da manhã, entre 9 e 11 horas, sem precipitação. As variáveis fotoquímicas calculadas foram: a eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m), rendimento quântico efetivo do PSII ($\Phi_{PSII} = \Delta F/F_m'$), taxa de transporte de elétrons ($ETR = \Delta F/F_m' \times DFFF \times 0,5 \times 0,84$), dissipação fotoquímica [$qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')$] e a dissipação não-fotoquímica [$NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$] (Maxwell e Johnson 2000). Para a estimativa ETR, usamos 0,5 como a fração de energia de excitação distribuída entre os fotossistemas, e 0,84 como a fração de absorção de luz (Baker 2008).

Análise de crescimento: coletamos todas as folhas, fotossinteticamente ativas, das amostras para calcular a área foliar (AF – dm²) com o auxílio do Area Meter. Para obtermos a massa seca (MS - g) das amostras, coletamos todas as folhas, caule e raízes. Em seguida, levamos para estufa (temperatura $\approx 60^\circ\text{C}$) até peso constante. Utilizamos balança de precisão de 0,0001 g para determinação do peso seco total. Com os dados de AF e MS, calculamos área foliar específica (AFE = AF/ PS folha).

2.7. Análise da expressão gênica

Determinação das AQPs: selecionamos as AQPs presentes na folha, sendo elas PIP1;5 presente no mesofilo da folha, no sistema vascular foliar e células-guarda (Coupe *et al.* 2006); PIP2;2 identificada em células-guarda (Heinen *et al.* 2009); TIP1;1 estudada em resposta à seca e expressa em toda estrutura da folha (Alexandersson *et al.* 2005).

Isolamento e quantificação do RNA total: coletamos folhas em estágio de desenvolvimento semelhante aquelas utilizadas para determinar o CRA e gs nos dias descritos no item 2.6. Coletamos três amostras por tratamento, congelamos imediatamente em nitrogênio líquido e armazenamos em freezer a -80°C até a extração.

Realizamos o isolamento do RNA total com kit Spectrum Plant RNA (Sigma Aldrich), seguindo as recomendações do fabricante. Tratamos as amostras com On-Column DNase I Digestion Set, seguindo as recomendações do fabricante, para a remoção total do DNA genômico das amostras. Em seguida, quantificamos o RNA presente nas amostras com NanoDrop, e todas as amostras apresentaram no mínimo 40ng de RNA/mL, quantidade mínima necessária para a síntese de cDNA. Além disso, verificamos a integridade das amostras por eletroforese em gel de agarose 2% corado com Syber Green, em tampão de corrida, com tensão constante de 120V. Confirmamos a ausência do DNA genômico realizando PCR convencional, de acordo com o Kit Gotaq Colorless Master Mix, com os iniciadores específicos para gene endógeno RNA robossomal 18S.

Síntese de cDNA: utilizamos o RNA total, tratado com a enzima DNaseI, para a construção da primeira fita de cDNA. Para cada amostra, utilizamos 500ng de RNA e a

síntese do cDNA foi realizada com o kit RevertAid RT (Thermo Fisher). Adicionamos ao RNA 1µL de primer randômico. Incubamos as amostras a 65°C por 5 minutos. Em seguida, adicionamos 4µL de 5x *Reaction Buffer*, 1 µL de inibidor de RNase *Ribulock* (20u/ µL), 2 µL de 10mM dNTP Mix e 1 µL da enzima RevertAid RT (200u/ µL), exatamente nessa ordem. O

volume final da reação foi de 20µL. Incubamos as reações a 25°C por 5 min, em seguida a 42°C por 60 min e finalizamos aquecendo a 70°C por 5 min. Armazenamos as reações a -20°C.

RT-qPCR: primeiramente desenhamos os iniciadores específicos necessários (tabela 2) para as reações de amplificação. Desenhamos os iniciadores específicos baseados nas sequências de genes identificadas, levando em consideração características como T_m (temperatura de fusão), a formação de dímeros (*cross-dimers* e *self-dimers*) e a formação de estruturas secundárias (*hairpins*), analisando-os no software *PCR Primer Stats* (http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html).

Realizamos as reações de amplificação qPCR com volume final de 20µL. Utilizamos 2µL de cDNA puro, 0,6µL de cada iniciador (300nM) para os genes PIP2;2, TIP1;1; e o normalizador 18S, enquanto que para o gene PIP1;5 usamos 0,5µL de cada iniciador (250nM), 10µL GoTaq qPCR Master Mix (Promega) e completamos com água nuclease free ao volume final. A amplificação ocorreu em termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Programamos a amplificação com 95°C por 5min e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 min a 60°C. Todas as reações foram feitas em duplicatas técnicas e possuíam uma amostra controle contendo somente água nuclease free.

2.8. Análise de dados

Submetemos todos os resultados ecofisiológicos obtidos ao teste de normalidade. Em seguida, realizamos as comparações estatísticas pela análise de variância múltipla (ANOVA), complementado com teste de Tukey. Definimos a significância estatística em $P < 0,05$. Para os parâmetros da fluorescência da clorofila *a*, realizamos a estatística citada nos valores obtidos na máxima intensidade da curva de luz emitida pelo fluorômetro (1500 µmol/m²s). Mostramos a dependência da luz incidente de cada um desses parâmetros traçando os valores de cada parâmetro contra DFFF. Para ajustar a curva de ΦPSII e qP utilizamos a função de decaimento exponencial com dois parâmetros. Para ajustar a curva de crescimento de ETR e NPQ utilizamos o exponencial com tendência ao máximo.

Para a análise da expressão gênica, utilizamos o método da quantificação relativa, pois a transcrição do gene foi expressa em relação aos transcritos de outro gene denominado

gene normalizador, que possui expressão constante (igual a 1). Escolhemos o gene Ribossomal 18S como gene normalizador (Cook *et al.* 2010). Realizamos o cálculo da expressão relativa de acordo com Pfaffl e Hageleit (2001), em que a razão de expressão relativa dos genes alvo é calculada baseada na sua eficiência e na diferença de Ct (ΔCt - *threshold cycle*) entre tratamento e controle. A eficiência é calculada baseada no *slope* dado pela curva padrão de diluições de cada gene (10, 1, 0.1, 0.01 e 0.001 para os genes alvo e 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 e 0.00001 para o gene normalizador) na PCR tempo real. Utilizamos Relative Expression Software Tool (REST 2009 – Qiagen) para analisar diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre tratamento e controle.

3. RESULTADOS

3.1. Relações hídricas

O potencial da água do solo (Ψ_w solo) não diferiu entre DHM ($-0,00 \pm 0$ MPa) e controle ($-0,00 \pm 0$ MPa), porém diminuíram bruscamente no solo dos tratamentos DHS e DHSP na última semana do período que determinamos como deficiência hídrica, apresentando diferença dos demais tratamentos no dia 19 (Anexo 1). Esses tratamentos apresentaram valores de $-7,22 \pm 0,30$ e $-7,38 \pm 0,35$ MPa, respectivamente, indicando solo seco e com baixa disponibilidade de água para as plantas.

Acompanhando a queda do Ψ_w solo em DHS e DHSP, as plantas desses tratamentos apresentaram valores de Ψ_w foliar diminuídos durante a deficiência hídrica, sendo diferentes do controle e DHM (Figura 2). Tanto o Ψ_w foliar PD quanto Ψ_w foliar MD foram reduzidos em DHS e DHSP atingindo valores próximos a $-2,6$ MPa (Figura 2; Anexo 2). Ainda na figura 2, apresentamos a queda dos valores de CRA foliar das plantas de DHS e DHSP, atingindo no final da deficiência hídrica 59,8% e 54,5% no MD, respectivamente. Os valores de K_{planta} apresentaram o mesmo padrão de respostas. Os valores de K_{planta} diminuem nas plantas de DHS e DHSP, mas se mantêm elevados nas plantas de DHM (Figura 2). Esses resultados indicam estresse nas plantas de DHS e DHSP.

Após a reidratação, as variáveis Ψ_w da folha e CRA (Figura 2) recuperaram em 24 horas nos tratamentos que apresentaram queda dessas variáveis durante a seca. Porém, a recuperação da K_{planta} só ocorreu 144 horas após a reidratação (Figura 2).

3.2. Trocas gasosas

Assim como as variáveis de relações hídricas, as plantas em DHS e DHSP apresentaram redução da g_s e E (Figura 3) quando o solo desses tratamentos atingiu

aproximadamente 30% de água no solo (dia 17). Como resultado da diminuição da abertura estomática, houve aumento de C_i e redução nos valores da A_{Net} , A/E , e A/C_i (Figura 3), pois o início da alteração dessas variáveis ocorreu no mesmo dia em que as plantas apresentaram pela primeira vez a queda da g_s (dia 17). No final do período de seca, em relação ao controle, as plantas de DHS apresentaram aumento de 4 vezes da C_i e redução da A_{Net} , A/E e A/C_i em 99,5%, 85,6% e 99,8%, respectivamente, e as plantas de DHSP em 98,4%, 59,6 % e 99,7%, respectivamente, e apresentaram aumento de 3 vezes da C_i (Anexos 3 a 8). As plantas em DHM não diferiram do controle em nenhuma das variáveis citadas (g_s , A , E , C_i , A/C_i e A/E) durante todo o período de estresse hídrico (Figura 3).

Quanto à reidratação, como as plantas em DHM não apresentaram diferenças do controle durante todo experimento, descrevemos a seguir a recuperação somente das plantas em DHS e DHSP. Após 24 horas do fornecimento de água, as plantas em DHS e DHSP apresentaram recuperação de 20% da g_s , e conseqüentemente recuperação de E em 23,3% e 18,8%, respectivamente, e de A_{Net} em 24,3% e 19,1%, respectivamente (Figura 3; Anexos 3 a 5). Como consequência dessas pequenas recuperações, houve recuperação completa de C_i (Figura 3). Após 48 horas, com C_i completamente recuperada, g_s recuperada em 43,8% (DHS) e 28,6% (DHSP), A_{Net} recuperada em 45% (DHS) e 28,2% (DHSP) e E em 42,4% (DHS) e 24,7% (DHSP) houve recuperação completa da A/E (Figura 3). Após 72 horas, houve recuperação dos valores A/C_i , indicando que baixos valores de C_i e recuperação de aproximadamente 50% da A_{Net} são suficientes para total recuperação dessa variável. Somente após 144 horas da reidratação ocorreu a recuperação total da g_s , e conseqüentemente da A_{Net} e da E (Figura 3).

3.3. *Fluorescência da clorofila a*

As plantas em DHM apresentaram mantiveram seus valores de $\Phi PSII$ elevados, atingindo valores até maiores que o controle no dia 19 (Figura 4). As plantas em DHS e DHSP apresentaram redução dessa variável ao final da deficiência hídrica, e também nos valores de qP , ETR (Figura 4) e F_v/F_m (Figura 5). Os dados de NPQ nas plantas desses tratamentos se mantiveram em nível do controle (Figura 4).

Após a reidratação, em 48 horas, todos os parâmetros estavam recuperados completamente nas plantas em DHS e DHSP (Figura 4 e Figura 5).

3.4. *Análise da expressão gênica de aquaporinas*

Ao final de deficiência hídrica, podemos observar que as plantas em DHS e DHSP

apresentaram baixa expressão dos genes PIP1;5, PIP2;2 e TIP1;1 (Figura 6). As plantas em DHM não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao controle na expressão desses genes (Figura 6). Porém, devemos ressaltar que com valores de expressão de PIP1;5 e TIP1;1 próximos a 2, podemos inferir que biologicamente há aumento da expressão desses genes nas plantas em DHM ao final da deficiência hídrica (Figura 6). Esses resultados indicam que essas AQPs respondem diferentemente a intensidade do estresse ao qual a planta está submetida.

Após a reidratação, as plantas do DHM mantiveram aumento da expressão da TIP1;1 e a expressão das PIPs ainda permanece com valores elevados (Figura 6). Após 48 horas, ocorreu diminuição significativa da expressão de todos os genes, que recuperaram seus valores no dia seguinte (após 72 horas da reidratação) mantendo seus níveis de expressão assim até o final do experimento (Figura 6). As plantas em DHS mantiveram a baixa expressão de pelo menos uma das AQPs analisadas até 72 horas após a reidratação, ocorrendo recuperação após 144 horas da reidratação (Figura 6). E as plantas em DHSP apresentaram elevados valores de expressão de todos os genes após 24 horas da reidratação, sendo PIP1;5 e TIP1;1 super expressadas. Porém, após 48 horas os genes retornam a baixa expressão e assim permanecem até 72 horas após a reidratação. Ainda após 144 horas a TIP1;1 permanece com baixa expressão, apresentando recuperação somente no último dia de experimento (288 horas após a reidratação) (Figura 6). Nossos resultados indicam que as respostas dos três genes de AQPs ao longo do experimento são iguais nas plantas de um mesmo tratamento, ou seja, depende da condição de disponibilidade de água a qual as plantas foram submetidas durante o período de restrição hídrica.

4. DISCUSSÃO

Ao final da deficiência hídrica somente as plantas em DHS e DHSP apresentaram prejuízos no estado hídrico (baixos valores de Ψ_w da folha, CRA e K_{planta} – Figura 2) e na fotossíntese (baixos valores de A_{Net} – Figura 3). A redução fotossintética durante o estresse pode ocorrer devido limitações estomáticas e não estomáticas (Cornic 2000). As limitações não estomáticas são caracterizadas por prejuízos no metabolismo da fotossíntese, tanto na etapa fotoquímica quanto na etapa bioquímica (Flexas 2004). Nas plantas em DHS e DHSP, baixos valores de F_v/F_m (Figura 5), qP , ETR e $\Phi PSII$ (Figura 4) indicam supraexcitação do sistema fotoquímico (Souza *et al.* 2004), o que resulta em danos no aparato fotoquímico (Mantoan *et al.* 2015) e queda na eficiência operacional do PSII (Baker 2008). Fracasso *et al.* (2016) também encontraram prejuízos na etapa fotoquímica durante estresse hídrico em diferentes genótipos de sorgo. Isso nos permite concluir que prejuízos no metabolismo

fotoquímico contribuem juntamente com as limitações estomáticas (baixos valores de g_s – Figura 3) para a redução da fotossíntese em sorgo submetido ao estresse severo.

As AQPs analisadas podem ter contribuído para a limitação estomática da fotossíntese nessas plantas. A redução na expressão das PIP1;5, PIP2;2 e TIP1;1 em 64%, 59% e 85%, respectivamente em DHS, e em 86%, 83% e 99%, respectivamente, em DHSP (Figura 6) implica em redução drástica no movimento de água entre os tecidos foliares dessas plantas. Isso porque já foi demonstrada correlação positiva entre condutância hidráulica da folha e expressão de algumas AQPs, dentre elas a PIP2;2 (Miniussi *et al.* 2015), bem como sabemos da capacidade das AQPs em regular o transporte de água transmembrana quando o fluxo de água é crítico, como em situação de estresse hídrico (Hussain *et al.* 2011). De acordo com Hachez *et al.* (2008) essa diminuição da expressão durante estresse hídrico pode ocorrer para evitar a perda excessiva de água durante a desidratação. Assim, as reduções na expressão dessas AQPs em DHS e DHSP podem contribuir para menor movimento de água ao redor das células-guarda, o que resulta em menor abertura estomática (baixa g_s – Figura 3) e diminuição da perda de água (baixa E – Figura 3). Portanto, concluímos que para o sorgo submetido ao estresse severo a água é um fator limitante que modula a expressão de AQPs. E que 30% de água no solo reduz a expressão de AQPs significativamente em relação ao controle (Figura 6), o que contribui para as alterações fisiológicas ocorridas durante a seca.

Nas plantas em DHM, o aumento na expressão das AQPs no final da deficiência hídrica contribui para a melhora do movimento de água entre os tecidos foliares (Figura 2), o que permitiu a manutenção do estado hídrico (altos valores de Ψ_w da folha, CRA e K_{planta}), g_s e demais variáveis ecofisiológicas (Figuras 3, 4 e 5) quando comparado com controle. Isso é possível porque em plantas sob estresse moderado ocorre o crescimento das raízes e melhora da condutividade hidráulica resultando em aumento da capacidade do sistema radicular em prover água para a parte aérea (Kudoyarova *et al.* 2013). Assim, de acordo com os autores, há manutenção do conteúdo de água dos tecidos em nível ótimo, e conseqüentemente g_s permanece inalterada, mantendo as trocas gasosas e a fotossíntese em níveis normais. As AQPs analisadas nesse trabalho podem ter contribuído para o movimento de água na parte aérea, pois o aumento na expressão dessas AQPs pode estar relacionado com a condutância hidráulica foliar e redistribuição hidráulica na planta (Miniussi *et al.* 2015). Reforçamos Chaves *et al.* (2009) ao demonstrar que mesmo sob estresse moderado há rápida alteração nas expressões de genes envolvidos nas mudanças fisiológicas. Concluímos que com 45% de água no solo a modificação da expressão de AQPs nas plantas em DHM, mesmo sem diferença significativa em relação ao controle

(Figura 6), contribui para os valores de trocas gasosas e fotossíntese significativamente iguais ao controle (Figura 3).

Durante a recuperação após diferentes intensidades de deficiência hídrica observamos padrões nas respostas dos genes de AQPs. Esse padrão é dependente da intensidade do estresse hídrico e não da especificidade da AQP analisada (Figura 6). Sabe-se que as AQPs são importantes no processo de reidratação (Martre *et al.* 2002), pois a passagem da água é necessária entre membranas celulares para que o processo de recuperação da planta aconteça (Hachez *et al.* 2006). Assim, o padrão encontrado nas respostas de AQPs pode influenciar diferentemente nas respostas fisiológicas ocorridas durante a recuperação após diferentes intensidades de deficiência hídrica, principalmente nos ajustes relacionados à manutenção do estado hídrico vegetal.

Após 24 horas de reidratação, as plantas em DHM e DHS não apresentaram alteração nos níveis de expressão de PIP1;5, PIP2;2 e TIP1;1 (Figura 6). A água não sinaliza para a expressão desses genes em plantas cultivadas com controle da reposição de água no solo (Figura 6). Apesar das AQPs não exibirem expressão diferente do último dia de seca em 24 h de reidratação, DHM manteve o status hídrico igual ao tratamento controle e DHS apresentou recuperação de CRA e Ψ_w da folha (Figura 2). Galmés *et al.* (2007a) ressaltam que as diferenças encontradas nas expressões das diversas isoformas de AQPs permitem que as plantas respondam de maneira diferente às variações ambientais, sendo capazes de manter o estado hídrico básico. Zarrouk *et al.* (2015) também não encontraram alteração na expressão de TIP1;1 após a reidratação. Esses autores afirmam que nesse caso TIP1;1 pode estar envolvida com outras funções que não a função de recuperação do estado hídrico. Em adição, essas AQPs podem estar envolvidas no processo de outras recuperações fisiológicas (Alexandersson *et al.* 2005), como por exemplo manutenção de baixa abertura estomática em DHS (Figura 3).

Nas plantas em DHSP (sem reposição de água e atingindo valores menores que 30%), a reposição da água no solo sinaliza e promove super expressão de todos os genes analisados, alcançando valores até 3 vezes maior que o controle (Figura 6). Alexandersson *et al.* (2005) e Galmés *et al.* (2007b) também encontraram aumento da expressão dessas proteínas nas folhas de diferentes espécies durante a recuperação do estresse hídrico, ressaltando o papel dessas proteínas na recuperação. Kaldenhoff e Fischer (2006) elucidaram o papel das PIPs, sendo as PIP1 mais envolvidas com transporte de pequenos solutos e gases, incluindo CO₂, e as PIP2 parecem ser mais eficientes no transporte de água. Assim, a super expressão das PIP1;5 e PIP2;2 após 24 horas da reidratação contribui para recuperação hídrica efetiva (Figura 2), ao melhorar o movimento de água entre os tecidos,

bem como para a recuperação de C_i (Figura 3), ao diminuir a resistência de difusão do CO_2 no mesofilo foliar. Essa melhora na difusão do CO_2 pode aumentar a capacidade fotossintética, o que resulta em melhora na A/E (Hachez *et al.* 2006).

Em adição, destacamos a importância da melhora na etapa fotoquímica (recuperação de qP e $\Phi PSII$ – Anexo 8) para a recuperação de C_i e melhora de A/E até esse momento da reidratação. O funcionamento operacional eficiente do PSII (elevados valores de $\Phi PSII$) representa diminuição dos prejuízos metabólicos na etapa fotoquímica. Isso aumenta disponibilidade de energia química para a etapa bioquímica, resultando em melhora de A_{Net} (Rakić *et al.* 2015). Essa melhora na assimilação de carbono contribui para a queda de C_i (Rakić *et al.* 2015) e aumento de A/E .

Após 48 horas de reidratação, ocorre baixa expressão de todas AQPs nas plantas de todos os tratamentos (Figura 6). Nas plantas em DHM e DHSP, a redução pode ocorrer como consequência das elevadas expressões nos dias anteriores, caracterizando feedback negativo na regulação da expressão das AQPs analisadas. Nesse caso, os produtos da transcrição desses genes sinalizam para a modulação da transcrição. Em condições ambientais desfavoráveis, fatores de transcrição podem regular a transcrição dessas AQPs, modulando as ligações nos sítios promotores e reguladores desses genes (Wang *et al.* 2003). Rodrigues *et al.* (2013) ao estudarem AQPs também encontraram redução na expressão gênica após uma super expressão. Porém, isso não explica a manutenção da baixa expressão nas plantas em DHS onde não observamos modificações significativas na expressão de AQPs (Figura 6). A manutenção da baixa expressão das AQPs em DHS, inclusive nas próximas horas de reidratação, pode ocorrer devido à lenta recuperação dessas proteínas já relatada em algumas isoformas durante a reidratação em uva (Pou *et al.* 2013).

Do ponto de vista fisiológico, a baixa expressão das PIP1;5, PIP2;2 e TIP1;1 pode contribuir para a diminuição do movimento de água entre os tecidos e manutenção do turgor das células (Alexandersson *et al.* 2005). Tal resposta ao nível molecular implica na manutenção de água nos tecidos foliares para que ocorram importantes ajustes fisiológicos da reidratação, tais como manutenção do estado hídrico (Figura 2) e recuperação completa de A/E (Figura 3) e da etapa fotoquímica (Tabela 4). Podemos inferir o papel das AQPs nessas recuperações, pois devido à localização dessas proteínas na membrana plasmática e no tonoplasto, elas participam de processos fisiológicos tanto a nível tecidual como celular (Hachez *et al.* 2006). Destacamos a baixa expressão de todas as AQPs ocorrendo simultaneamente com a recuperação efetiva de ETR, o que nos permite hipotetizar que PIP1;5, PIP2;2 e TIP1;1 contribuam para essa recuperação. A diminuição do movimento de água pode ter contribuído para aumento da hidratação celular inclusive no sistema de

membranas cloroplastidiais. Isso permite a disponibilidade de moléculas de água para hidrólise, e transporte de elétrons, o que pode ter contribuído para recuperação total de ETR, resultando no funcionamento operacional eficiente do PSII (aumento de Φ PSII) (Rakić et al., 2015).

Além disso, a baixa expressão das AQPs pode estar envolvida com a manutenção de baixos valores de g_s (Figura 3). Diversos autores afirmam a relação dessas proteínas com a condutância hidráulica foliar (Cochard *et al.* 2007; Kaldenhoff *et al.* 2008) e a relação da K_{planta} com g_s também tem sido reportada, inclusive em sorgo (Choudhary e Sinclair 2014; Liu et al. 2015). Perez-Martin *et al.* (2014) destacam relação mais direta entre AQPs e g_s devido à localização dessas proteínas nas células ao redor da cavidade estomática e nas células-guarda. Logo, a diminuição do movimento de água (baixos valores de K_{planta}) implica na diminuição do movimento de água entre as células guarda e adjacentes, bem como diminuição da entrada de água no vacúolo das células guarda. Em adição, ressaltamos que TIP1;1 é altamente seletiva à água (Maurel *et al.* 1993) e tem importante papel nas funções do vacúolo devido sua localização no tonoplasto (Li *et al.* 2008). Logo, a baixa expressão dessa AQP contribui para a baixa turgescência dos vacúolos, que associada às baixas expressões de PIP1;5 e PIP2;2 podem limitar a abertura estomática (baixa g_s - Figura 3).

Os valores de g_s em níveis menores que o controle contribui para baixos valores de A_{Net} e E , porém auxilia na manutenção da água na planta, e permite recuperação de A/E (Figura 2). Assim, demonstramos que o sorgo, mesmo com a presença de água no solo e nos tecidos, mantém a baixa regulação da condutância estomática, impondo limitação significativa na fotossíntese, mas resultando em aumento da A/E , como demonstrado em outras espécies por Gallé *et al.* (2007) e Galmés *et al.* (2007b). Porém, destacamos a importância da baixa expressão das AQPs nesses ajustes fisiológicos.

Setenta e duas horas após a reidratação, o retorno da expressão das AQPs em nível do controle parece depender do tipo de experiência de estresse pelo qual a planta foi submetida (Figura 6). Em DHSP, todas as AQPs ainda apresentam expressão menor que o controle, sendo menos responsiva quando comparado aos demais tratamentos (Figura 6). Essa pequena expressão das PIP1;5, PIP2;2 e TIP1;1 de forma similar às 48 horas de reidratação pode indicar que nas plantas em DHSP ainda é necessário manutenção do turgor das células para que haja manutenção de todas as variáveis que retornaram em nível do controle até o presente momento.

Nas 72 horas após a reidratação também observamos recuperação de A/C_i nas plantas em DHS e DHSP (Figura 3), ou seja, não ocorreu prontamente após chegada de

água no sistema. De acordo com Ennahli e Earl (2005), quando isso acontece podemos afirmar que houve danos no aparato fotossintético em nível do cloroplasto, que provavelmente contribuíram para a limitação fotossintética ocorrida até esse momento da reidratação. Portanto, a recuperação bioquímica só ocorre após o reparo do aparato fotossintético, representado pela recuperação efetiva da etapa fotoquímica (Mantoan *et al.* 2015) 48 horas após a reidratação (Figura 3). Isso nos permite hipotetizar que o processo de recuperação bioquímica depende de determinada sequência de eventos de recuperação fisiológica.

A recuperação completa das plantas em DHS e DHSP ocorreu somente 144 horas após a reidratação. Nesse momento, a retomada da expressão de todas as AQPs, com exceção da TIP1;1 no DHSP, é concomitante com a recuperação dos valores de g_s , A_{Net} , E , e K_{planta} . Para Choudhary e Sinclair (2014) a lenta recuperação da condutividade hidráulica está relacionada com a limitação de alguns mecanismos, sendo alguns deles justamente a baixa g_s e E limitada devido a alto déficit de pressão de vapor. Recentes estudos (Ferrio *et al.* 2012; Flexas *et al.* 2012) sugerem que a água e a difusão de CO_2 competem pelos mesmos caminhos no mesofilo foliar. Assim, qualquer queda na condutividade hidráulica foliar provavelmente resulta não somente em queda na g_s , mas também na queda da condutância do mesofilo ao CO_2 , ambos reduzindo a fotossíntese. Os resultados encontrados por nós e Pou *et al.* (2013) reforçam que K_{planta} , g_s e A_{Net} estão intimamente relacionados, pois a recuperação dessas variáveis ocorreu lentamente e concomitantemente. Ainda, Cochard *et al.* (2007) ressaltam a importância das AQPs na regulação das mudanças ocorridas na condutividade hidráulica foliar e g_s . A relação dessas proteínas com o movimento estomático vem sendo demonstrada devido a localização de algumas isoformas, incluindo a PIP2;2, nas células-guarda (Heinen *et al.* 2009) e a elucidação da correlação positiva de outra isoforma, também da subfamília PIP2, com g_s (Perez-Martin *et al.* 2014). Assim, concluímos que PIP1;5, PIP2;2 e TIP1;1 podem estar envolvidas na manutenção de baixos valores de K_{planta} , g_s e conseqüentemente E e A_{Net} até que a recuperação ocorra (144 horas após a reidratação – Figura 3).

Nas plantas em DHSP, a baixa regulação da TIP1;1 pode contribuir para a lenta recuperação de g_s , pois o movimento estomático é resultado do fluxo de água no vacúolo. E o tonoplasto tem envolvimento na regulação do fluxo de água das células vegetais submetidas ao estresse (Kaldenhoff e Fischer 2006). Porém, a baixa regulação da TIP1;1 continua mesmo com g_s já recuperada (144 horas após a reidratação – Figura 6 e Figura 3). Sabendo que existem interações proteínas – proteínas entre diferentes membros de PIPs e TIPs capazes de influenciar em suas atividades (Li *et al.* 2008; Zelazny *et al.* 2007),

afirmamos que a TIP1;1 provavelmente é uma das AQPs envolvidas no controle estomático do sorgo submetido a DHSP, auxiliando demais PIPs e TIPs.

O padrão de expressão ao longo do processo de reidratação permite postular que as AQPs contribuem para a sequência de mecanismos de recuperação necessários para a retomada da etapa fotoquímica e trocas gasosas em nível do controle. As recuperações fisiológicas em associação com as AQPs estudadas podem contribuir para a recuperação do crescimento das plantas em DHS e DHSP. Nessas plantas, os valores de AF e AFE recuperados em nível do controle no final da reidratação (Tabela 3) representam o crescimento e indicam retorno da expansão foliar (Rodríguez *et al.* 2005) e da capacidade fotossintética (Habermann *et al.* 2011), respectivamente. Podemos inferir o papel das AQPs no crescimento foliar, pois o movimento de água é necessário para que ele ocorra (Kaldenhoff 2008) e estudos com mutantes super expressando AQPs apresentam aumento no crescimento (Aharon *et al.* 2003; Kelly *et al.* 2014). No entanto, doze dias de reidratação e a recuperação fisiológica não são suficientes para recuperar o acúmulo de biomassa vegetal (baixos valores de MST – Figura 7). Isso indica que há lenta recuperação da conversão eficiente de carbono fotossintetizado em matéria seca (Alvarez *et al.* 2015). Este fato vem sendo demonstrado há anos (Ludlow *et al.* 1980; Salekdeh *et al.* 2002), o que ressalta os prejuízos causados pela seca na produtividade vegetal e a importância de se estudar os mecanismos envolvidos no processo de recuperação.

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 CO₂. *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 CO₂: 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 CO₂ 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, CO₂ 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 HgCl₂ on CO₂ dependence of leaf photosynthesis: Evidence indicating involvement of aquaporins in CO₂ 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 CO₂ 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 CO₂ 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.

7. FIGURAS E TABELAS

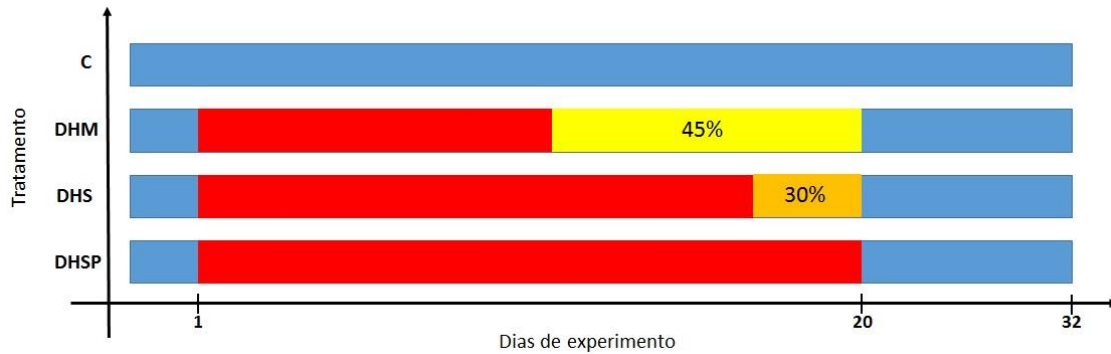


Figura 1: Delineamento experimental realizado em plantas de *Sorghum bicolor* submetidas a diferentes intensidades de deficiência hídrica e subsequente reidratação. C representa o tratamento controle. DHM representa deficiência hídrica moderada. DHS representa deficiência hídrica severa. DHSP representa deficiência hídrica severa e progressiva. A cor azul representa solo em capacidade de campo. A cor vermelha representa interrupção do fornecimento de água (sem controle da porcentagem de água no vaso). A cor amarela representa controle da porcentagem de água no solo em 45% nas plantas de DHM. A cor laranja representa controle da porcentagem de água no solo em 30% nas plantas de DHS. O experimento teve início no dia 1, a reidratação ocorreu no dia 20 e o último dia de experimento no dia 32.

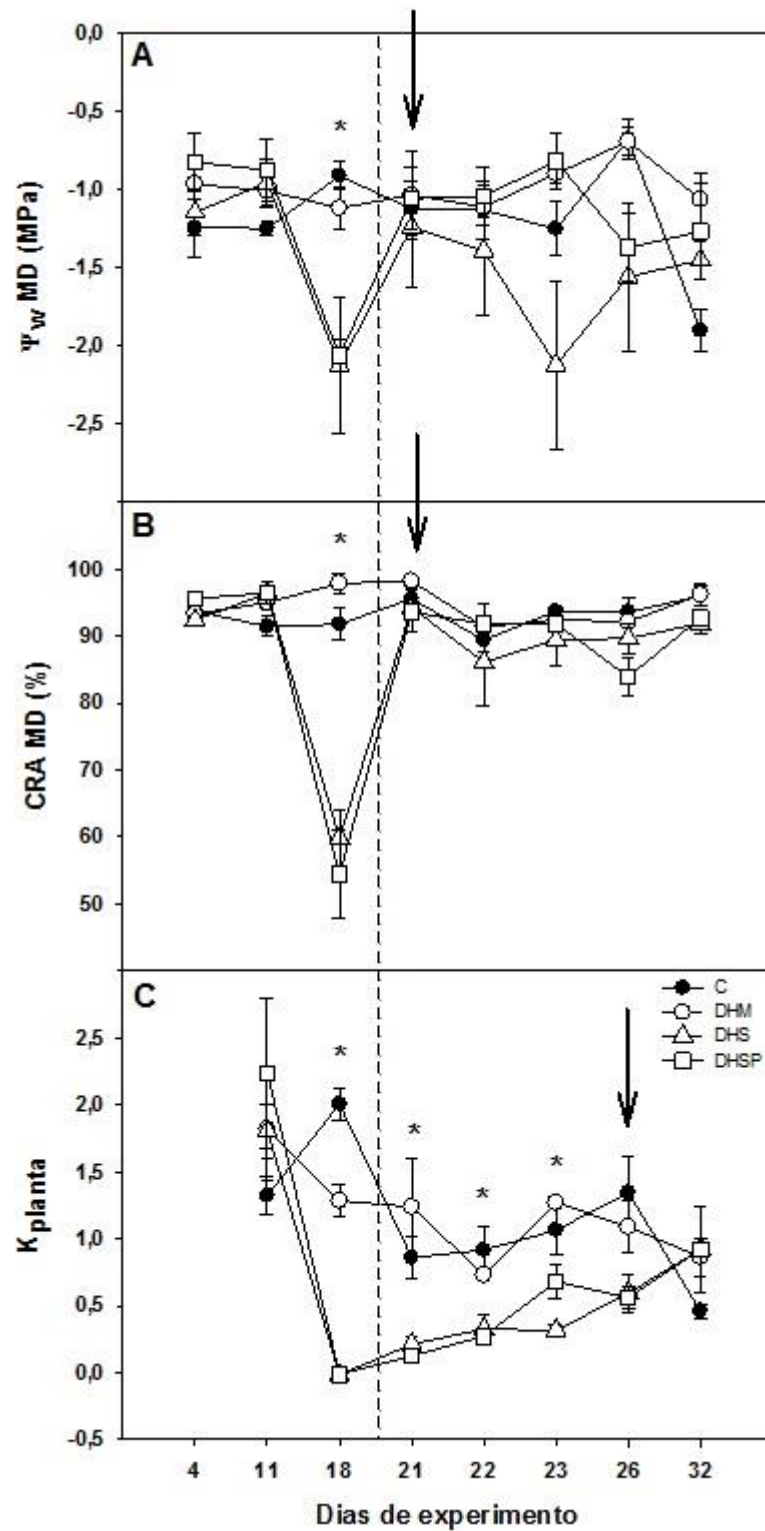


Figura 2: Relações hídricas de *Sorghum bicolor* submetido aos tratamentos controle (C), deficiência hídrica moderada (DHM), deficiência hídrica severa (DHS) e deficiência hídrica severa progressiva (DHSP) ao longo do experimento. **A)** Potencial da água da folha no período meio-dia (Ψ_w MD). **B)** Conteúdo relativo de água das folhas no período meio-dia (CRA MD). **C)** Condutividade hidráulica da planta (K_{planta}). A linha tracejada representa o momento da reidratação no dia 20. As setas indicam o momento da recuperação de cada variável em nível do controle. * representa diferenças estatísticas, entre os tratamentos, por análise de Tukey ($p < 0,05$).

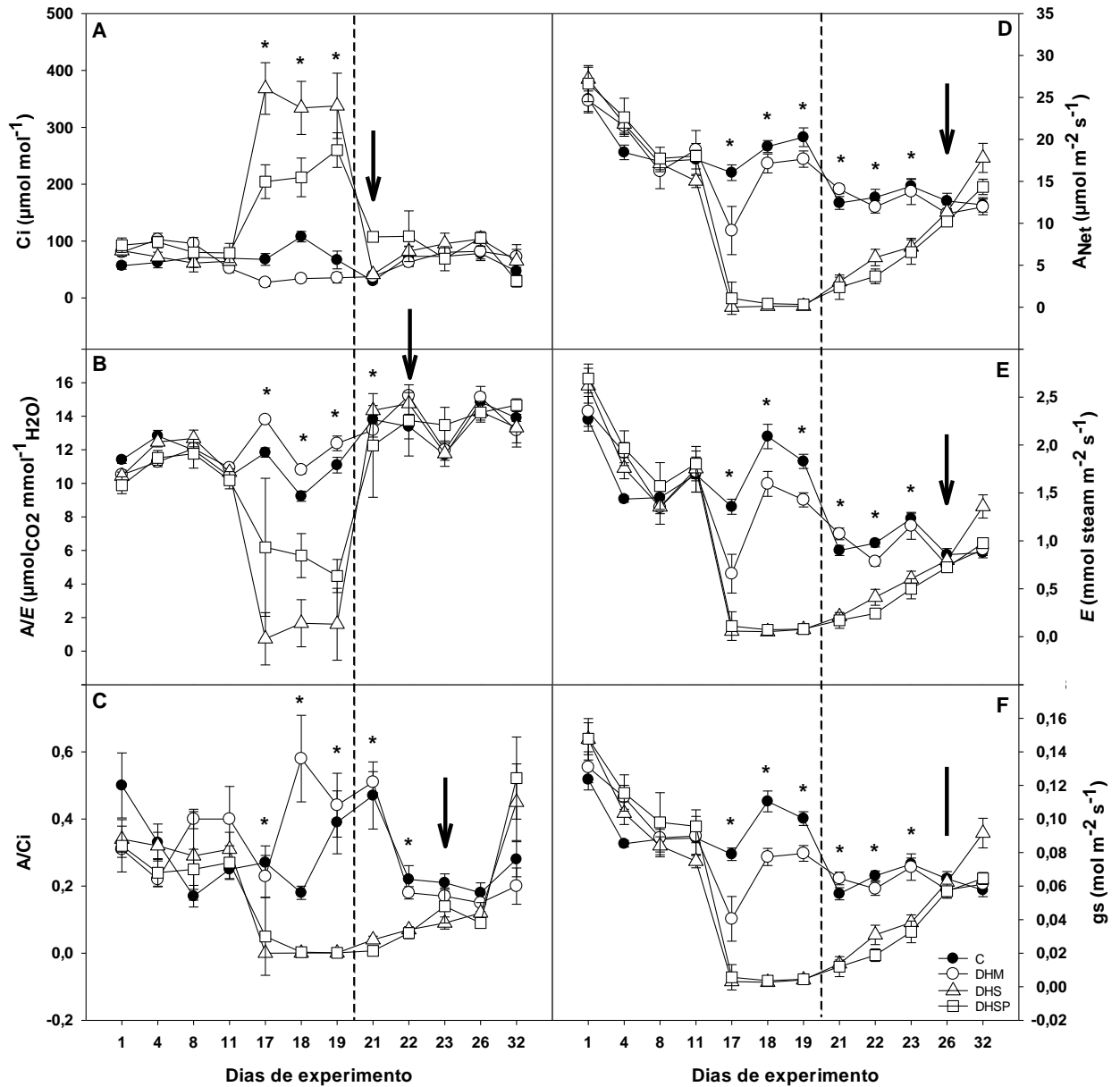


Figura 3: Trocas gasosas de *Sorghum bicolor* submetido aos tratamentos controle (C), deficiência hídrica moderada (DHM), deficiência hídrica severa (DHS) e deficiência hídrica severa progressiva (DHSP) ao longo do experimento. **A)** Concentração interna de carbono (C_i). **B)** Eficiência do uso da água (A/E). **C)** Eficiência aparente de carboxilação (A/C_i). **D)** Assimilação de CO_2 (A). **E)** Taxa de transpiração (E). **F)** Condutância estomática (g_s). A linha tracejada representa o momento da reidratação no dia 20. As setas indicam o momento da recuperação de cada variável em nível do controle. * representa diferenças estatísticas, entre os tratamentos, por análise de Tukey ($p < 0,05$).

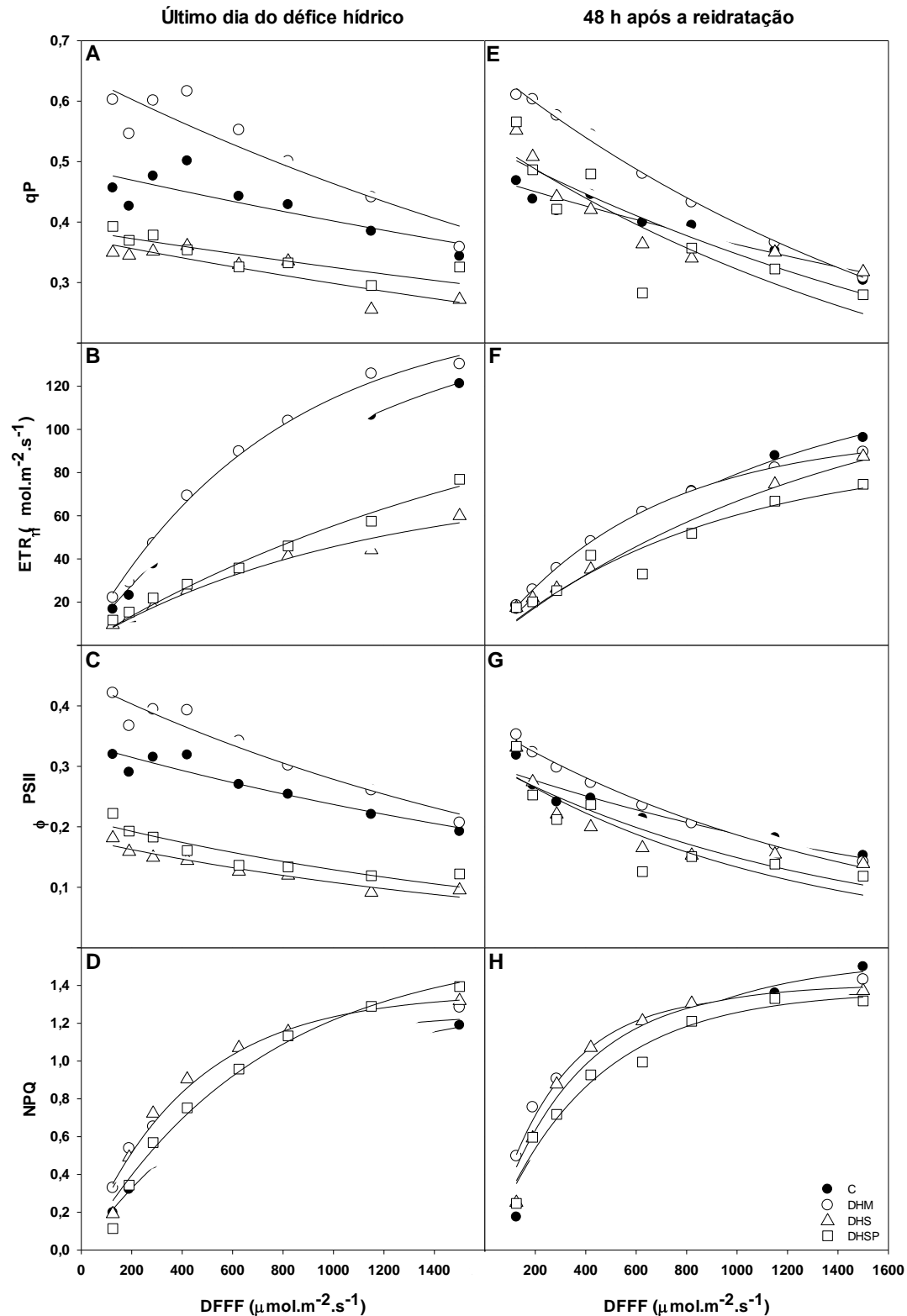


Figura 4: Curvas de luz dos parâmetros da fluorescência da clorofila *a* em *Sorghum bicolor* no final da deficiência hídrica (dia 19) (A-D) e quando houve a recuperação desses parâmetros após a reidratação (após 48 horas da reidratação) (E-H). A e E) Dissipação fotoquímica (qP). B e F) Taxa de transporte de elétrons (ETR). C e G) Rendimento quântico efetivo do PSII (Φ PSII). D e H) Dissipação não-fotoquímica (NPQ). C: controle. DHM: deficiência hídrica moderada. DHS: deficiência hídrica severa. DHSP: deficiência hídrica severa progressiva. Somente nos gráficos de A, B e C apresentam diferenças estatísticas, entre os tratamentos, por análise de Tukey ($p < 0,05$).

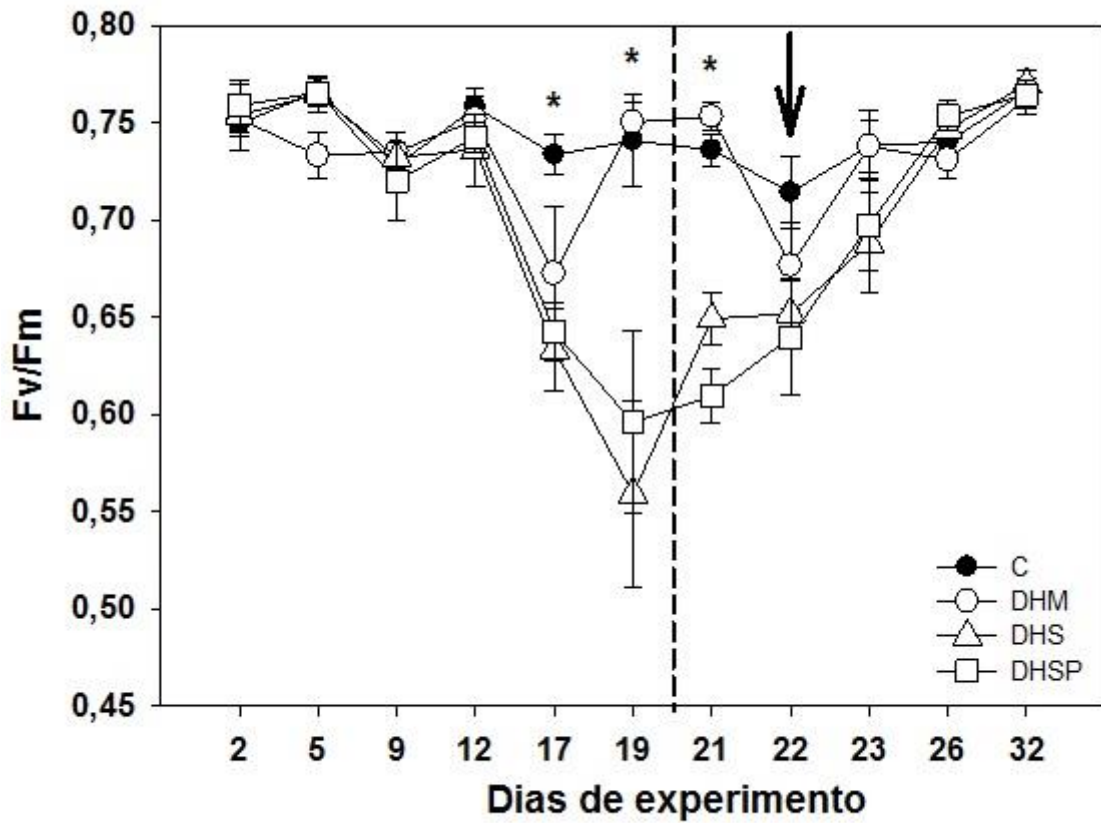


Figura 5: Eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m) de *Sorghum bicolor* submetido aos tratamentos controle (C), deficiência hídrica moderada (DHM), deficiência hídrica severa (DHS) e deficiência hídrica severa progressiva (DHSP) ao longo do experimento. A linha tracejada representa o momento da reidratação no dia 20. A seta indica o momento da recuperação da variável. * representa diferenças estatísticas, entre os tratamentos, por análise de Tukey ($p < 0,05$).

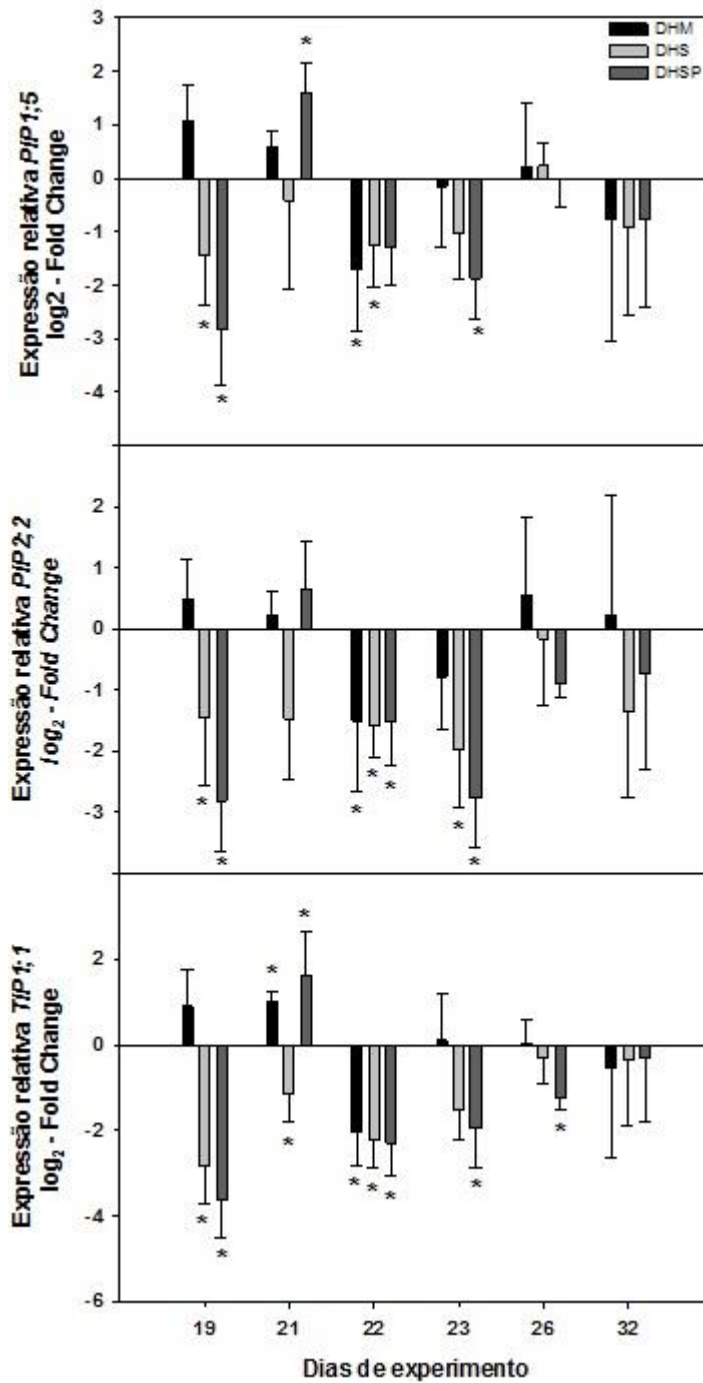


Figura 6: Expressão relativa dos genes de aquaporinas nas folhas de *Sorghum bicolor* submetido aos tratamentos deficiência hídrica moderada (DHM), deficiência hídrica severa (DHS) e deficiência hídrica severa progressiva (DHSP) ao longo do experimento. **A)**PIP1;5 **B)**PIP2;2 **C)** TIP1;1. A reidratação ocorreu no dia 20. * representa diferença estatística entre as expressões do tratamento e do controle do dia. A expressão do tratamento controle é constante e igual a zero. Valores positivos indicam aumento da expressão e negativos indicam baixa expressão.

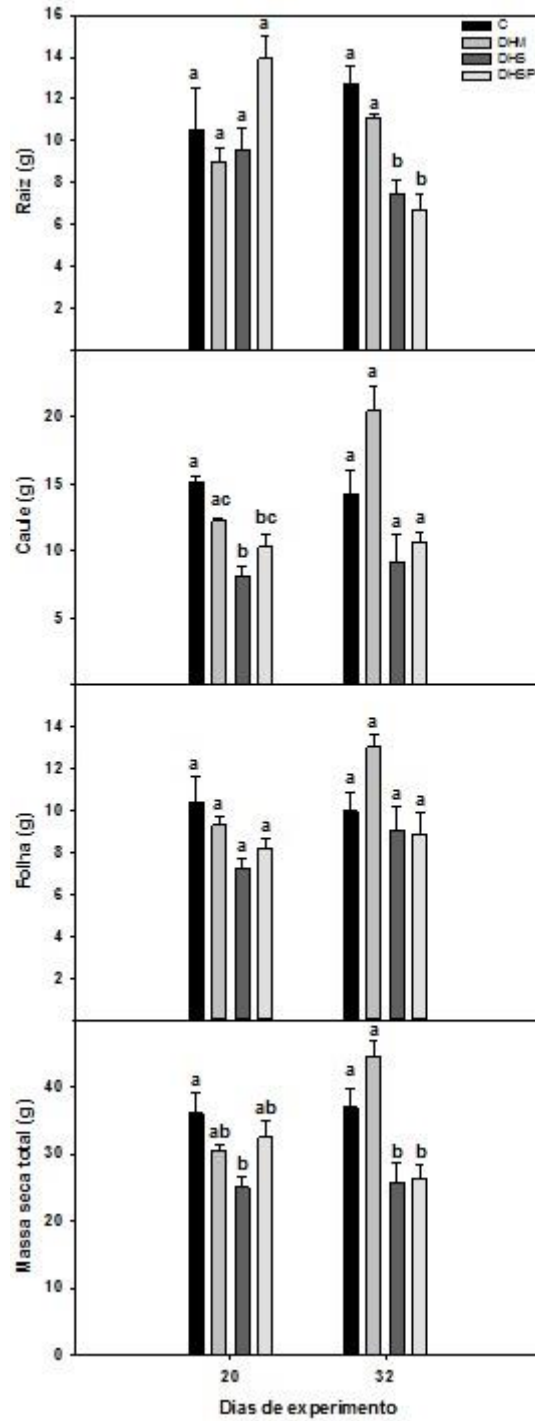


Figura 7: Massa seca de *Sorghum bicolor* submetido aos tratamentos controle (C), deficiência hídrica moderada (DHM), deficiência hídrica severa (DHS) e deficiência hídrica severa progressiva (DHSP) no último dia de deficiência hídrica (dia 20) e no último dia de reidratação (dia 32). **A)** Massa seca das raízes. **B)** Massa seca do caule. **C)** Massa seca das folhas. **D)** Massa seca total. Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os tratamentos por análise de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 1: Iniciadores específicos das AQPs selecionadas analisados pelo (http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html).

Primer	Sequence	Tm (°C)	Dimer	GC (%)
PIP1;5 FW	5'- GGGGACGACAAGGACTACAA-3'	63.9	No	55
PIP1;5 RV	5'- ATGACGGTGAGGATGGTGAT-3'	64.3	No	50
PIP2;2 FW	5'- CTTCCAGAGCGCCTACTACG-3'	63.9	No	60
PIP2;2 RV	5'- TGTAGACGAGCACGAAGGTG-3'	64.1	No	55
TIP1;1 FW	5'- CTGGGAGTGGGGATACCAGT-3'	65.1	No	60
TIP1;1 RV	5'- GTGGGTTTGGGAGATGAAGA-3'	63.9	No	50

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).

Variável	Tratamento	Dias de experimento	
		20	32
AF (dm ²)	Controle	2250 ± 208 ^a	1712 ± 147 ^a
	DHM	1769 ± 89 ^a	1754 ± 67 ^a
	DHS	606 ± 196 ^b	1043 ± 101 ^a
	DHSP	609 ± 32 ^b	1056 ± 237 ^a
AFE (cm ² /g)	Controle	217 ± 7 ^a	172 ± 4 ^a
	DHM	190 ± 10 ^a	134 ± 2 ^a
	DHS	81 ± 21 ^b	116 ± 6 ^a
	DHSP	74 ± 3 ^b	115 ± 14 ^a

Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os tratamentos por teste de Tukey (p<0,05).

ANEXOS
ANEXO 1

Tabela: Conteúdo relativo de água (CRA) e potencial da água das folhas (Ψ_w) no período de pré-manhã (PD) de *Sorghum bicolor* submetido aos tratamentos controle, deficiência hídrica moderada (DHM), deficiência hídrica severa (DHS) e deficiência hídrica severa progressiva (DHSP) ao longo do experimento.

Variável	Período	Tratamento	Dias de experimento						
			11	18	21*	22*	23*	26*	32*
CRA (%)	PD	Controle	96,86 ± 1,41 ^a	93,50 ± 2,25 ^a	87,36 ± 0,23 ^a	95,88 ± 1,31 ^a	92,84 ± 0,29 ^a	89,80 ± 0,94 ^a	96,50 ± 1,40 ^a
		DHM	98,43 ± 0,68 ^a	92,98 ± 3,35 ^a	93,49 ± 0,49 ^a	91,62 ± 0,05 ^a	95,52 ± 0,43 ^a	91,59 ± 1,21 ^a	95,66 ± 0,77 ^a
		DHS	98,49 ± 1,12 ^a	62,99 ± 4,18 ^b	91,26 ± 1,70 ^a	90,51 ± 3,41 ^a	94,59 ± 0,94 ^a	90,86 ± 1,15 ^a	97,05 ± 1,38 ^a
		DHSP	97,48 ± 1,50 ^a	64,45 ± 3,96 ^b	88,50 ± 3,50 ^a	93,35 ± 1,94 ^a	93,86 ± 1,02 ^a	88,91 ± 0,99 ^a	93,76 ± 1,78 ^a
Ψ_w (Mpa)	PD	Controle	-0,69 ± 0,05 ^a	-0,99 ± 0,08 ^a	-1,22 ± 0,30 ^a	-1,23 ± 0,28 ^a	-0,82 ± 0,11 ^a	-1,05 ± 0,19 ^a	-1,25 ± 0,01 ^a
		DHM	-0,79 ± 0,13 ^a	-1,23 ± 0,09 ^a	-0,88 ± 0,12 ^a	-1,23 ± 0,20 ^a	-1,00 ± 0,05 ^a	-0,71 ± 0,11 ^a	-0,92 ± 0,10 ^a
		DHS	-0,57 ± 0,03 ^a	-2,06 ± 0,24 ^b	-1,37 ± 0,09 ^a	-1,01 ± 0,25 ^a	-1,09 ± 0,14 ^a	-0,77 ± 0,08 ^a	-0,98 ± 0,05 ^a
		DHSP	-0,72 ± 0,32 ^a	-2,13 ± 0,16 ^b	-1,69 ± 0,41 ^a	-1,28 ± 0,12 ^a	-0,66 ± 0,10 ^a	-0,9 ± 0,06 ^a	-0,96 ± 0,15 ^a

Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os tratamentos por teste de Tukey ($p < 0,05$). *indicam os dias de coleta após a reidratação.

ANEXO 2

Tabela: Condutância estomática (gs) ($\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) de *Sorghum bicolor* submetido aos tratamentos controle, deficiência hídrica moderada (DHM), deficiência hídrica severa (DHS) e deficiência hídrica severa progressiva (DHSP) ao longo do experimento.

GS	1	4	8	11	17	18	19	21*	22*	23*	26*	32*
Controle	0,13 ± 0,006 ^a	0,08 ± 0,002 ^a	0,09 ± 0,006 ^a	0,09 ± 0,01 ^a	0,08 ± 0,004 ^a	0,11 ± 0,006 ^a	0,10 ± 0,004 ^a	0,05 ± 0,004 ^a	0,07 ± 0,003 ^a	0,07 ± 0,004 ^a	0,06 ± 0,004 ^a	0,06 ± 0,004 ^a
DHM	0,13 ± 0,009 ^a	0,11 ± 0,007 ^{ab}	0,09 ± 0,01 ^a	0,09 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,01 ^{ab}	0,08 ± 0,005 ^{ab}	0,08 ± 0,005 ^{ab}	0,06 ± 0,004 ^a	0,06 ± 0,004 ^a	0,07 ± 0,008 ^a	0,06 ± 0,005 ^a	0,06 ± 0,004 ^a
DHS	0,15 ± 0,001 ^a	0,10 ± 0,007 ^{ab}	0,09 ± 0,005 ^a	0,09 ± 0,004 ^a	0,003 ± 0,0004 ^b	0,002 ± 0,0007 ^b	0,004 ± 0,0003 ^b	0,01 ± 0,002 ^b	0,03 ± 0,006 ^b	0,04 ± 0,004 ^b	0,06 ± 0,004 ^a	0,09 ± 0,009 ^a
DHSP	0,15 ± 0,009 ^a	0,11 ± 0,01 ^b	0,10 ± 0,02 ^a	0,09 ± 0,01 ^a	0,005 ± 0,007 ^b	0,003 ± 0,0004 ^b	0,004 ± 0,001 ^b	0,01 ± 0,006 ^b	0,02 ± 0,004 ^b	0,03 ± 0,006 ^b	0,06 ± 0,004 ^a	0,06 ± 0,003 ^a

Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, entre os tratamentos, por análise de Tukey ($p < 0.05$). A reidratação ocorreu no 20º dia de experimento.

* indica coleta realizada após a reidratação.

ANEXO 3

Tabela: Taxa de transpiração (E , mmol vapor d'água $m^{-2} s^{-1}$) de *Sorghum bicolor* submetido aos tratamentos controle, deficiência hídrica moderada (DHM), deficiência hídrica severa (DHS) e deficiência hídrica severa progressiva (DHSP) ao longo do experimento.

E	1	4	8	11	17	18	19	21*	22*	23*	26*	32*
Controle	2,26±0,1 ^a	1,43±0,03 ^a	1,45±0,09 ^a	1,69±0,2 ^a	1,35±0,08 ^a	2,09±0,1 ^a	1,83±0,07 ^a	0,90±0,05 ^a	0,97±0,04 ^a	1,23±0,06 ^a	0,86±0,06 ^a	0,88±0,05 ^a
DHM	2,35±0,1 ^a	1,92±0,1 ^b	1,35±0,2 ^a	1,72±0,2 ^a	0,66±0,2 ^b	1,59±0,1 ^{ab}	1,43±0,07 ^{ab}	1,07±0,06 ^a	0,78±0,05 ^a	1,16±0,1 ^a	0,74±0,06 ^a	0,91±0,06 ^a
DHS	2,62±0,2 ^a	1,76±0,1 ^{ab}	1,35±0,07 ^a	1,75±0,1 ^a	0,06±0,01 ^c	0,05±0,01 ^b	0,07±0,007 ^b	0,21±0,03 ^b	0,41±0,08 ^b	0,60±0,08 ^b	0,80±0,07 ^a	1,35±0,1 ^b
DHSP	2,69±0,1 ^a	1,96±0,2 ^b	1,57±0,2 ^a	1,80±0,2 ^a	0,11±0,1 ^c	0,07±0,008 ^b	0,08±0,02 ^b	0,17±0,08 ^b	0,24±0,05 ^b	0,50±0,1 ^b	0,72±0,05 ^a	0,97±0,05 ^a

Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, entre os tratamentos, por análise de Tukey ($p < 0.05$). A reidratação ocorreu no 20° dia de experimento.

* indica coleta realizada após a reidratação.

ANEXO 4

Tabela: Taxa de assimilação de CO₂ (ANet, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de *Sorghum bicolor* submetido aos tratamentos controle, deficiência hídrica moderada (DHM), deficiência hídrica severa (DHS) e deficiência hídrica severa progressiva (DHSP) ao longo do experimento.

A	1	4	8	11	17	18	19	21*	22*	23*	26*	32*
Controle	24,8±1,5 ^a	18,4±0,9 ^a	17,4±0,9 ^a	17,6±1,9 ^a	16,0±0,9 ^a	19,1±0,7 ^a	20,2±1,1 ^a	12,4±0,8 ^a	13,1±1,0 ^a	14,4±0,8 ^a	12,7±0,5 ^a	12,2±0,8 ^a
DHM	24,6±1,5 ^a	21,6±1,0 ^{ab}	16,2±2,1 ^a	18,8±2,3 ^a	9,1±2,9 ^a	17,1±1,3 ^a	17,6±1,0 ^{ab}	14,0±0,5 ^a	11,9±0,7 ^a	13,8±1,5 ^a	11,1±0,9 ^a	11,9±0,9 ^a
DHS	27,1±1,4 ^a	21,8±1,1 ^{ab}	17,1±1,0 ^a	15,0±0,8 ^a	0,003±0,1 ^{bc}	0,11±0,07 ^{bc}	0,10±0,1 ^b	3,02±0,5 ^b	5,9±1,0 ^b	7,2±1,0 ^b	11,3±0,6 ^a	17,8±1,7 ^a
DHSP	26,6±2,1 ^a	22,6±2,3 ^b	17,7±1,3 ^a	18,0±0,7 ^a	1,06±1,9 ^{ac}	0,42±0,1 ^{ac}	0,32±0,07 ^b	2,38±1,4 ^b	3,7±0,9 ^b	6,6±1,4 ^b	10,2±0,9 ^a	14,3±0,9 ^a

Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, entre os tratamentos, por análise de Tukey ($p < 0.05$). A reidratação ocorreu no 20º dia de experimento.

* indica coleta realizada após a reidratação.

ANEXO 5

Tabela: Concentração interna de carbono (Ci, $\mu\text{mol mol}^{-1}$) de *Sorghum bicolor* submetido aos tratamentos controle, deficiência hídrica moderada (DHM), deficiência hídrica severa (DHS) e deficiência hídrica severa progressiva (DHSP) ao longo do experimento.

CI	1	4	8	11	17	18	19	21*	22*	23*	26*	32*
CONTROLE	56,7±6,2 ^a	62,4±9,5 ^a	71,7±8,2 ^a	69,8±2,1 ^a	67,7±10,4 ^a	107,8±9,2 ^{ac}	66,8±15,7 ^a	26,4±3,8 ^a	73,3±16,7 ^a	73,1±10,0 ^a	78,3±12,7 ^a	46,8±6,7 ^a
DHM	80,5±7,1 ^a	102,7±11,1 ^b	95,7±7,6 ^a	64,6±7,6 ^a	27,3±7,0 ^b	34,0±5,6 ^a	43,6±5,8 ^a	26,4±2,5 ^a	62,7±7,5 ^a	80,2±4,4 ^a	82,0±13,5 ^a	65,1±14,6 ^a
DHS	83,0±9,6 ^a	72,2±18,2 ^{ab}	61,2±15,5 ^a	64,6±7,0 ^a	368,2±45,4 ^c	334,1±46,7 ^b	337,7±57,5 ^b	56,6±5,8 ^b	82,1±9,0 ^a	95,5±18,4 ^a	103,7±12,9 ^a	36,8±5,2 ^a
DHSP	92,8±12,6 ^a	98,3±10,1 ^{ab}	80,0±26,3 ^a	79,1±16,8 ^a	219,0±29,8 ^c	211,9±34,0 ^c	259,9±30,4 ^b	45,6±6,4 ^{ab}	88,2±21,5 ^a	69,0±21,2 ^a	99,7±7,1 ^a	35,8±11,1 ^a

Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, entre os tratamentos, por análise de Tukey ($p < 0.05$). A reidratação ocorreu no 20º dia de experimento.

* indica coleta realizada após a reidratação.

ANEXO 6

Tabela: Eficiência do uso da água (A/E , $\mu\text{molCO}_2 \text{ mmol}^{-1}\text{H}_2\text{O}$) de *Sorghum bicolor* submetido aos tratamentos controle, deficiência hídrica moderada (DHM), deficiência hídrica severa (DHS) e deficiência hídrica severa progressiva (DHSP) ao longo do experimento.

A/E	1	4	8	11	17	18	19	21*	22*	23*	26*	32*
Controle	11,4±0,2 ^a	12,8±0,3 ^a	12,0±0,2 ^a	10,4±0,2 ^a	11,8±0,3 ^{ab}	9,2±0,3 ^{ac}	11,09±0,5 ^{ac}	13,8±0,2 ^a	13,4±0,7 ^a	11,7±0,3 ^a	14,8±0,6 ^a	13,9±0,2 ^a
DHM	10,5±0,3 ^a	11,3±0,3 ^b	12,1±0,3 ^a	10,9±0,2 ^a	13,8±0,1 ^a	10,8±0,2 ^a	12,4±0,4 ^a	13,2±0,4 ^a	15,2±0,2 ^a	12,0±0,3 ^a	12,0±0,6 ^a	13,1±0,7 ^a
DHS	10,4±0,2 ^a	12,5±0,3 ^{ab}	12,7±0,5 ^a	10,7±0,2 ^a	0,74±1,5 ^b	1,66±1,4 ^b	1,60±2,1 ^b	14,3±0,3 ^a	14,7±0,6 ^a	11,8±0,7 ^a	11,8±0,6 ^a	13,3±1,1 ^a
DHSP	9,9±0,5 ^a	11,5±0,4 ^{ab}	11,8±0,8 ^a	10,2±0,5 ^a	6,2±1,8 ^b	5,69±1,3 ^c	4,48±1,0 ^{bc}	12,2±3,1 ^a	13,7±2,1 ^a	13,5±1,0 ^a	13,5±0,4 ^a	14,5±0,4 ^a

Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, entre os tratamentos, por análise de Tukey ($p < 0.05$). A reidratação ocorreu no 20º dia de experimento.

* indica coleta realizada após a reidratação.

ANEXO 7

Tabela: Eficiência aparente de carboxilação (A/Ci) de *Sorghum bicolor* submetido aos tratamentos controle, deficiência hídrica moderada (DHM), deficiência hídrica severa (DHS) e deficiência hídrica severa progressiva (DHSP) ao longo do experimento.

A/Ci	1	4	8	11	17	18	19	21 *	22 *	23*	26*	32*
Controle	0,50± 0,10 ^a	0,33± 0,05 ^a	0,17± 0,03 ^a	0,25± 0,03 ^a	0,27± 0,05 ^a	0,18± 0,02 ^{ab}	0,39± 0,09 ^a	0,47± 0,10 ^a	0,22± 0,04 ^a	0,21± 0,03 ^a	0,18± 0,03 ^a	0,28± 0,05 ^a
DHM	0,31± 0,02 ^a	0,22± 0,02 ^b	0,40± 0,03 ^a	0,40± 0,10 ^a	0,23± 0,06 ^a	0,58± 0,13 ^a	0,44± 0,09 ^a	0,51± 0,03 ^a	0,18± 0,02 ^{ab}	0,17± 0,02 ^a	0,15± 0,02 ^a	0,23± 0,06 ^a
DHS	0,34± 0,04 ^a	0,32± 0,04 ^a	0,39± 0,13 ^a	0,31± 0,05 ^a	0,0001± 0,0003 ^b	0,0005± 0,0004 ^b	0,0008± 0,0008 ^b	0,04± 0,01 ^b	0,07± 0,009 ^{bc}	0,09± 0,02 ^a	0,12± 0,03 ^a	0,54± 0,09 ^a
DHSP	0,32± 0,08 ^a	0,24± 0,04 ^a	0,25± 0,06 ^a	0,27± 0,05 ^a	0,05± 0,05 ^{ab}	0,003± 0,001 ^{ab}	0,001± 0,0003 ^{ab}	0,007± 0,004 ^b	0,06± 0,02 ^c	0,14± 0,05 ^a	0,10± 0,005 ^a	0,52± 0,12 ^a

Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, entre os tratamentos, por análise de Tukey ($p < 0.05$). A reidratação ocorreu no 20º dia de experimento.

* indica coleta realizada após a reidratação.

ANEXO 8

Tabela: Fluorescência da clorofila *a* de *Sorghum bicolor* submetido aos tratamentos controle, deficiência hídrica moderada (DHM), deficiência hídrica severa (DHS) e deficiência hídrica severa progressiva (DHSP) ao longo do experimento.

Variável	Tratamento	Dias de experimento					
		19	21*	22*	23*	26*	32*
ETR	Controle	121,2±10,9 ^a	114,18±9,9 ^a	96,28±9,1 ^a	119,22±9,3 ^a	97,8±14,1 ^a	110,88±16,0 ^a
	EM	130,28±16,4 ^a	142,76±7,8 ^b	89,6±7,3 ^a	108,88±11,6 ^a	80,26±6,7 ^b	106,1±4,5 ^a
	ES	59,98±8,7 ^b	88,82±14,3 ^{ac}	87,46±7,7 ^a	140,24±7,2 ^b	126,62±16,6 ^c	104,82±8,6 ^b
	ESP	76,86±19,1 ^{ab}	88,84±4,4 ^c	74,58±7,4 ^a	106,08±15,6 ^a	97,9±9,6 ^{ab}	69,8±1,1 ^a
qP	Controle	0,3436±0,04 ^a	0,3328±0,03 ^a	0,304±0,03 ^a	0,35±0,05 ^a	0,282±0,04 ^a	0,2984±0,03 ^a
	EM	0,3588±0,03 ^b	0,3772±0,03 ^a	0,3086±0,03 ^a	0,3108±0,05 ^{ab}	0,2348±0,03 ^a	0,3108±0,02 ^a
	ES	0,2718±0,05 ^c	0,3108±0,04 ^a	0,3176±0,03 ^a	0,4788±0,05 ^b	0,3728±0,04 ^b	0,2768±0,03 ^b
	ESP	0,3256±0,09 ^c	0,332±0,01 ^a	0,2798±0,04 ^a	0,3476±0,06 ^c	0,2658±0,04 ^a	0,184±0,01 ^b
ΦPSII	Controle	0,1924±0,02 ^a	0,1812±0,01 ^a	0,1528±0,01 ^a	0,1892±0,01 ^a	0,1552±0,02 ^a	0,176±0,02 ^a
	EM	0,2068±0,03 ^b	0,2266±0,01 ^b	0,1422±0,01 ^a	0,1728±0,02 ^{ab}	0,1274±0,01 ^a	0,1684±0,01 ^a
	ES	0,0952±0,02 ^c	0,141±0,01 ^a	0,1388±0,01 ^a	0,2226±0,01 ^a	0,201±0,01 ^b	0,1664±0,01 ^b
	ESP	0,122±0,03 ^c	0,141±0,01 ^a	0,1184±0,01 ^a	0,1684±0,02 ^b	0,1554±0,01 ^a	0,1108±0,01 ^b

ETR: taxa de transporte de elétrons. qP: dissipação fotoquímica. ΦPSII: rendimento quântico efetivo do fotossistema II. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, entre os tratamentos, por análise de Tukey ($p < 0,05$). * indica coletas realizadas após a reidratação.