



MEMÓRIA FISIOLÓGICA A PARTIR DO ESTRESSE  
HÍDRICO EM *Sorghum bicolor* (L.) MOENCH COM  
EXPRESSÃO DA AQUAPORINA PIP2;5

**PRISCILA PEGORIN**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, no Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

**BOTUCATU – SP**

**2022**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

MEMÓRIA FISIOLÓGICA A PARTIR DO ESTRESSE  
HÍDRICO EM *Sorghum bicolor* (L.) MOENCH COM  
EXPRESSÃO DA AQUAPORINA PIP2;5

**PRISCILA PEGORIN**

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

**ORIENTADOR**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, no Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

**BOTUCATU – SP**

**2022**

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

Pegorin, Priscila.

Memória Fisiológica a partir do estresse Hídrico em  
*Sorghum bicolor* (L.) Moench com expressão da aquaporina  
PIP2;5 / Priscila Pegorin. - Botucatu, 2022

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

Orientador: Luiz Fernando Rolim de Almeida

Capes: 20303033

1. Plantas - Relações hídricas. 2. Plantas - Efeito da  
seca. 3. *Sorghum*. 4. Desidratação (Hídrica). 5. Fisiologia  
vegetal. 6. Aquaporina 5.

Palavras-chave: Aprendizagem; Recuperação fisiológica;  
Resposta fisiológica; Seca; Sinal de estresse.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

(Albert Einstein)

**Dedico,**

Aos meus pais Alcides e Margarete.

À minha irmã Marisa.

À minha avó Aparecida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me permitir concretizar um sonho ao realizar essa etapa da minha vida. Por toda força, apoio e calma que nunca me faltaram nos momentos inquietantes.

Aos meus pais, Alcides Geraldo Pegorin e Margarete de Lourdes Antoniassi Pegorin pelo amor incondicional, apoio e força que recebi em todos os dias da minha vida.

À minha irmã Marisa Pegorin Fodra por sempre possuir palavras de conforto nos momentos desesperadores.

Ao meu namorado Victor Garcia Reigada pelo apoio, amor e carinho destinados a mim nesta etapa crucial da minha vida.

À minha avó Aparecida Bassan Antoniassi por sempre me encorajar. Espero que aí de cima a senhora esteja acompanhando meus passos, vó.

Aos meus tios, tias e primas que sempre me incentivaram nesta caminhada.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu professor de graduação Me. Dorival José Coral, pelos ensinamentos e por transferir a mim a sua paixão por aprender e ensinar botânica.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Fernando Rolim de Almeida, por participar ativamente do meu processo de formação profissional e pessoal com todo apoio e compreensão.

Aos meus professores Dr. João Pessoa de Araújo Júnior e Dr. Bruno César Rossini, por todos os ensinamentos e auxílio.

À Ma. Thayssa Rabelo Schley e ao Dr. Felipe Giroto Campos por me acompanharem desde o experimento até o tratamento dos dados. Aprendi muito com vocês.

À todos os docentes do Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal que ministraram disciplinas neste período de pandemia e que contribuíram significativamente para o meu crescimento profissional.

Aos meus queridos amigos Sabrina Fernanda Lira Menegassi, Jully Caroline Souza de Sena, Raquel Bruni Mussari, Leonardo Augusto de Campos Ventura, Luan Ribas Miranda e Fernanda Bueno De La Concepcion que sempre foram sinônimo de carinho, apoio e força em todos os momentos que já compartilhamos.

À todos colegas de Pós Graduação feitos nesses dois anos, pelo apoio e auxílio nas análises, pelas risadas e ensinamentos.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	3
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	5
2.1. <i>Estresse hídrico em plantas</i> .....	5
2.2. <i>Aquaporinas e o estresse hídrico</i> .....	6
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	8
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	8
4.1. <i>Espécie vegetal</i> .....	8
4.2. <i>Preparo do solo</i> .....	8
4.3. <i>Delineamento experimental</i> .....	9
4.4. <i>Variáveis ecofisiológicas analisadas</i> .....	10
4.5. <i>Análise do perfil transcricional da PIP2;5</i> .....	13
<b>5. ANÁLISE DE DADOS</b> .....	17
<b>6. RESULTADOS</b> .....	17
6.1. <i>Relações hídricas</i> .....	17
6.2. <i>Trocas gasosas</i> .....	19
6.3. <i>Fluorescência da clorofila a</i> .....	22
6.4. <i>Análise de crescimento</i> .....	23
6.5. <i>Análise antioxidante</i> .....	24
6.6. <i>Perfil transcricional da PIP2;5</i> .....	25
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	26
<b>8. CONCLUSÃO</b> .....	33
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	34

## RESUMO

A deficiência hídrica provoca alterações fisiológicas, bioquímicas e estruturais. Respostas fisiológicas ocorrem após sinalização do déficit hídrico e promovem nas plantas a capacidade de armazenar informações geradas a partir do estímulo, iniciando o processo de memória fisiológica. Nossa hipótese é que a deficiência hídrica severa progressiva (DHSP), por ser recorrente, imprima memória fisiológica nos processos de reidratação, em especial no segundo evento, atrelada a expressão diminuída da PIP2;5 no período de estresse hídrico e superexpressão no momento da reidratação. Este estudo teve como objetivo avaliar respostas que caracterizam a memória fisiológica em *Sorghum bicolor* (L.) Moench a partir da deficiência hídrica severa progressiva (DHSP) com ênfase no processo de reidratação, analisando a relação com a aquaporina PIP2;5. As plantas foram separadas em dois grupos: controle e deficiência hídrica severa progressiva, cujo último tratamento foi submetido a dois eventos de restrição hídrica, seguidas de reidratações. Os dados de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, conteúdo relativo de água (CRA) e potenciais hídricos foliares e do solo ( $\Psi_w$  MPa), condutividade hidráulica foliar ( $K_{planta}$ ), atividade da enzima POD, nível de peroxidação lipídica, conteúdo de  $H_2O_2$  e a expressão do gene PIP2;5 foram analisados. Os resultados demonstraram que o segundo evento de deficiência hídrica e reidratação promoveu respostas fisiológicas que indicam aumento da tolerância à restrição hídrica. O CRA,  $\Psi_w$  foliar e  $E_g$ , indicam estratégias na economia do uso da água, evidenciando a memória de deficiência hídrica, bem como a aquaporina PIP2;5 que apresentou redução da sua expressão no período de seca, seguida de superexpressão assim que a reidratação foi aplicada, auxiliando nas relações hídricas da planta e no crescimento.

**Palavras-chave:** Aprendizagem; seca; sinal de estresse; resposta fisiológica; recuperação fisiológica.

## ABSTRACT

Water deficiency causes physiological, biochemical and structural changes. Physiological responses occur after water deficit signaling and promote in plants the ability to store information generated from the stimulus, initiating the physiological memory process. Our hypothesis is that the severe progressive water deficit (DHSP), as it is recurrent, imprints physiological memory in the rehydration processes, especially in the second event, linked to the decreased expression of PIP2;5 in the period of water stress and overexpression at the time of rehydration. This study aimed to evaluate responses that characterize physiological memory in *Sorghum bicolor* (L.) Moench from severe progressive water deficit (DHSP) with emphasis on the rehydration process, analyzing the relationship with aquaporin PIP2;5. The plants were divided into two groups: control and severe progressive water deficit, whose last treatment was submitted to two water restriction events, followed by rehydration. Gas exchange data, chlorophyll a fluorescence, relative water content (CRA) and soil and leaf water potentials ( $\Psi_w$  MPa), leaf hydraulic conductivity ( $K_{planta}$ ), POD enzyme activity, lipid peroxidation level,  $H_2O_2$  content and PIP2;5 gene expression were analyzed. The results showed that the second event of water deficiency and rehydration promoted physiological responses that indicate increased tolerance to water restriction. The CRA, foliar  $\Psi_w$  and  $E, gs$ , indicate strategies in the economy of water use, evidencing the memory of water deficit, as well as the aquaporin PIP2;5 which showed a reduction in its expression in the dry period, followed by overexpression as soon as the rehydration was applied, helping the plant's water relations and growth.

**Keywords:** Learning; dry; stress sign; physiological response; physiological recovery.



## 1. INTRODUÇÃO

Um importante fator abiótico que limita o desenvolvimento das plantas e consequentemente, o rendimento da colheita, é a seca (ROSA et al., 2020). A intensidade e a frequência dos períodos de seca (SCHAR et al., 2004; TRENBERTH et al., 2003), promove, nas plantas, a habilidade em aclimatar-se perante os estresses abióticos causados pela variação ambiental (LAMBERS; CHAPIN; PONS, 2008; BRUCE et al., 2007). Estresse pode ser considerado um desvio da condição ótima para a vida vegetal (LARCHER; DE ASSIS PRADO, 2000), onde determinado fator externo coloca a planta em uma situação desfavorável, afetando o metabolismo e o desenvolvimento desse indivíduo (SILVA; PINCELLI, 2010). Nessas condições, ocorrem alterações estruturais no aparato fotossintético e na interação dos processos celulares e moleculares, afetando as funções vitais do vegetal (SAKAI; LARCHER, 1987). Em situações de estresse hídrico severo, por exemplo, o sorgo *Sorghum bicolor* (L.) Moench pode apresentar um decréscimo na sua produtividade, mesmo estando entre um dos cereais mais tolerantes à seca (REDDY et al., 2011; BATISTA et al., 2017).

A partir da percepção do estímulo estressante até a resposta final, as plantas podem: (1) ter uma resposta direta ao estímulo; (2) armazenamento da informação gerando a memória e (3) aprendizagem (THELLIER; LÜTTGE, 2013). Na etapa da aprendizagem, o estímulo recorrente modifica a intensidade de resposta, seja positivamente, reforçando a resposta, o que corresponde à “sensibilização” (CONRATH et al., 2006), ou negativamente, reduzindo a resposta, denominado de aprendizagem por habituação ou “familiarização” (GAGLIANO et al., 2014).

As respostas à um primeiro evento de estresse de seca envolvem mudanças bioquímicas, moleculares e estruturais a fim de que ocorra a tolerância e reparo dos danos causados (FLETA-SORIANO; MUNNÉ-BOSCH, 2016; LEUFEN; NOGA; HUNSCHE, 2016; MOSA; ISMAIL; HELMY, 2017). Durante a etapa de recuperação da planta, este primeiro evento de estresse imprime uma marca, que pela manutenção das mudanças estruturais (FLETA-SORIANO; MUNNÉ-BOSCH, 2016; TREWAVAS, 2003), ou pelas proteínas sinalizadoras e as modificações epigenéticas, ativam os genes de tolerância (BRUCE et al., 2007; CRISP et al., 2016; MARTINEZ-MEDINA et al., 2016; WITZANY, 2018), permitindo respostas mais eficientes a futuros eventos de estresse, cujas informações atuam como uma memória de estresse, gerada a partir da interpretação e aprendizagem dos dados armazenados (BALUŠKA; GAGLIANO; WITZANY, 2018; BRUCE et al., 2007; CRISP et al., 2016; FLETA-SORIANO;

MUNNÉ-BOSCH, 2016; OGLE et al., 2015; WALTER et al., 2013).

A memória de curto prazo causada por um único evento de estresse (acúmulo de substâncias) (VIRLOUVET; FROMM, 2015), dificilmente será repassada para futuras gerações (RAMÍREZ et al., 2015). Entretanto, essa marca de estresse pode ultrapassar o evento estressante (AVRAMOVA, 2015), caracterizando-se como memória fisiológica efetiva, cuja exposição repetida ao estresse altera a cromatina e a metilação de DNA, que provavelmente será repassada as gerações seguintes (RAMÍREZ et al., 2015).

Walter et al., (2011), indicaram a existência de memória à seca em *Arrhenatherum elatius*, cujas plantas submetidas à seca recorrente aumentaram a fotoproteção, em comparação aquelas que não foram submetidas a seca anteriormente. Em cana-de-açúcar a memória de estresse promove a assimilação de CO<sub>2</sub> e condutância estomática mesmo sob deficiência hídrica (RIBEIRO et al., 2021). Outro estudo, com a espécie *Dipteryx alata*, também demonstrou memória, cujas plantas submetidas à seca recorrente, tiveram sua condutância estomática e concentração interna de carbono reduzidas, diferentemente das plantas que passaram por um evento único de deficiência hídrica, cuja recuperação esteve atrelada à condutividade hidráulica foliar ( $K_{planta}$ ), permitindo a manutenção de maior abertura estomática (ALVES et al., 2020).

A mudança de expressão de genes responsáveis pela codificação de proteínas, conhecidas como aquaporinas (AQPs), relacionam-se com a tolerância das plantas (DA SILVA et al., 2013) e portanto, torna-se interessante analisá-las juntamente com as alterações fisiológicas. As aquaporinas estão envolvidas em diversos processos fisiológicos, desde o movimento de água e solutos, carregamento e descarregamento do floema, até o controle da abertura estomática e manutenção da condutância hidráulica das raízes, caule e folhas (AYADI; BRINI; MASMOUDI, 2019). Altos níveis de expressão da aquaporina PIP2;5 em *Sorghum bicolor* (L.) Moench foram demonstrados sob estresse hídrico, apresentando níveis mais baixos de expressão apenas em sementes (REDDY et al., 2015). Tempo e intensidade de estresse afetam diretamente a expressão (GALMÉS et al. 2007a), assim como a adaptação à seca ou não (LIAN et al., 2004).

O processo de adaptação das plantas pela memória efetiva torna-se extremamente importante para a sua sobrevivência, já que exibe uma capacidade de resposta mesmo em um cenário de constantes alterações climáticas (OGLE; BARBER, 2016; WEINHOLD, 2018). Além disso, estudos sobre a habilidade de recuperação após o estresse hídrico, analisando as variáveis fisiológicas, são escassos e, portanto, demandam de mais informações (FLEXAS et al., 2006), bem como o papel das AQPs na recuperação pós estresse hídrico, já que podem atuar

como reguladores negativos ou positivos (JANG et al., 2013).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Estresse hídrico em plantas

Na fisiologia vegetal diversas definições de estresse são conhecidas. A razão pela qual existem tantas definições concentra-se no fato de que cada pesquisador trabalha com um tipo de estresse diferente, e assim, acaba definindo o estresse mediante a sua linha de pesquisa (MOSA; ISMAIL; HELMY, 2017). Larcher (1987) define o estresse como o estado onde a planta experimenta mudanças que demandam respostas. Caso a resposta esteja dentro do limite de tolerância, a planta se recupera, porém se não estiver, danos permanentes ao indivíduo ocorrem. Lichtenthaler (1996) define o estresse como qualquer condição ou substância que afete o crescimento, desenvolvimento ou o metabolismo do vegetal.

O estresse também pode ser definido como alterações fisiológicas desencadeadas quando as plantas são expostas à condições desfavoráveis que não necessariamente representam ameaça para a vida, porém induzem respostas de alarme (GASPAR et al., 2002). A maioria das definições de estresse descrevem-no como mudanças nas condições abióticas ou bióticas que promovem respostas nas plantas, podendo desencadear danos ao organismo ou não (MOSA; ISMAIL; HELMY, 2017).

As plantas são capazes de perceber o estresse por meio de estratégias de detecção do estresse, cujas estratégias são diversas e dependem do estresse, do órgão afetado e da espécie (KRANNER et al., 2010; MOSA; ISMAIL; HELMY, 2017). A seca é considerada o principal tipo de estresse abiótico, afetando o crescimento, o desenvolvimento e a reprodução das plantas (MOSA; ISMAIL; HELMY, 2017). O déficit hídrico, por exemplo, pode ser percebido no solo por meio de osmosensores nas células da raiz da planta (URAO et al., 1999; MOSA; ISMAIL; HELMY, 2017).

No déficit hídrico, o potencial hídrico ( $\Psi$ ) do apoplasto é mais negativo que o potencial do simplasto, o que reduz o potencial de pressão (turgor) ( $\Psi_P$ ) e o volume, além de induzir o acúmulo de ácido abscísico (ABA). Esse acúmulo induz à diminuição da abertura dos estômatos, reduz as trocas gasosas, inibe a fotossíntese, produz espécies reativas de oxigênio (ERO) promovendo danos no DNA e nas membranas celulares (TAIZ et al., 2017). Portanto, sob déficit hídrico, vários mecanismos e processos precisam ser combinados a partir da percepção do sinal do estresse os quais promovem respostas fisiológicas (NEPOMUCENO,

2001). É a severidade da seca que promove a aclimação e a adaptação ao estresse hídrico (KUDOYAROVA; KHOLODOVA; VESELOV, 2013), cuja capacidade de recuperação está relacionada à retomada das taxas fotossintéticas e abertura estomática (FLEXAS et al., 2006).

Um dos primeiros impactos do déficit hídrico ocorre na fotossíntese (PINHEIRO; CHAVES, 2011) sendo este o principal processo afetado (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009; HASANUZZAMAN et al., 2013), reduzindo a taxa de assimilação de carbono devido a limitação estomática, aumentando a resistência do estômato em relação à saída de água e entrada de gás carbônico (ASHRAF; HARRIS, 2013), além da diminuição do potencial hídrico foliar e do solo (LAWLOR, 2002; CHAVES; MAROCO; PEREIRA, 2003; SANTOS et al., 2006). O status hídrico da folha é relacionado com a condutância estomática e a taxa de transpiração, já que o fechamento estomático é a principal resposta para evitar a perda de água por meio da transpiração, correlação bastante estudada em estudos com déficit hídrico (TARDIEU; SIMONNEAU, 1998; FLEXAS; ESCALONA; MEDRANO, 1999; CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009; WAN et al., 2009; GILBERT; MEDINA, 2016).

Nessas condições, a limitação não estomática também ocorre, envolvendo a degradação de pigmentos, inativação dos fotossistemas e diminuição da atividade de enzimas presentes no Ciclo de Calvin-Benson (ASHRAF; HARRIS, 2013). O fotossistema II (PSII) cuja proteína D1 se faz presente, apresenta alta sensibilidade a estresses (GOH et al., 2012). Em tais condições, a proteína é degradada, alterando a atividade da cadeia transportadora de elétrons e reduzindo a síntese de NADPH<sub>2</sub> e ATP. A enzima de carboxilação Rubisco, também é afetada, alterando o pH do estroma do cloroplasto e reduzindo a assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (GALMÉS et al., 2013).

A avaliação das trocas gasosas e da fluorescência da clorofila *a* é utilizada para investigar os efeitos da limitação não estomática da fotossíntese sob estresse hídrico (ENNAHLI; EARL, 2005). A combinação da luz incidente e a deficiência hídrica reduz a capacidade dos fotossistemas de transformar a energia luminosa em química, levando ao aumento de dano no aparato fotossintético em razão do acúmulo das espécies reativas de oxigênio (ERO), sintetizadas como consequência do estresse (FOYER; LELANDAIS; KUNERT, 1994; WINGLER et al., 2000; ZHOU; LAM; ZHANG, 2007).

## *2.2 Aquaporinas e o estresse hídrico*

Aquaporinas são proteínas integrais de membrana que formam canais, permitindo a

passagem de água, que estão presentes em todas as plantas e animais e desempenham papéis em diferentes processos fisiológicos e ligados ao desenvolvimento desses indivíduos, incluindo a germinação, alongamento celular, movimento estomático, fotossíntese, reprodução e respostas a diferentes condições de estresse abiótico (ARIANI; GEPTS, 2015). Paralelamente a isso, as AQPs atuam na regulação da absorção de água, perda de água e condutividade hidráulica, e dessa forma, na regulação das relações de água entre a planta e o tecido (CHAUMONT; TYERMAN, 2014). Originalmente, as AQPs presentes nas plantas foram classificadas em quatro subfamílias: PIPs (proteínas intrínsecas de membrana), TIPs (proteínas intrínsecas de tonoplasto), NIPs (proteína intrínseca do tipo nodulina-26) e SIPs (pequenas proteínas intrínsecas) (JOHANSON et al., 2001; ZARDOYA, 2005).

Especificamente no sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), todos estes tipos de aquaporina são existentes: TIP com cinco subgrupos (TIP1 a TIP5), a subfamília PIP com apenas dois subgrupos, PIP1 e PIP2, as NIPs com quatro subgrupos (NIP1 a NIP4) e as SIPs com dois subgrupos (SIP1 e SIP2) (REDDY et al., 2015). Os genes PIP1 e PIP2 em estudos com o tabaco e *Arabidopsis* mostraram contribuição no transporte de água nas raízes, sobretudo em estresse hídrico (KALDENHOFF et al., 1998, SIEFRITZ et al., 2002), cujo subgrupo PIP2 demonstra maior eficiência no transporte de água (TYERMAN; NIEMIETZ; BRAMLEY, 2002).

A associação existente entre a seca e a expressão das AQPs demonstram variabilidade nas respostas, o que depende das isoformas, dos tecidos, das espécies, do nível de estresse e da presença de simbiontes (AFZAL et al., 2016; PARK; CAMPBELL, 2015). Em *Arabidopsis*, tanto PIPs quanto TIPs são geralmente regulados negativamente em folhas sob estresse hídrico (ALEXANDERSSON et al., 2005; BOURSIAIC et al., 2005). Entretanto, existem exceções em que PIP1;4 e PIP2;5 foram reguladas positivamente (ALEXANDERSSON et al., 2005).

A condutividade hidráulica no sistema radicular é orientada parcialmente pelas aquaporinas PIPs (JAVOT et al., 2003, POSTAIRE et al., 2010), cujas respostas não são padronizadas quando submetidas a estresse hídrico, como visto em nove estudos, dos 37 genes PIPs estudados em condições de seca, nove não foram alterados, 15 tiveram sua expressão reduzida e 13 apresentaram um aumento de sua expressão, o que indica que cada gene PIP pode exercer uma função específica na resposta a um tipo de estresse (AROCA; PORCEL; RUIZ-LOZANO, 2012). A expressão, além disso, pode ser específica de um determinado tecido celular, mudando ao longo do desenvolvimento e em resposta aos estímulos ambientais (YANEF; VITALI; AMODEO, 2015; SCHARWIES; DINNENY, 2019). O aumento da

expressão das AQPs, promovem melhora na capacidade em sobreviver diante do estresse hídrico, enquanto outros pesquisadores acreditam que a diminuição da expressão ocorre em decorrência da inativação das proteínas na tentativa de evitar perdas excessivas de água (GASPAR, 2011).

Com o silenciamento de genes PIP1 e PIP2, em plantas de tabaco e *Arabidopsis* demonstrou-se queda na capacidade de recuperação após o estresse hídrico (MARTRE et al., 2002, SIEFRITZ et al., 2002). Já a superexpressão da PIP2;5 no milho (*Zea mays*), provocou aumento na condutividade hidráulica, afetando positivamente o alongamento foliar em condições de estresse (DING et al., 2020a) e melhora a sensibilidade à sinalização de ABA, fechando os estômatos (DING et al., 2020b). Também no milho, transcritos das aquaporinas *ZmPIP1;1*, *ZmPIP1;3* e *ZmPIP2;2* foram encontrados em complexos estomáticos, sendo fortemente induzidos durante o dia, demonstrando o envolvimento no transporte diurno de água e no controle estomático (HEINEN et al., 2014). Em *Arabidopsis*, a aquaporina PIP2;1 participa da sinalização do ABA em células-guarda, o que promove o fechamento estomático, facilitando a entrada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para regular o movimento estomático e a saída de água (GRONDIN et al., 2015; RODRIGUES et al., 2017).

### 3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi analisar respostas que caracterizam memória fisiológica do *Sorghum bicolor* (L.) Moench, analisando se esta é dependente da primeira experiência, promovendo a resposta fisiológica da planta no segundo evento, analisando a relação existente entre o estresse hídrico e a aquaporina PIP2;5. Nossa hipótese é que a deficiência hídrica severa progressiva, por ser recorrente, imprima memória fisiológica nos processos de reidratação, em especial no segundo evento, atrelada a expressão diminuída da PIP2;5 no período de estresse hídrico e superexpressão no momento da reidratação.

### 4. MATERIAL E MÉTODOS

#### 4.1. Espécie vegetal

A espécie escolhida para o trabalho foi o sorgo *Sorghum bicolor* (L.) Moench, devido as suas características tolerantes ao estresse hídrico, sendo alvo de estudos sobre tolerância a seca e produtividade (FRACASSO; TRINDADE; AMADUCCI, 2016). Além disso, a espécie tem genoma sequenciado (PATERSON et al., 2009) e muitos programas de melhoramento genético têm estudado o sorgo na tentativa de elucidar os mecanismos relacionados ao aumento

da produtividade agrícola, diante das mudanças ambientais (FRACASSO; TRINDADE; AMADUCCI, 2016). O experimento ocorreu em casa de vegetação, possuindo sistema semi controlado com umidade relativa do ar de 50 - 70%, temperatura de 25 - 29°C e DFFF até 800  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , no Instituto de Biotecnologia (IBTEC), UNESP - Campus de Botucatu/SP (coordenadas geográficas: 22°53'11.3"S 48°29'15.4"O). As sementes de *Sorghum bicolor* (L.) Moench são híbridas (BRS332) e foram adquiridas em parceria com a Embrapa.

#### 4.2. Preparo do solo

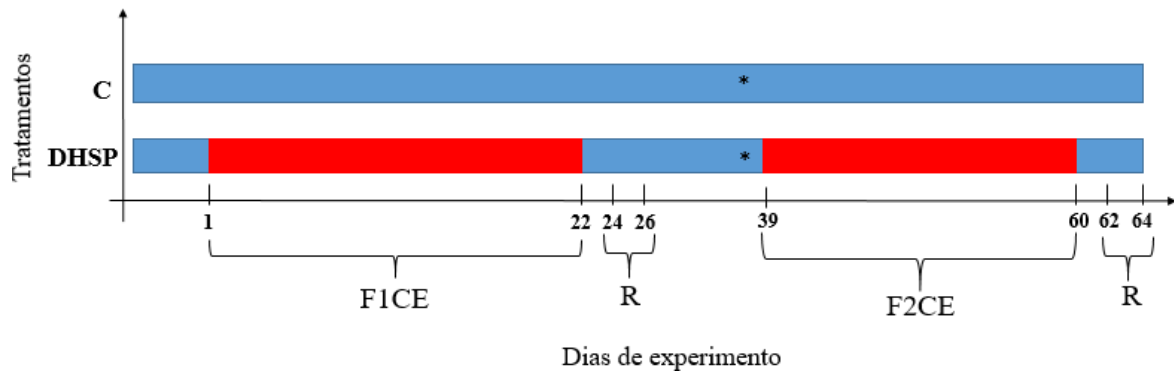
Utilizamos o solo do tipo médio, caracterizado entre argiloso e arenoso. O solo utilizado teve seu pH corrigido quimicamente com calcário. Cada vaso foi pesado antes de adicionarmos água e possuíam a mesma quantidade de solo (10 kg). Adicionamos água e medimos o peso dos vasos em capacidade de campo, na manhã seguinte, após toda a liberação de água gravitacional. Em relação as sementes do sorgo, estas se desenvolveram em placas de crescimento de isopor com substrato vegetal, em casa de vegetação, sendo transplantadas para os vasos apenas 20 dias depois. No décimo dia da germinação, estas foram adubadas com solução nutritiva à 25% segundo Hoagland e Arnon (1950) (solução número 2), assim como também receberam asolução nutritiva um dia após o transplante, dessa vez usando a solução em 50%.

#### 4.3. Delineamento experimental

Todas as plantas foram mantidas em capacidade de campo até o início do experimento. O experimento teve início no mês de abril e foi finalizado na segunda semana de junho. As plantas foram separadas por sorteio em dois tratamentos: controle (C), permanecendo em capacidade de campo ao longo do experimento; enquanto que a deficiência hídrica severa progressiva (DHSP), teve seu fornecimento de água cessado, de forma abrupta, até o encerramento do período de estresse hídrico. O final do período de estresse foi definido a partir dos parâmetros: conteúdo relativo de água foliar pré-dawn:  $51,5 \pm 3,5$ ; potencial hídrico foliar pré-dawn:  $-2,5 \pm 3,6$ ; potencial hídrico do solo:  $-10,1 \pm 0,9$ ; gs:  $1,2 \pm 0,9$ ; Fv/Fm:  $0,57 \pm 0,1$ .

Tais plantas passaram por dois períodos de restrição hídrica, nomeados respectivamente de F1CE (final do primeiro ciclo de estresse) e F2CE (final do segundo ciclo de estresse), ambos de duração de 22 dias, período onde as plantas apresentaram as variáveis citadas acima, que foram seguidos de reidratação até a capacidade de campo (potencial hídrico do solo do controle e DHSP, respectivamente:  $-0,2 \pm 0,07$  e  $-0,2 \pm 0,04$ ) onde coletamos dados de 24 horas, identificado nos gráficos como 1ª reid. e 72 horas após a reidratação identificada como 3ª reid nos gráficos. Para o  $K_{\text{planta}}$ , trocas gasosas e fluorescência, as primeiras 24 horas após a reidratação, foram identificados nos gráficos como: Reid 1 (F1CE) e Reid 2 (F2CE). Além da

reidratação, no 38º dia de experimento foi aplicado Hoagland 50% (aproximadamente 400 ml por vaso) a fim de promover o crescimento das plantas. Na figura 1, podemos observar o modelo experimental.



**Figura 1:** Delineamento experimental realizado em plantas de *Sorghum bicolor* (L.) Moench submetidas a deficiência hídrica severa progressiva (DHSP) e subsequente reidratação. Os tratamentos são representados por C e DHSP, representando respectivamente o tratamento controle e a deficiência hídrica severa 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). O experimento teve início no dia 1, marcando o 22º e o 60º dia o encerramento do ciclo de estresse hídrico. A reidratação ocorreu nos dias 23 e 61, contabilizando no 22º e 62º 24 horas de reidratação e 72 horas de reidratação nos dois 26 e 64, sendo o 64º dia o último dia de experimento. As variáveis coletadas tanto no momento de estresse hídrico, quanto nas reidratações estão no parágrafo a seguir. O asterisco representa a aplicação de Hoagland 50% nas plantas em DHSP e Controle.

Durante o estresse hídrico, medimos as trocas gasosas e fluorescência de clorofila *a* dois dias por semana. O potencial hídrico foliar e o potencial hídrico do solo ( $\Psi_w$  MPa), além do conteúdo relativo de água foliar foram obtidos no primeiro dia de experimento, no último dia de estresse do primeiro ciclo (F1CE), 24 e 72 horas após a reidratação, assim como para o segundo ciclo, no último dia de estresse (F2CE), 24 e 72 horas após a reidratação. As trocas gasosas, a fluorescência, e a condutividade hidráulica foliar ( $K_{planta}$ ), foram medidos no primeiro dia de experimento, F1CE e F2CE e 24 horas após a reidratação do primeiro e segundo ciclo. Coletamos folhas para análise molecular no F2CE, 24 e 72 horas após a reidratação, assim como coletamos folhas para a análise antioxidante, no F1CE e F2CE, 24 e 72 horas após a reidratação do primeiro e segundo ciclo. Coletamos a massa seca das plantas e medimos a área foliar no último dia de estresse do segundo ciclo e no último dia de experimento (72 horas após



a reidratação), para análise de crescimento. No total, foram 70 vasos, cada vaso contendo duas mudas de *Sorghum bicolor* (L.) Moench, dos quais: 35 vasos para cada tratamento, sendo cinco para medições das trocas gasosas e fluorescência durante todo o experimento e 30 vasos para o restante das variáveis analisadas. O experimento contemplava cinco repetições para cada tratamento, contendo sete vasos cada repetição, com duas mudas cada vaso, totalizando 14 mudas, com análises destrutivas em cada dia de coleta.

#### 4.4. Variáveis ecofisiológicas analisadas

*Relações hídricas:* Coletamos as folhas para determinar o 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, as amostras foram colocadas 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). As amostras foram pesadas novamente para que o peso túrgido (PT) fosse obtido e em seguida levamos para estufa (temperatura  $\approx$  60°C até peso constante), obtendo o peso seco (PS). Utilizamos balança de precisão de 0,0001 g para determinação dos PF, PT e PS. Assim, determinamos o CRA de acordo com Smart e Bingham (1974), utilizando-se a fórmula:  $CRA (\%) = (PF-PS) / (PT-PS) \times 100$ . Além disso, medimos o potencial hídrico foliar ( $\Psi_w$  da folha, MPa) através das folhas coletadas e analisadas conforme o 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 (PD) às 05:00 e meio dia (MD) às 12:00 horas. O potencial hídrico do solo ( $\Psi_w$  do solo, MPa), também foi medido ao meio dia com o mesmo equipamento. A condutividade hidráulica da planta ( $K_{planta}$ ) foi calculada de acordo com Tsuda e Tyree (2000), utilizando do  $\Psi_w$  do solo,  $\Psi_w$  da folha e taxa de transpiração ( $E$ ) ao meio dia, aplicada na fórmula:  $E = K_{planta}(\Psi_w \text{ solo} - \Psi_w \text{ folha})$ .

*Trocas gasosas:* Geradas pelo equipamento com sistema aberto de fotossíntese com analisador de CO<sub>2</sub> e vapor d'água por radiação infra-vermelha (Infra Red Gas Analyser – IRGA modelo GSF 3000, Walz, Alemanha). Realizamos as medidas entre 10:00 e 11:00 horas da manhã em dia ensolarado, selecionando uma planta de cada repetição (totalizando cinco repetições), nas quais escolhemos e padronizamos as 2ª ou 3ª folhas com limbo totalmente expandido. Medimos a taxa de transpiração ( $E$ , mmol vapor d'água m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), condutância estomática (gs, mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> ( $A_{Net}$ ,  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), déficit de pressão de vapor (VPD Pa/kPa) e concentração interna de carbono ( $C_i$ ,  $\mu$ mol mol<sup>-1</sup>) na intensidade de

1500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  de densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF). Calculamos a eficiência do uso da água ( $A/E$ ,  $\mu\text{molCO}_2 \text{ mmol}^{-1}\text{H}_2\text{O}$ ) e a eficiência aparente de carboxilação ( $A/C_i$ ,  $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e a eficiência intrínseca do uso da água ( $A/g_s$ ). Para as trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* um cálculo de normalização foi utilizado, referindo-se ao potencial de resistência e resiliência da planta (BANNING; MURPHY, 2008).

*Fluorescência da clorofila a:* As folhas foram cobertas com papel alumínio e mantidas no escuro durante aproximadamente 30 minutos, antes de obtermos as variáveis da fluorescência da clorofila *a* com auxílio do IRGA. Calculamos a eficiência quântica máxima do PSII ( $F_v/F_m$ ), rendimento quântico efetivo do PSII ( $\Phi_{\text{PSII}} = \Delta F/F_m'$ ), taxa de transporte de elétrons ( $\text{ETR} = \Delta F/F_m' \times \text{DFFF}$ ), dissipação fotoquímica [ $q_P = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')$ ] e a dissipação não-fotoquímica [ $\text{NPQ} = (F_m - F_m')/F_m'$ ] (MAXWELL; JOHNSON, 2000).

*Análise de crescimento:* Coletamos todas as folhas fotossinteticamente ativas das amostras para calcular a área foliar ( $AF - \text{dm}^2$ ) com o auxílio do Area Meter. Para obtermos a massa seca ( $MS - \text{g}$ ) das amostras coletamos todas as folhas e caule. Em seguida, foi levado para estufa (temperatura  $\approx 60^\circ\text{C}$ ) até peso constante. Utilizamos balança de precisão de 0,0001 g para determinar o peso seco total. Com os dados de  $AF$  e  $MS$ , obtemos a área foliar específica ( $\text{AFE} = AF/ \text{PS folha}$ ).

*Análise antioxidante:* Determinada pela quantificação do conteúdo de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), atividade da enzima peroxidase (POD, EC 1.11.1.7) e pelo nível de peroxidação lipídica em cinco amostras por tratamento. As folhas expandidas foram coletadas no último dia do estresse, no primeiro dia da reidratação e no terceiro dia da reidratação do primeiro ciclo de estresse, assim como foram coletadas no segundo ciclo, no último dia de estresse, 24h e 72h de reidratação, cujas foram transferidas imediatamente para o nitrogênio líquido, armazenadas em freezer  $-80^\circ\text{C}$  e posteriormente foram maceradas.

O conteúdo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi obtido pelo método determinado por Alexieva et al. (2001). Para a extração do  $\text{H}_2\text{O}_2$  foliar, foram utilizados 200 mg de tecido foliar macerado juntamente com 2 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0,1%. O material foi centrifugado (12.000 rpm) a temperatura ambiente por 15 minutos, em que, 500  $\mu\text{l}$  do sobrenadante foi adicionado a uma solução composta por 500  $\mu\text{l}$  de tampão de fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0) e 2 ml de iodeto de potássio a 1 M, posteriormente incubados no escuro por uma hora em temperatura ambiente. Utilizamos o espectrofotômetro no comprimento de onda 390nm para as leituras de absorvância. Para calcular o conteúdo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi utilizado uma curva padrão preparada com

concentrações conhecidas de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , cujos resultados foram expressos como  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1}$  de MF.

O método empregado para determinação do nível de peroxidação lipídica foi descrito por Heath e Packer (1968), citados por Rami Devi e Prasad (1998). O material vegetal foi moído em 5 ml de 0,25 de ácido tiobarbitúrico (TBA) em 10% de TCA, incubados a  $95^\circ \text{C}$  em banho-maria por uma hora. As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos e a absorbância do sobrenadante foi medida em 560 e 600 nm. Para os cálculos utilizamos o coeficiente de extinção molar do malondialdeído ( $155 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ), cujos resultados foram expressos como (TBARS). $\text{g}^{-1}$  de matéria fresca.

A atividade da POD foi determinada de acordo com as condições citadas pelos autores Teisseire e Guy (2000). O sistema de reação era composto de 30  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático diluído (1:10 em tampão de extração); tampão fosfato de potássio  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 6,5; pirogalol (1,2,3-benzenotriol)  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  e peróxido de hidrogênio  $\text{H}_2\text{O}_2$   $5 \text{ mmol L}^{-1}$  totalizando 1,0 mL. A reação foi conduzida a temperatura ambiente por 5 minutos. A formação de purpurogalina será medida em espectrofotômetro UV-visível a 430 nm, cujo coeficiente de extinção molar de  $2,5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  foi usado para calcular a atividade da enzima POD expressa em  $\mu\text{mol}$  de purpurogalina  $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína, cujo conteúdo de proteínas solúveis totais foi obtido com base no método descrito por Bradford (1976).

O conteúdo de proteínas solúveis totais descrito por Bradford (1976) foi dissolvido 100 mg de *comassie brilliant blue* G-250 em 50 ml de etanol 95%, seguido da adição de 100 ml de ácido fosfórico 85%. A solução foi dissolvida em  $\text{H}_2\text{O}$  deionizada até completar 1 L, agitada e filtrada duas vezes em papel filtro. O meio de reação utilizado para determinar o conteúdo de proteínas foi formado pela adição de 2.5 ml da solução de Bradford em tubos de ensaio de 5 ml contendo 50  $\mu\text{l}$  do extrato bruto descrito anteriormente. Após 15 minutos de reação em temperatura ambiente, o meio de reação foi levado para a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm utilizando cubeta de vidro. Para o branco do aparelho, utilizamos a solução de Bradford sem o extrato bruto. A concentração de proteínas foi determinada por meio de curva padrão utilizando concentrações conhecidas de caseína (0, 20, 40, 60, 80 e 100  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ ). Os resultados obtidos foram utilizados para calcular a atividade específica da enzima antioxidante.

#### 4.5. Análise do perfil transcricional da PIP2;5

*Determinação das AQPs:* Selecionamos a aquaporina PIP2;5 encontrada em folhas e

raízes (Ding et al. 2020 *a,b*).

*Isolamento e quantificação do RNA total:* Houve coleta de folhas fotossinteticamente ativas e completamente expandidas. Cinco amostras foram coletadas por tratamento, sendo congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a extração.

O isolamento do RNA total foi realizado com kit Total RNA Purification (Norgen Biotek) seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, o RNA foi quantificado com NanoDrop, sendo utilizado 1000ng como input para o tratamento com DNase (RQ1 DNase, Promega) e síntese de cDNA. Os perfis de amplificação com e sem tratamento com DNase foram comparados para confirmação da ausência do DNA genômico através de qPCR utilizando o kit GoTaq qPCR mastermix (Promega), com os genes PIP2;5 e PP2A.

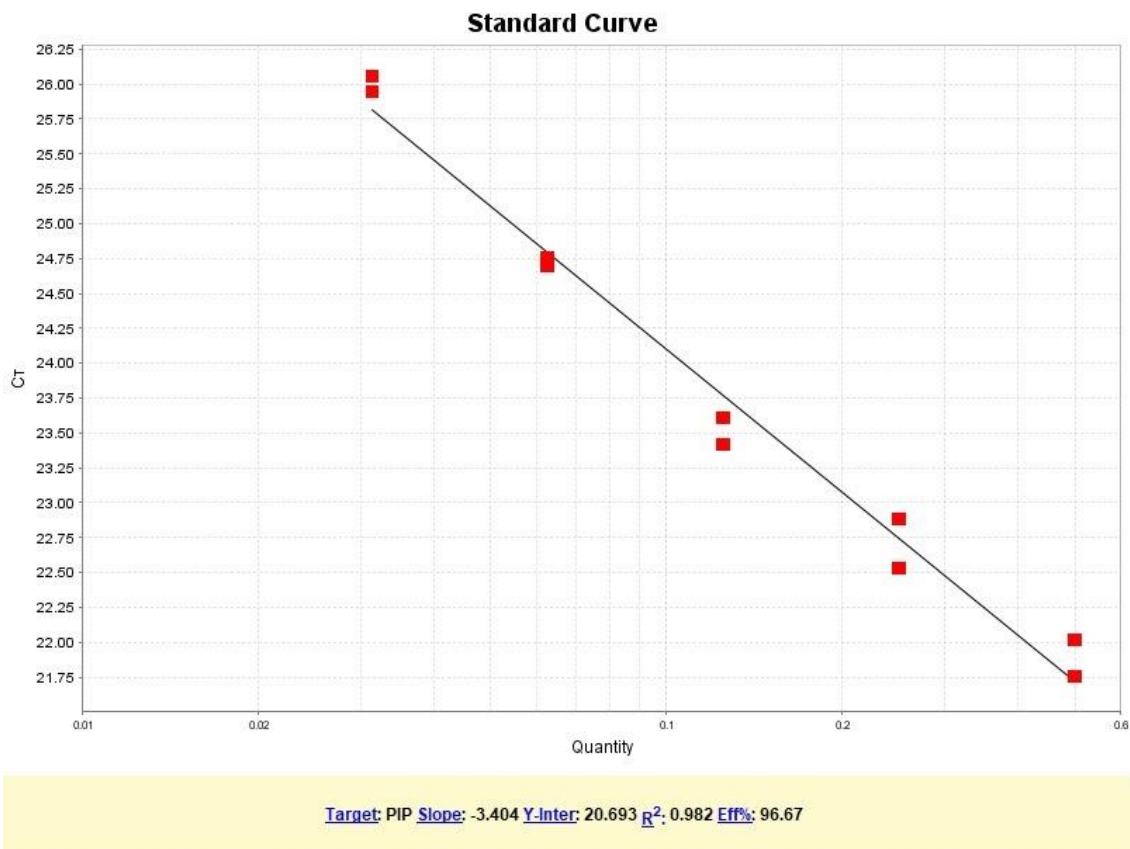
*Síntese de cDNA:* Utilizamos o RNA total, tratado com a enzima DNaseI, para a construção da primeira fita de cDNA. Para cada amostra, foi determinado 5 $\mu\text{L}$  de RNA e a síntese do cDNA foi realizada com o kit GoScript Reverse Transcriptase (Promega) com uso do mix de primers randômicos. Adicionamos ao RNA 1 $\mu\text{L}$  (~1000ng) de primer randômico, seguido de incubação a  $65^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Adicionamos 4 $\mu\text{L}$  *Buffer GoScript*, 9 $\mu\text{L}$  de água e 2 $\mu\text{L}$  da enzima GoScript, exatamente nessa ordem. Novamente incubamos as reações a  $25^{\circ}\text{C}$  por 5 min, em seguida a  $42^{\circ}\text{C}$  por 60 min e finalizamos aquecendo a  $70^{\circ}\text{C}$  por 5 min. Armazenamos as reações a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

*RT-qPCR:* Utilizamos o gene endógeno PP2A (*Serina / treonina-Proteína Fosfatase*) referenciado em Reddy et al., (2016) em contraste com o gene PIP2;5 (Reddy et al., 2015) cujos primers estão descritos na tabela 1 a seguir.

**Tabela 1:** Iniciadores específicos das AQPs selecionados pelos artigos Reddy et al., (2015) e Reddy et al., (2016).

Primer	Sequência	Tm ( $^{\circ}\text{C}$ )	GC %
PIP2;5 FW	5'-TTCAGCCGCTAGATCGACCATC-3'	62.2	54.5
PIP2;5 RV	5'- CATTACGAGTGCAGTGGAGG-3'	61.2	57.1
PP2A FW	5'- AACCCGCAAAACCCAGACTA-3'	61.9	52.3
PP2A RV	5'- TACAGGTCGGGCTCATGGAAC-3'	61.8	57.1

Realizamos uma curva de eficiência dos genes PIP2;5 e PP2A de acordo com as diluições de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32, a partir dos primers, Master Mix, RNA e água (figura 2 e 3). Os genes apresentaram eficiência superior a 90%. Realizamos as reações de amplificação qPCR com o volume final. Foi utilizado 2 $\mu$ L de cDNA puro, 0,4  $\mu$ L de Primer FW e 0,4  $\mu$ L Primer RV dos gene PIP2;5 e PP2A, 5  $\mu$ L de MasterMix e completamos com 2,2  $\mu$ L de água nuclease free. A amplificação ocorreu em termociclador 7500 Fast Real- Time PCR System (Applied Biosystems). A amplificação foi programada para 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 min a 60°C. Todas as reações ocorreram em triplicatas técnicas e possuem uma amostra controle contendo somente água nuclease free. Para análise dos dados, utilizamos o método de cálculo Fold Change baseado em delta delta Ct ( $\Delta\Delta C_t$  - *threshold cycle*) entre tratamento e controle, cujos valores de Log2 Fold Change significativos com T-Test ( $p < 0,05$ ).



**Figura 2:** Curva de eficiência do gene PIP2;5.



**Figura 3:** Curva de eficiência do gene PP2A.

## 5. ANÁLISE DE DADOS

Inicialmente, submetemos os dados ao teste de normalidade, que em seguida foram comparados pela análise de T-Test ou Mann Whitney Rank Sum pelo software SigmaPlot versão 12.5 com significância estatística em  $P < 0,05$ . Os dados da análise antioxidante foram previamente submetidos ao teste de homogeneidade de Anderson Darling, pelo software Minitab Statistical versão 21.1.0 e posteriormente comparados pela análise de T-Test ou Mann Whitney Rank Sum pelo software SigmaPlot versão 12.5 com significância estatística em  $P < 0,05$ . Para o perfil transcricional da PIP2;5 utilizamos o método de quantificação relativa, cujos valores de Log2 Fold Change significativos com T-Test ( $P < 0,05$ ).

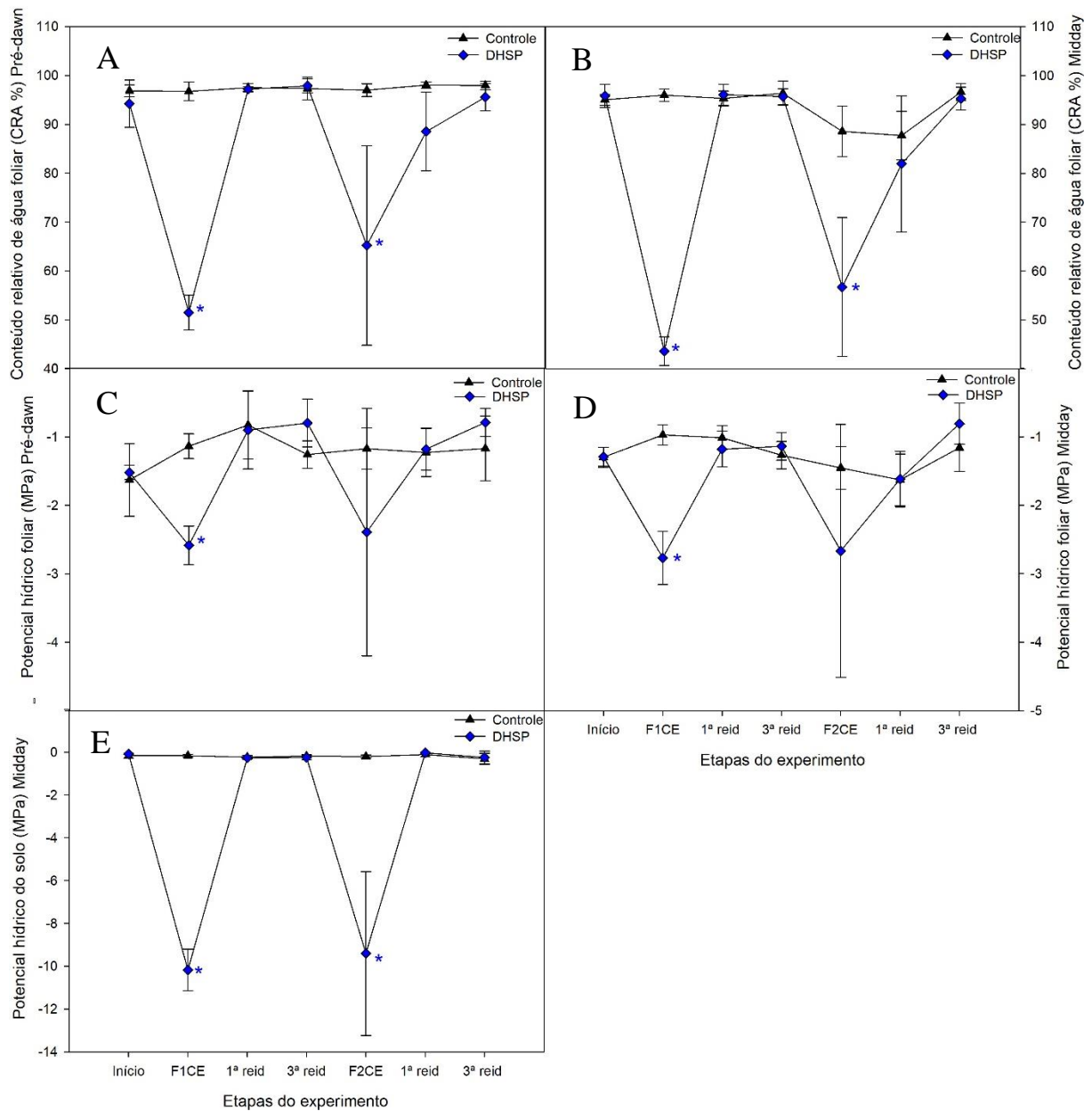
## 6. RESULTADOS

### 6.1. Relações hídricas

Na figura 4, as plantas em DHSP apresentaram menores valores do CRA (%) no final do primeiro e segundo ciclo de deficiência hídrica. Observa-se que nas primeiras 24 horas após a reidratação do primeiro ciclo, tanto pré-manhã (PD) quanto ao meio dia (MD), as plantas em DHSP igualaram-se ao controle, indicando a recuperação após a deficiência hídrica. Na reidratação do segundo ciclo de estresse, somente no 3º dia, os valores das plantas em deficiência se aproximaram das plantas controle.

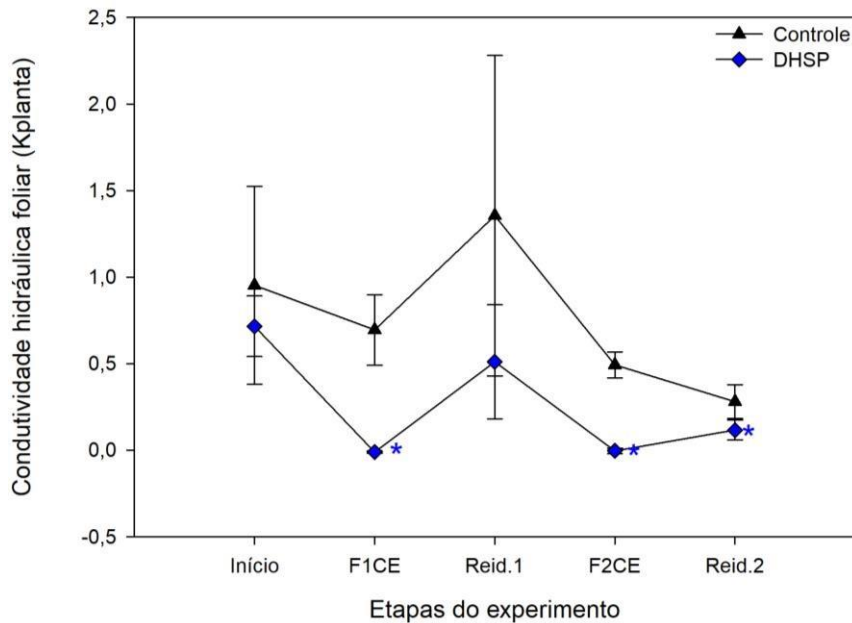
As plantas em DHSP também apresentaram nas restrições hídricas valores menores de  $\Psi_w$  foliar (MPa) PD e MD, em relação ao grupo controle. Nota-se que no terceiro dia da reidratação do primeiro e segundo ciclo, essas apresentaram valores acima do controle, demonstrando recuperação dos potenciais hídricos. O  $\Psi_w$  solo (MPa) revelou queda dos potenciais quando as plantas passaram pela restrição hídrica e a recuperação dos mesmos a partir das reidratações, cujos valores das plantas em DHSP voltaram a igualar-se com o controle, demonstrando estar em capacidade de campo.

Na figura 5, a condutividade hidráulica foliar ( $K_{planta}$ ), demonstra-se afetada nos períodos de estresse, com melhora significativa na primeira reidratação e uma aproximação do grupo controle na segunda reidratação.



**Figura 4:** A e B - Conteúdo relativo de água foliar (CRA %) PD e MD; C e D - Potencial hídrico foliar ( $\Psi_w$  MPa) PD e MD; E - Potencial hídrico do solo ( $\Psi_w$  MPa) dos tratamentos controle e DHSP. Os asteriscos representam diferença estatística em relação ao controle por análise de T-Test ou Mann Whitney Rank Sum ( $p < 0,05$ ).



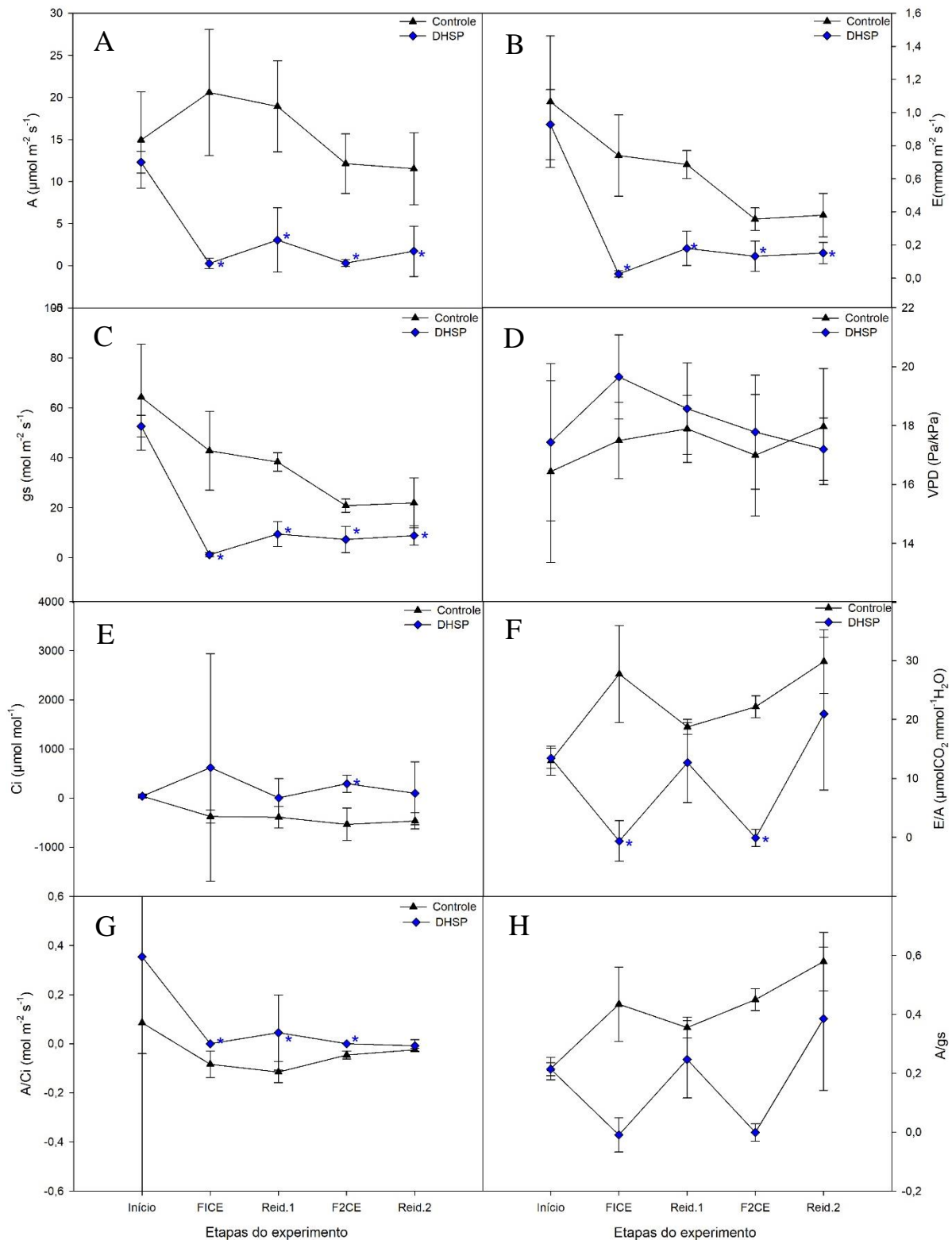


**Figura 5:** Condutividade hidráulica foliar dos tratamentos controle e DHSP. Os asteriscos representam diferença estatística em relação ao controle por análise de T-Test ou Mann Whitney Rank Sum ( $p < 0,05$ ).

## 6.2. Trocas gasosas

A taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$  ( $A_{\text{Net}}$ ), (figura 6 A), demonstra as quedas referentes ao período de restrição hídrica e leves recuperações nos momentos de reidratação. Em relação a taxa de transpiração ( $E$ ) (6 B) no primeiro evento de deficiência hídrica, as plantas em DHSP apresentaram-se segundo cálculo de normalização, 96,7% menor que o controle, reduzindo para 62,9% no segundo evento de deficiência hídrica. Assim como ocorreu nos dois momentos de reidratação, apresentando respectivamente 73,8% e 60,2% menores que o controle. Esse cálculo demonstrou a capacidade de ajuste que as plantas em DHSP possuíram em relação aos dois eventos de restrição hídrica e reidratações. A condutância estomática das plantas em DHSP (gs) na figura 6 C, também sofreu impactos referentes ao período de estresse do primeiro ciclo, evidenciando a queda da condutância e recuperação nas 24 horas após a reidratação. Porém, no segundo período de deficiência, a planta exibe valores próximos ao da primeira reidratação, referindo-se ao controle adquirido diante da situação estressante. Em relação ao déficit de pressão de vapor (VPD) (6 D), observa-se taxas elevadas no F1CE, enquanto apresenta taxas mais amenas e próximas a primeira reidratação no F2CE, e pela primeira vez, valores mais baixos que o controle, na segunda reidratação. A concentração interna de carbono ( $C_i$ ), vista no gráfico 6 E, apresenta valores maiores nos períodos de estresse das plantas em DHSP, que foram reduzidos nos períodos de reidratação. Os cálculos  $E/A$  e  $A/g_s$ , gráficos F e H respectivamente,

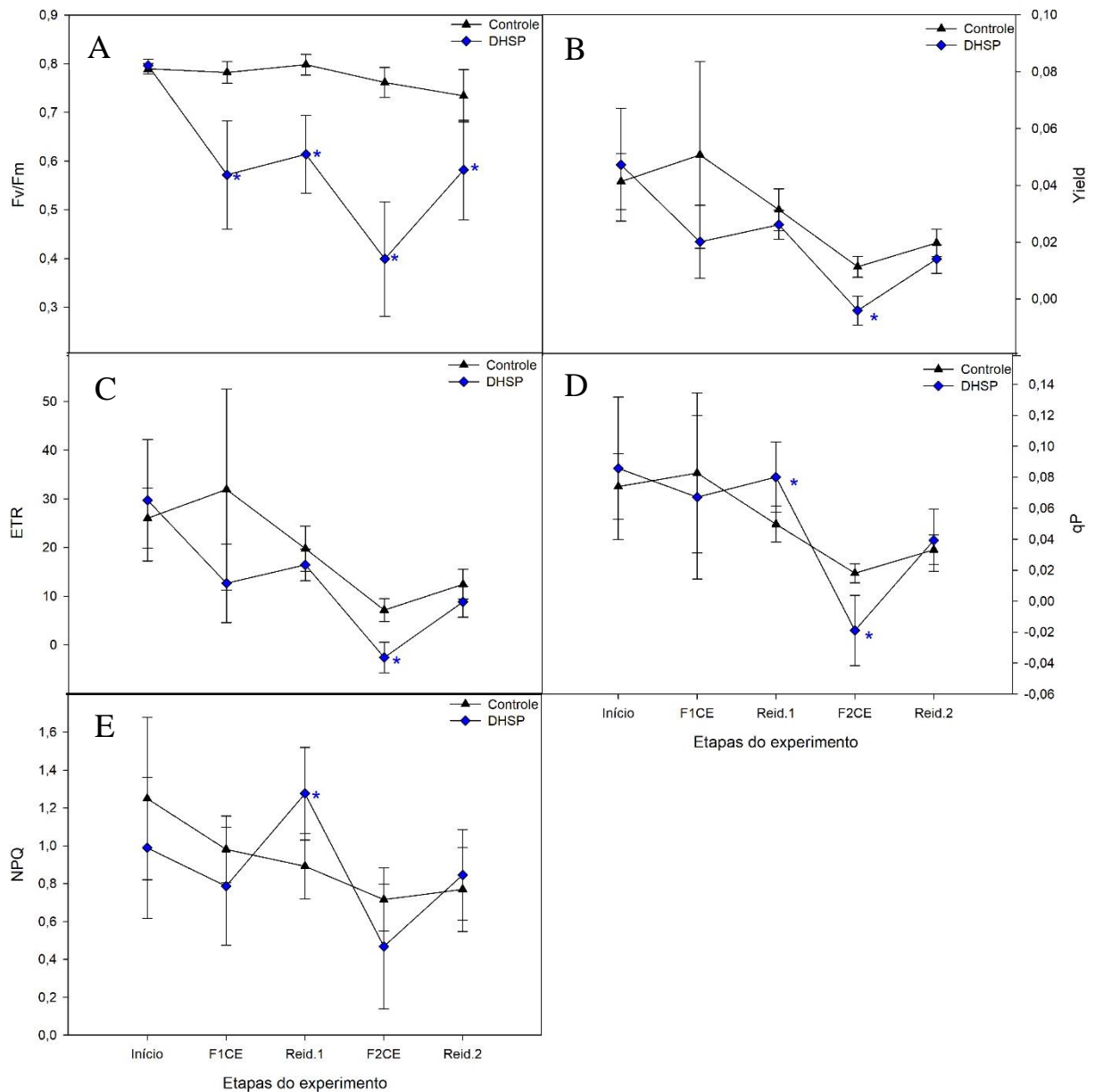
mostraram as plantas em DHSP no primeiro e no segundo ciclo, sofreram quedas referentes aos períodos de deficiência hídrica e apresentaram ascendência na reidratação. Nos gráficos F e H, os valores das plantas em DHSP apresentados na primeira reidratação, alinharam-se com os inícios do experimento e demonstraram valores mais elevados na segunda reidratação. O A/Ci apresentou dados muito semelhantes, tanto nos períodos de restrição, quanto nos momentos de reidratação. Observa-se, no entanto, que no segundo ciclo, seja no momento do déficit ou na reidratação, os valores são mais próximos do que no primeiro ciclo.



**Figura 6:** A - Assimilação de CO<sub>2</sub> ( $A_{Net}$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); B - taxa de transpiração ( $E$ , mmol vapor d'água  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); C - Condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); D - Déficit de pressão de vapor (VPD Pa/kPa); E - Concentração intracelular de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ,  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ); F - Eficiência do uso da água ( $E/A$ ); G - Eficiência aparente de carboxilação ( $A/C_i$ ); H - Eficiência intrínseca do uso da água ( $A/G_s$ ) dos tratamentos controle e DHSP. Os asteriscos representam diferença estatística do tratamento em relação ao controle por análise de T-test ou Mann Whitney Rank Sum ( $p < 0,05$ ).

### 6.3. Fluorescência da clorofila *a*

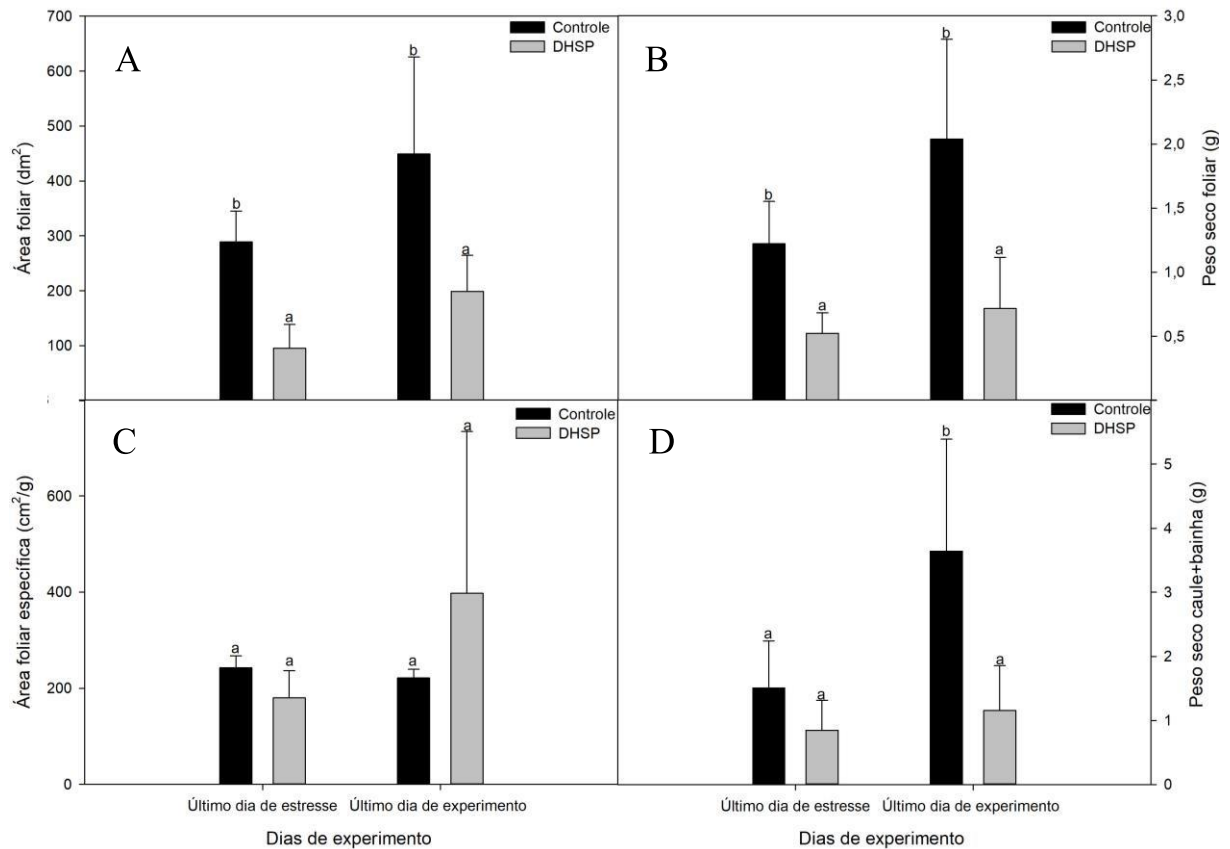
Na figura 7 (A), em relação à eficiência quântica máximo do PSII ( $F_v/F_m$ ), observam-se quedas referentes aos períodos de estresse das plantas em DHSP, principalmente no segundo evento. Os valores referentes à reidratação exibem melhora da eficiência quântica, porém distante do grupo controle. O rendimento quântico efetivo do PSII (Yield) e a taxa de transporte de elétrons (ETR), nas figuras B e C, respectivamente, exibem gráficos bastante semelhantes, apresentando quedas referentes ao período de restrição hídrica e recuperações próximas ao controle, em ambas as reidratações. Na dissipação fotoquímica (qP), observa-se uma leve queda dos valores no F1CE das plantas em DHSP, a recuperação acima do controle nas primeiras 24 horas após a reidratação e uma queda brusca no F2CE, ambos com diferença estatística e posteriormente, recupera-se acima do controle, na segunda reidratação. Quanto a dissipação não-fotoquímica (NPQ), também vemos a queda brusca no segundo período de estresse e recuperações, do primeiro e segundo ciclo, com valores maiores que o grupo controle.



**Figura 7:** A - Eficiência quântica máxima do PSII (Fv/Fm); B - Rendimento quântico efetivo do PSII (Yield); C - Taxa de transporte de elétrons (ETR); D - Dissipação fotoquímica (qP); E - Dissipação não-fotoquímica NPQ dos tratamentos controle e DHSP. Os asteriscos representam diferença estatística do tratamento em relação ao controle por análise de T-test ou Mann Whitney Rank Sum ( $p < 0,05$ ).

#### 6.4. Análise de crescimento

A área foliar (figura 8 A) bem como o peso seco foliar (B), demonstram diferenças estatísticas tanto no momento de deficiência hídrica, quanto na reidratação, diferentemente do que é observado na área foliar específica (C) e peso seco caule+bainha (D). Nota-se que houve um aumento da área foliar, do peso seco foliar e do caule, mas principalmente da área foliar específica quando as plantas em DHSP receberam a reidratação.



**Figura 8:** A - Área foliar (dm<sup>2</sup>); B - Peso seco foliar (g); C - Área foliar específica (cm<sup>2</sup>/g); D - Peso seco caule+bainha (g) dos tratamentos controle e DHSP. Letras diferentes representam diferença estatística do tratamento em relação ao controle por análise de T-test ou Mann Whitney Rank Sum (p<0,05).

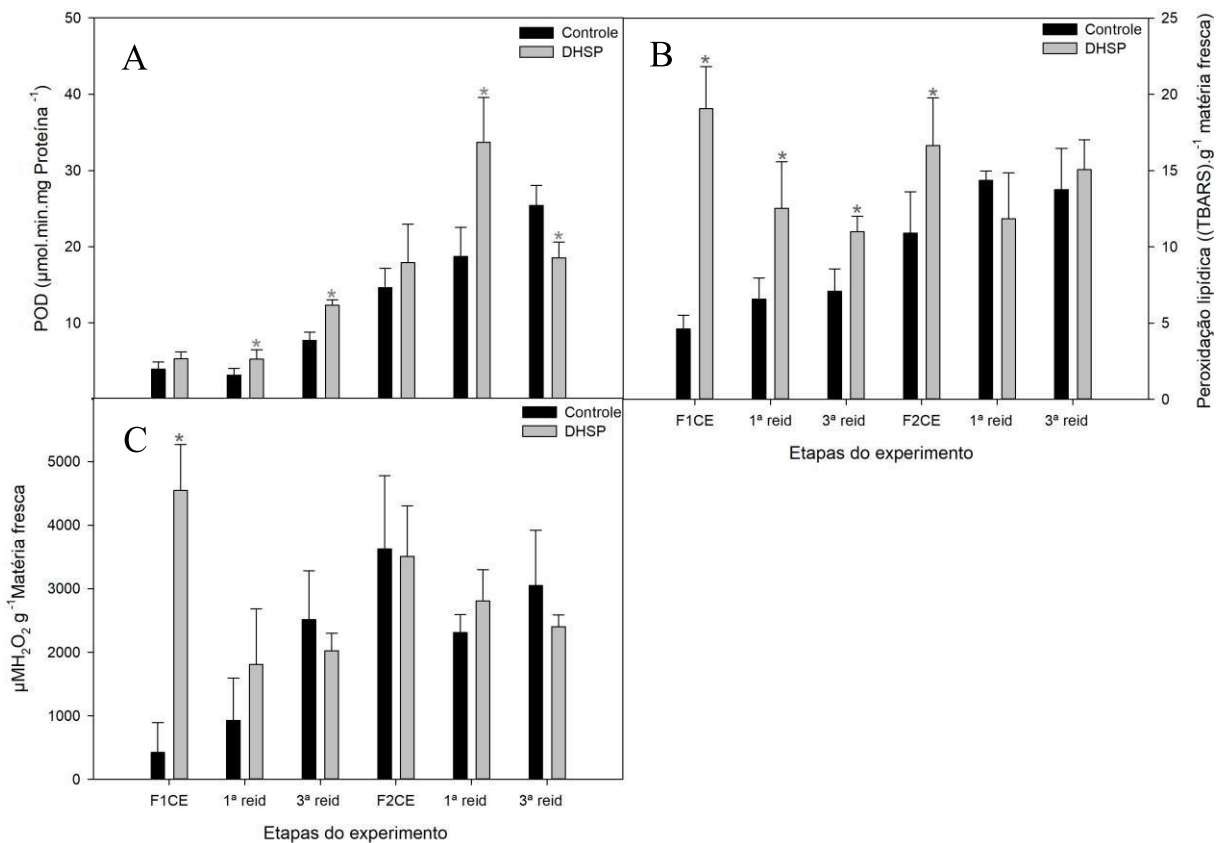
### 6.5. Análise antioxidante

A atividade da enzima POD (figura 9 A) obteve diferenças estatísticas em relação ao grupo controle em ambos os momentos de 24 e 72 horas de reidratação, tanto no primeiro quanto no segundo ciclo de estresse. O tratamento DHSP exibiu concentrações maiores de POD do que o grupo controle em todas as etapas do experimento, apresentando o maior valor nas 24 horas de reidratação do segundo ciclo.

A peroxidação lipídica (figura B) apresentou diferenças estatísticas no primeiro ciclo de estresse (F1CE), 24 e 72 horas após a reidratação e no segundo ciclo de estresse (F2CE), constituindo o F1CE o maior valor de peroxidação exibido durante todo o experimento. Nota-se que nas 24 horas e 72 horas de reidratação do segundo ciclo de estresse, primeiramente o valor do grupo DHSP diminuiu, estando abaixo do controle, e posteriormente, maior que o controle, apresentando valores muito semelhantes e sem diferença estatística, algo que não foi

visto nos momentos anteriores. Também é válido ressaltar que o nível de peroxidação exibido no F2CE é menor que o valor apresentado em F1CE.

Em relação ao conteúdo de  $H_2O_2$  (figura C), a única diferença estatística é representada pelo primeiro ciclo de estresse. Percebe-se que o valor apresentado no F1CE é maior em comparação com o F2CE. Os valores de DHSP logo decaem quando a reidratação é aplicada após o F1CE, estando acima do controle nas 24 horas após a reidratação e estando abaixo do controle nas 72 horas de reidratação do primeiro e no segundo ciclo de estresse. No momento do segundo estresse, os valores dos dois grupos são muito próximos, cujo controle coloca-se um pouco acima do grupo DHSP, enquanto que nas 24 horas após a reidratação, as plantas em DHSP voltam a apresentar um valor acima do controle, que novamente decresce.

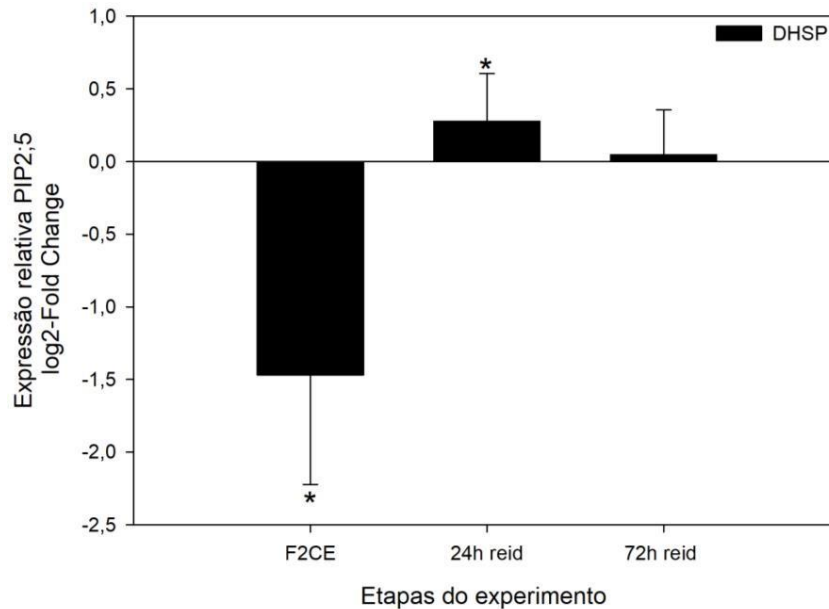


**Figura 9:** A – Atividade da enzima peroxidase (POD) ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}\cdot\text{mg}\text{ proteína}^{-1}$ ); B – Nível de peroxidação lipídica ( $(\text{TBARS})\cdot\text{g}^{-1}\text{ matéria fresca}$ ); C – Conteúdo de  $H_2O_2$  ( $\mu\text{M H}_2\text{O}_2\text{ g}^{-1}\text{ matéria fresca}$ ) dos tratamentos controle e DHSP. Os asteriscos representam diferença estatística do tratamento em relação ao controle por análise de T-test ou Mann Whitney Rank Sum ( $p < 0,05$ ).

### 6.6. Perfil transcricional da PIP2;5

No que se refere ao perfil transcricional foi observado redução da expressão da aquaporina PIP2;5 quando as plantas estavam em deficiência hídrica e aumento da expressão

significativo logo nas primeiras 24 horas após a reidratação. Posteriormente, em 72 horas de reidratação, os níveis de expressão voltam a diminuir, mas não chegam nos patamares apresentados em condições de estresse, como vemos na figura 10.



**Figura 10:** Expressão relativa da aquaporina PIP2;5 nas folhas de *Sorghum bicolor* submetido a deficiência hídrica severa progressiva (DHSP). A expressão do tratamento controle é constante e igual a zero. Os asteriscos representam diferença estatística do tratamento em relação ao controle. Valores positivos indicam aumento da expressão e negativos indicam baixa expressão.

## 7. DISCUSSÃO

Corroborando com a nossa hipótese, os dados indicam a impressão de memória fisiológica ao déficit hídrico, cujas plantas exibem capacidade de ajuste e estratégias diante das condições impostas, graças a reidratação. A expressão da aquaporina PIP2;5 também é afetada negativamente no momento da restrição hídrica, sendo superexpressa na reidratação, contribuindo positivamente no crescimento e nas variáveis de relação hídrica.

Uma das principais restrições ambientais que restringem o desenvolvimento e a produtividade das plantas, é a seca (KUOR et al., 2020). Quando o estresse hídrico ocorre, a fixação geral de carbono e crescimento da planta são reduzidos, prejudicando a produtividade da planta e em casos extremos, a sobrevivência da mesma (PALLIOTTI et al., 2014). Os efeitos do estresse hídrico nas plantas são bem documentados em muitas plantas, porém as respostas à reidratação após o período de estresse hídrico ainda carecem de maiores informações (LIU et al., 2010; LUO et al., 2014; XU; ZHOU; SHIMIZU, 2010).

O déficit de água nos tecidos promovido pela demanda evaporativa ou pelo suprimento de água limitado no solo, afetam todos os aspectos de desenvolvimento e crescimento dos



vegetais (KRIEG, 1993). Torna-se muito importante a regulação da abertura estomática, na finalidade de mitigar danos provocados nos tecidos, de acordo com a baixa reserva de água nas folhas e a taxa de transpiração (FERREIRA, 1997). Com base nessas informações, a condutância estomática das plantas que estavam em déficit hídrico foi afetada negativamente, no primeiro evento de estresse, assim como a taxa de transpiração. O fechamento dos estômatos como tentativa de manter o conteúdo hídrico por maior tempo possível é uma das primeiras estratégias de defesa contra a dessecação. A diminuição da abertura do poro estomático, entretanto, limita a troca de gases entre a atmosfera e o interior foliar, provocando redução na taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> (KRIEG, 1993; LARCHER; DE ASSIS PRADO, 2000), o que também foi evidenciado em nosso trabalho.

O aumento do déficit de pressão de vapor, observado no momento de estresse das plantas em DHSP, é justificado pela redução do fluxo de vapor de água do interior da câmara sub-estomática para a atmosfera, o que promove redução na transpiração (GUCCI et al., 1996; THOMAS; EAMUS; SHANAHAN, 2000). Nogueira et al., (2001) observaram que a redução na taxa de transpiração provocada pelo fechamento parcial ou total dos estômatos em acerolas submetidas a estresse hídrico, foi mais influenciada pelo potencial hídrico foliar do que por outros fatores, como temperatura do ar e umidade relativa. O potencial hídrico da folha também diminui com a redução da disponibilidade de água no solo, o que promove a perda da turgescência e o fechamento estomático (MANSUR; NOGUEIRA; BARBOSA, 2000), que também é evidenciado neste estudo.

Plantas submetidas a eventos recorrentes de deficiência hídrica tendem a apresentar como estratégia a economia no uso da água durante o período de restrição hídrica, diferentemente do que é observado em plantas hidratadas, cuja a absorção de água satisfaz a demanda por evaporação (GIMENEZ; GALLARDO; THOMPSON, 2005). A economia de água está ligada ao conceito de “biological water saving”, cujas plantas exploram todo seu potencial fisiológico, mantendo um alto desempenho e produção mesmo sob condições de menor disponibilidade hídrica (WANG; CHEN; XIANG, 2007).

A memória ao estresse é observada quando a planta submetida ao segundo evento de deficiência hídrica, apresenta respostas que culminam no aumento da tolerância em relação a uma planta que experimenta o déficit pela primeira vez (BRUCE et al., 2007; WALTER et al., 2011; WALTER et al., 2013). Um trabalho realizado com sorgo sob condições de estresse hídrico recorrente apresentou memória no conteúdo relativo de água foliar, nas trocas gasosas

( $E$ , gs), na peroxidação lipídica e no conteúdo de  $H_2O_2$  (MANTOAN et al., 2020). Com base na definição e corroborando os dados com o estudo apresentado, as plantas em DHSP mostraram este padrão de resposta frente ao segundo evento de deficiência hídrica, consistindo na melhora dos dados de CRA (%),  $\Psi_w$  foliar MD e PD (MPa),  $E$ , gs, peroxidação lipídica e  $H_2O_2$ .

A estratégia de economia de água refletiu também na queda da assimilação de  $CO_2$ , eficiência do uso da água ( $A/E$ ) e eficiência intrínseca do uso da água ( $A/g_s$ ). Esse controle da perda de água provoca mudanças na incorporação do  $CO_2$  no ciclo de Calvin-Benson, nas plantas que foram submetidas a deficiência hídrica. A interpretação dessas repostas estomáticas, atrelada as variações fisiológicas e ambientais da planta, permite entender a tolerância ao estresse, gerado pela deficiência hídrica, levando em consideração que os estômatos possuem papel fundamental nas trocas gasosas, promovendo a interferência no balanço entre a água perdida e carbono assimilado (LIN et al., 2018).

O estresse hídrico influencia no nível de peroxidação e no acúmulo de  $H_2O_2$  (MIRZAI; MOEINI; GHANATI, 2013; RAI; SINGH; SHAH, 2012). Sob estresse hídrico severo, a alfafa apresentou aumento de peróxido de hidrogênio (IRIGOYEN; EMERICH; SÁNCHEZ-DÍAZ, 1992), da mesma forma que a espécie *Cistus albidus* sob estresse hídrico também evidenciou aumento das concentrações de  $H_2O_2$  (JUBANY-MARÍ et al., 2009), que corroboram com os nossos resultados.

O  $H_2O_2$  em baixas concentrações atua como molécula sinalizadora envolvida na aclimatação, promovendo a tolerância a vários estresses bióticos e abióticos e em altas concentrações leva à morte celular programada (QUAN et al., 2008). O peróxido de hidrogênio também atua como regulador chave em diversos processos fisiológicos como o crescimento e desenvolvimento (FOREMAN et al., 2003), fotorrespiração e fotossíntese (NOCTOR; FOYER, 1998), movimento estomático (BRIGHT et al., 2006) e senescência (PENG et al., 2005). O  $H_2O_2$  está começando a ser aceito como um mensageiro secundário para os sinais gerados pelas ERO, devido a sua vida relativamente longa com alta permeabilidade por meio das membranas plasmáticas (QUAN et al., 2008).

O acúmulo das espécies reativas de oxigênio danificam as células e causam deterioração das membranas, que em casos graves leva à morte do vegetal. Para a eliminação de ERO a planta faz uso das enzimas SOD, POD e CAT (SHAWON et al., 2020), sendo que o nível dessas enzimas, submetidas a diversos tipos de estresses ambientais, são mais elevados em espécies tolerantes do que em espécies sensíveis (BOR; ÖZDEMIR; TÜRKAN, 2003; DEMIRAL;

TÜRKAN, 2005; TÜRKAN et al., 2005). A POD além de estar relacionada com a eliminação de  $H_2O_2$ , também está envolvida no crescimento, desenvolvimento, lenhificação, suberificação e reticulação dos componentes da parede celular (PASSARDI et al., 2005). Plantas tolerantes à restrição hídrica geralmente têm maior atividade da enzima POD do que as plantas sensíveis em condições de estresse, como o feijão (TÜRKAN et al., 2005), girassol e sorgo (ZHANG, J; KIRKHAM, 1996).

Assim como no nosso trabalho, o trigo também apresentou aumento da atividade da enzima POD sob estresse hídrico (ZHANG; KIRKHAM, 1994). Um padrão bastante parecido com o que foi apresentado pelo sorgo foi observado no carvalho, que primeiramente indicou um aumento da atividade da enzima POD durante o estresse contínuo de seca e também aumentou após a reidratação (XIONG et al., 2021). Em outro trabalho com a espécie *Portulaca oleracea*, cuja duração de estresse hídrico foi entre 15 à 22 dias, a atividade da POD aumentou significativamente e na reidratação ainda estava acima do controle, em que somente no intervalo de um para três dias de reidratação, tal atividade foi reduzindo gradualmente, indicando que o metabolismo dessas espécies reativas de oxigênio voltaram ao nível do controle (JIN et al., 2015), assim como apresentado no nosso trabalho, onde nas 72 horas após a reidratação, os níveis estavam mais baixos que o controle.

Altos níveis de peroxidação lipídica, justificando os nossos resultados, também foram observados em *Maclura pomifera* ao passar pelo estresse hídrico (KHALEGHI et al., 2019) assim como em arroz (ALHARBI; ABDULMAJEED; HASSAN, 2021), espécies de *Achillea* (GHARIBI et al., 2016), no gênero *Avena* (PANDEY et al., 2010) na alfafa (IRIGOYEN; EMERICH; SÁNCHEZ-DÍAZ, 1992) e no trigo (ZHANG; KIRKHAM, 1994). Este aumento da peroxidação lipídica é proporcional à intensidade de estresse hídrico e pode ser resultante das reações de espécies reativas de oxigênio (ERO) com moléculas orgânicas contidas nas membranas (GILL; TUTEJA, 2010). As espécies reativas de oxigênio danificam ácidos nucleicos, oxidam proteínas e causam a peroxidação lipídica (FOYER; NOCTOR, 2005).

As respostas da fluorescência da clorofila *a* revelam o nível de excitação de energia dos pigmentos e dependem do balanço entre o fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF) e a soma da taxa de transporte de elétrons (ETR), da dissipação fotoquímica (qP) e não-fotoquímica (NPQ). O aumento dos fótons promove queda na dissipação fotoquímica e aumento da dissipação não fotoquímica. Esse declínio de qP reflete o estado reduzido do primeiro acceptor de elétrons estável do PSII, a  $Q_A$ , elucidando a capacidade do PSII utilizar energia luminosa para a redução de  $NADP^+$ , indispensável para a assimilação de carbono (GENTY;

BRIANTAIS; BAKER, 1989; MAXWELL; JOHNSON, 2000). Com base nesses conceitos, as plantas em DHSP apresentaram este padrão de declínio e ascensão das taxas de qP e NPQ, nas figuras 7 D e E, respectivamente.

De acordo com Bolhàr-Nordenkamp et al. (1989) o rendimento quântico máximo do PSII (Fv/Fm) quando uma planta não está submetida ao estresse deve ser entre 0,75 a 0,85 o que vemos no grupo controle, no gráfico 5 (A). Nas plantas em DHSP, baixos valores de Fv/Fm (Figura 7 A), Yield (7 B), ETR (7 C) e qP (7 D), demonstram supraexcitação do sistema fotoquímico (SOUZA et al., 2004), resultando em danos no aparato fotossintético (MANTOAN; FERREIRA; BOARO, 2015) e redução na eficiência operacional do PSII (BAKER, 2008). Walter et al., (2011) também demonstraram a redução de Fv/Fm sob condição de estresse hídrico, cuja redução relaciona-se principalmente com as taxas reduzidas de fluorescência máxima, indicando dissipação de energia para evitar fotodanos. Prejuízos na etapa fotoquímica durante o estresse hídrico em sorgo também foram vistas em outros estudos (FRACASSO; TRINDADE; AMADUCCI, 2016). Isto nos permite afirmar que prejuízos no metabolismo fotoquímico juntamente com a limitação estomática (baixa gs – figura 6 C), vista no primeiro ciclo de estresse, contribuem para a redução da fotossíntese no sorgo sob estresse hídrico severo.

O estresse hídrico severo progressivo promoveu o aumento de Ci enquanto a taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> continuava em declínio, como podemos constatar na figura 6 (A e E). A diminuição da assimilação é consequência da redução da disponibilidade de água (CARMO-SILVA et al., 2007) e da eficiência fotoquímica (WALTER et al., 2011), verificados em plantas do tratamento de DHSP (Figuras 4 A, B, C e D; 7 A), fazendo com que a energia da luz incidente não fosse utilizada para a fixação de CO<sub>2</sub> na situação de déficit hídrico (ZEGADA-LIZARAZU; MONTI, 2013), resultando no acúmulo de CO<sub>2</sub>.

Quanto aos nossos resultados da expressão da aquaporina PIP2;5, em um estudo realizado com tomate, a aquaporina PIP2;5 foi avaliada sob condições de seca, apresentando diminuição da expressão, demonstrando-se sensível ao estresse (LI et al., 2016), assim como em outro trabalho realizado com arroz, cuja PIP2;5 teve sua expressão diminuída ao passar pela deficiência (ALHARBI; ABDULMAJEED; HASSAN, 2021). Essa diminuição da expressão durante o estresse hídrico pode acontecer para evitar perdas excessivas de água durante a desidratação (HACHEZ et al., 2008).

Alexandersson et al., (2005) e Galmés; Medrano; Flexas (2007b) também observaram

aumento da expressão das aquaporinas PIP1 e PIP2 nas folhas durante a recuperação do estresse hídrico, enfatizando o papel dessas proteínas na etapa de recuperação. Kaldenhoff e Fischer (2006) ressaltam que as PIP2 são mais eficientes no transporte de água. Secchi et al., (2009) demonstra que a PIP2;5 funciona como um canal de água e por isso, desempenha uma função nas relações hídricas da planta. Desse modo, a superexpressão da PIP2;5 após 24 horas de reidratação contribuiu para recuperação hídrica efetiva (figura 4), melhorando o movimento de água entre os tecidos.

A aquaporina PIP2;5 apresenta-se como um gene candidato para investigações mais aprofundadas sobre o seu papel na regulação do movimento da água célula a célula durante condições de déficit hídrico, já que não respondem só a seca. Em condições de estresse hídrico moderado e severo, os níveis de expressão dessa aquaporina aumentaram quase quatro vezes em *P. balsamifera* enquanto reduziram em *P. simonii* × *balsamifera*. Este fato indica que a PIP2;5 pode estar relacionada com a regulação da condutividade hidráulica foliar (figura 5) e nas respostas estomáticas (figura 6 C) (ALMEIDA-RODRIGUEZ et al., 2010).

A impressão da marca do estresse exerce um papel positivo quando refere-se as populações vegetais em condições estressantes e também na conservação de espécies *in situ* (CHINNUSAMY; ZHU, 2009), pois aumenta a resiliência e pode diminuir a mortalidade dos indivíduos em momentos de restrição hídrica (WALTER et al., 2013). Paralelamente a isso, é possível que exista consequências para as plantas que exibem a impressão do estresse, cujas consequências carecem de maiores esclarecimentos (WALTER et al., 2013). Segundo Chinnusamy e Zhu (2009) e Skiryicz e Inzé (2010), o possível efeito negativo dessa impressão do estresse seria a redução do crescimento das plantas, impedindo que estas alcancem o seu potencial máximo de crescimento. Neste sentido, este estudo demonstrou que as plantas de *S. bicolor* submetidas a deficiência hídrica severa progressiva (DHSP) apresentaram diminuição dos valores de área foliar, peso seco foliar e peso seco do caule+bainha (figura 8) em relação ao grupo controle, cuja diferença entre os dois tratamentos é preservada mesmo na reidratação. Tais resultados mostram que eventos recorrentes de seca influenciam negativamente o acúmulo de massa seca na espécie, corroborando com os autores Chinnusamy e Zhu (2009) e Skiryicz e Inzé (2010).

Abdallah et al., (2017) também observaram a redução na massa seca total da parte aérea nas plantas que passaram previamente pelo déficit hídrico em relação as plantas controle. Entretanto, o valor de área foliar praticamente dobrado e a área foliar específica apresentando valores maiores que o controle na reidratação representam o crescimento e indicam retorno da

expansão foliar (RODRÍGUEZ et al., 2005). Correlacionando o papel das AQPs no crescimento foliar, sabemos que o movimento de água é necessário para que o crescimento ocorra (KALDENHOFF et al., 2008), cujos estudos com mutantes superexpressando AQPs mostram aumento no crescimento (AHARON et al., 2003; KELLY et al., 2014), cuja superexpressão da PIP2;5 neste trabalho é observada nas 24 horas de reidratação.

## 8. CONCLUSÃO

Nosso estudo apresenta as respostas fisiológicas ocorridas em *S. bicolor* (L.) Moench durante dois ciclos de deficiência hídrica e subsequentes reidratações atrelando a expressão do gene PIP2;5. Nossa hipótese de impressão de memória fisiológica a partir da deficiência hídrica severa progressiva recorrente, assim como a redução e superexpressão da aquaporina PIP2;5 nos momentos de déficit e reidratação, respectivamente, foram corroboradas. As plantas em DHSP demonstraram capacidade de ajuste frente a deficiência e recuperação nos momentos de reidratação, exibindo a estratégia de economia do uso da água e a tolerância adquirida e aplicada no segundo evento. Isto evidencia a memória fisiológica gerada no primeiro evento de estresse, que induz respostas no segundo evento e dessa forma, apresenta dados menos sensibilizados pelo segundo evento de deficiência hídrica. Quanto a expressão da aquaporina houve redução no período estressante na tentativa de mitigar os danos durante a falta de água e a superexpressão assim que a reidratação foi aplicada, auxiliando na recuperação das variáveis hídricas e de crescimento. Ainda são escassos os trabalhos que conciliem a expressão das AQPse as variáveis fisiológicas. Dessa forma, a correlação e a interpretação dos dados ainda carecem de mais estudos para sanar quaisquer lacunas que essas variáveis possam apresentar.

## REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, M. B. et al. Drought priming improves subsequent more severe drought in a drought-sensitive cultivar of olive cv. Chétoui. **Scientia horticultrae**, v. 221, p. 43-52, 2017.
- AFZAL, Z. et al. The roles of aquaporins in plant stress responses. **Journal of developmental biology**, v. 4, n. 1, p. 9, 2016.
- AHARON, R. et al. 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**, v. 15, n. 2, p. 439-447, 2003.
- ALEXANDERSSON, E. et al. Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. **Plant molecular biology**, v. 59, n. 3, p. 469-484, 2005.
- ALEXIEVA, V. et al. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell & Environment**, v. 24, n. 12, p. 1337-1344, 2001.
- ALHARBI, B. M.; ABDULMAJEED, A. M.; HASSAN, H. Biochemical and Molecular Effects Induced by Triaccontanol in Acquired Tolerance of Rice to Drought Stress. **Genes**, v. 12, n. 8, p. 1119, 2021.
- ALMEIDA-RODRIGUEZ, A.M. et al. Functional characterization of drought-responsive aquaporins in *Populus balsamifera* and *Populus simonii* × *balsamifera* clones with different drought resistance strategies. **Physiologia Plantarum**, v. 140, n. 4, p. 321-333, 2010.
- ALVES, R.D.F.B. et al. Evidence of drought memory in *Dipteryx alata* indicates differential acclimation of plants to savanna conditions. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-16, 2020.
- ARIANI, A.; GEPTS, P. Genome-wide identification and characterization of aquaporin gene family in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Molecular genetics and genomics**, v. 290, n.5, p. 1771-1785, 2015.
- AROCA, R.; PORCEL, R.; RUIZ-LOZANO, J. M. Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 1, p. 43-57, 2012.
- ASHRAF, MHPJC.; HARRIS, P.JC. Photosynthesis under stressful environments: an overview. **Photosynthetica**, v. 51, n. 2, p. 163-190, 2013.
- AVRAMOVA, Z. Transcriptional ‘memory’ of a stress: transient chromatin and memory (epigenetic) marks at stress-response genes. **The Plant Journal**, v. 83, n. 1, p. 149-159, 2015.



- AYADI, M.; BRINI, F.; MASMOUDI, K. Overexpression of a wheat aquaporin gene, TdPIP2; 1, enhances salt and drought tolerance in transgenic durum wheat cv. Maali. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 10, p. 2389, 2019.
- BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 59, p. 89-113, 2008.
- BALUŠKA, F.; GAGLIANO, M.; WITZANY, G. **Memory and Learning in Plants**. 1. ed. Cham: Springer International Publishing, 2018.
- BANNING, N. C.; MURPHY, D.V. Effect of heat-induced disturbance on microbial biomass and activity in forest soil and the relationship between disturbance effects and microbial community structure. **Applied Soil Ecology**, v. 40, n. 1, p. 109-119, 2008.
- BATISTA, P. S. C. et al. Performance of grain sorghum hybrids under drought stress using GGE biplot analyses. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto v.16, p.1-12, 2017.
- BOLHAR-NORDENKAMPF, H. R. et al. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. **Functional Ecology**, p. 497-514, 1989.
- BOR, M.; ÖZDEMİR, F.; TÜRKAN, I. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. **Plant Science**, v. 164, n. 1, p. 77-84, 2003.
- BOURSIAC, Y. et al. Early effects of salinity on water transport in *Arabidopsis* roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. **Plant physiology**, v. 139, n. 2, p. 790-805, 2005.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRIGHT, J. et al. ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesis. **The Plant Journal**, v. 45, n. 1, p. 113-122, 2006.
- BRUCE, T. J. A et al. Stressful “memories” of plants: evidence and possible mechanisms. **Plant science**, v. 173, n. 6, p. 603-608, 2007.

- CHAUMONT, F.; TYERMAN, S. D. Aquaporins: highly regulated channels controlling plant water relations. **Plant physiology**, v. 164, n. 4, p. 1600-1618, 2014.
- CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of botany**, v. 103, n. 4, p. 551–560, 2009.
- CHAVES, M. M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA, J. S. Understanding plant responses to drought — from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, v. 30, n. 3, p. 239–264, 2003.
- CHINNUSAMY, V.; ZHU, J.-K. Epigenetic regulation of stress responses in plants. **Current opinion in plant biology**, v. 12, n. 2, p. 133–139, 2009.
- CONRATH, U. et al. Priming: getting ready for battle. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 19, n. 10, p. 1062-1071, 2006.
- CRISP, P.A. et al. Reconsidering plant memory: Intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. **Science advances**, v. 2, n. 2, p. e1501340, 2016.
- DA SILVA, M. D. et al. Expression analysis of sugarcane aquaporin genes under water deficit. **Journal of nucleic acids**, p. 1-14, 2013.
- DEMIRAL, T.; TÜRKAN, I. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. **Environmental and experimental botany**, v. 53, n. 3, p. 247-257, 2005.
- DEVI, S. R.; PRASAD, M. N. V. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: response of antioxidant enzymes and antioxidants. **Plant science**, v. 138, n. 2, p. 157-165, 1998.
- DING, L. et al. Modification of the expression of the aquaporin ZmPIP2;5 affects water relations and plant growth. **Plant physiology**, v. 182, n. 4, p. 2154-2165, 2020a.
- DING, L.; CHAUMONT, F. Aquaporin mediating stomatal closure is associated with water conservation under mild water deficit. **bioRxiv**, 2020b.
- ELSHEERY, N.I.; CAO, K-F. Gas exchange, chlorophyll fluorescence, and osmotic adjustment in two mango cultivars under drought stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 6, p. 769-777, 2008.
- ENNAHLI, S.; EARL, H. J. Physiological Limitations to Photosynthetic Carbon Assimilation in Cotton under Water Stress. **Crop Science**, v. 45, n. 6, p. 2374–2382, 2005.

- FERREIRA, V. M. et al. Relações hídricas em dois genótipos de milho (*Zea mays* L.) em função da disponibilidade de água no solo. In: **Embrapa Milho e Sorgo-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 6., 1996, Belém. Resumos. Belém: SBFV: EMBRAPA-CPATU, 1997. p. 317., 1997.
- FLETA-SORIANO, E.; MUNNÉ-BOSCH, S. Stress memory and the inevitable effects of drought: a physiological perspective. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 143, 2016.
- FLEXAS, J. et al. Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. **Physiologia Plantarum**, v. 127, n. 3, p. 343-352, 2006.
- FLEXAS, J.; ESCALONA, J.; MEDRANO, H. Water stress induces different levels of photosynthesis and electron transport rate regulation in grapevines. **Plant, Cell and Environment**, v. 22, n. 1, p. 39–48, 1999.
- FOREMAN, J. et al. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. **Nature**, v. 422, n. 6930, p. 442-446, 2003.
- FOYER, C. H.; LELANDAIS, M.; KUNERT, K. J. Photooxidative stress in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 92, n. 4, p. 696–717, 1994.
- FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **The Plant Cell**, v. 17, n. 7, p.1866-1875, 2005.
- FRACASSO, A.; TRINDADE, L.; AMADUCCI, S. Drought tolerance strategies highlighted by two *Sorghum bicolor* races in a dry-down experiment. **Journal of plant physiology**, v. 190, p. 1-14, 2016.
- GAGLIANO, M. et al. Experience teaches plants to learn faster and forget slower in environments where it matters. **Oecologia**, v. 175, n. 1, p. 63-72, 2014.
- GALMÉS, J. et al. Aquaporin expression in response to different water stress intensities and recovery in Richter-110 (*Vitis* sp.): relationship with ecophysiological status. **Planta**, v. 226, n. 3, p. 671-681, 2007a.
- GALMÉS, J. et al. Variation in Rubisco content and activity under variable climatic factors. **Photosynthesis research**, v. 117, n. 1, p. 73-90, 2013.
- GALMÉS, J.; MEDRANO, H.; FLEXAS, J. Photosynthetic limitations in response to water

- stress and recovery in Mediterranean plants with different growth forms. **New phytologist**, v. 175, n. 1, p. 81-93, 2007b.
- GASPAR, M. Aquaporinas: de canais de água a transportadores multifuncionais em plantas. **Brazilian Journal of Botany**, v. 34, p. 481-491, 2011.
- GASPAR, T. et al. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. **Plant growth regulation**, v. 37, n. 3, p. 263-285, 2002.
- GENTY, B.; BRIANTAIS, J-M.; BAKER, N. R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 990, n. 1, p. 87-92, 1989.
- GHARIBI, S. et al. Effect of drought stress on total phenolic, lipid peroxidation, and antioxidant activity of *Achillea* species. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 178, n. 4, p. 796-809, 2016.
- GILBERT, M. E.; MEDINA, V. Drought Adaptation Mechanisms Should Guide Experimental Design. **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 8, p. 639–647, 2016.
- GILL, S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.
- GIMENEZ, C.; GALLARDO, M.; THOMPSON, R. Plant–Water Relations. In: HILLEL, D.; HATFIELD, J. L.; POWLSON, D. S.; ROSENZWEIG, C.; SCOW, K. M.; SINGER, M. J.;
- GOH, C-H. et al. Photosynthesis and environments: photoinhibition and repair mechanisms in plants. **Journal of Plant Biology**, v. 55, n. 2, p. 93-101, 2012.
- GRONDIN, A. et al. Aquaporins contribute to ABA-triggered stomatal closure through OST1-mediated phosphorylation. **The Plant Cell**, v. 27, n. 7, p. 1945-1954, 2015.
- GUCCI, R. et al. The Effect of drought and vapour pressure deficit on gas exchange of young kiwifruit (*Actinidia deliciosa* var. *deliciosa*) vines. **Annals of Botany**, v. 77, n. 6, p. 605-613, 1996.
- SPARKS, D. L. (Eds.). **Encyclopedia of Soils in the Environment**. [s.l.] Elsevier, p. 231–238, 2005.
- HACHEZ, C. et al. The expression pattern of plasma membrane aquaporins in maize leaf highlights their role in hydraulic regulation. **Plant molecular biology**, v. 68, n. 4-5, p. 337, 2008.

HASANUZZAMAN, M. et al. Drought stress responses in plants, oxidative stress, and antioxidant defense. **Climate change and plant abiotic stress tolerance**, p. 209-250, 2013.

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 125, n.1, p. 189-198, 1968.

HEINEN, R. B. et al. Expression and characterization of plasma membrane aquaporins in stomatal complexes of *Zea mays*. **Plant Molecular Biology**, v. 86, n. 3, p. 335-350, 2014.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. **Circular. California agricultural experiment station**, v. 347, n. 2nd edit, 1950.

IRIGOYEN, J. J.; EMERICH, D. W.; SÁNCHEZ-DÍAZ, M. Alfalfa leaf senescence induced by drought stress: photosynthesis, hydrogen peroxide metabolism, lipid peroxidation and ethylene evolution. **Physiologia Plantarum**, v. 84, n. 1, p. 67-72, 1992.

JANG, H-Y. et al. Two aquaporins of *Jatropha* are regulated differentially during drought stress and subsequent recovery. **Journal of plant physiology**, v. 170, n. 11, p. 1028-1038, 2013.

JAVOT, H. et al. Role of a single aquaporin isoform in root water uptake. **The plant cell**, v. 15, n. 2, p. 509-522, 2003.

JIN, R. et al. Physiological changes of purslane (*Portulaca oleracea* L.) after progressive drought stress and rehydration. **Scientia Horticulturae**, v. 194, p. 215-221, 2015.

JOHANSON, U. et al. The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. **Plant physiology**, v. 126, n. 4, p. 1358-1369, 2001.

JUBANY-MARÍ, T. et al. Hydrogen peroxide is involved in the acclimation of the Mediterranean shrub, *Cistus albidus* L., to summer drought. **Journal of experimental botany**, v. 60, n. 1, p. 107-120, 2009.

KALDENHOFF, R. et al. Aquaporins and plant water balance. **Plant, Cell & Environment**, v. 31, n. 5, p. 658-666, 2008.

KALDENHOFF, R. et al. Significance of plasmalemma aquaporins for water-transport in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 14, n. 1, p. 121-128, 1998.

KALDENHOFF, R.; FISCHER, M. J. A. P. Aquaporins in plants. **Acta Physiologica**, v.

187,n. 1-2, p. 169-176, 2006.

KELLY, G. et al. Relationship between hexokinase and the aquaporin PIP1 in the regulation of photosynthesis and plant growth. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e87888, 2014.

KHALEGHI, A. et al. Morphological, physiochemical and antioxidant responses of *Maclura pomifera* to drought stress. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.

KOUR, D. et al. Amelioration of drought stress in Foxtail millet (*Setaria italica* L.) by P-solubilizing drought-tolerant microbes with multifarious plant growth promoting attributes. **Environmental Sustainability**, v. 3, n. 1, p. 23-34, 2020.

KRANNER, I. et al. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. **New Phytologist**, v. 188, n. 3, p. 655-673, 2010.

KRIEG, D. R. Stress tolerance mechanisms in above ground organs. In: **Proceedings of the Workshop on Adaptation of Plants to Soil Stress. Nebraska: INTSORMIL**. p. 65-79, 1993.

KUDOYAROVA, G. R.; KHOLODOVA, V. P.; VESELOV, D. S. Current state of the problem of water relations in plants under water deficit. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 60, n. 2, p. 165-175, 2013.

LAMBERS, H.; CHAPIN, F. S.; PONS, T. L. **Plant physiological ecology**. New York: Springer, 2008.

LARCHER, W. Stress bei Pflanzen. **Naturwissenschaften**, v. 74, n. 4, p. 158–167, 1987.

LARCHER, W.; DE ASSIS PRADO, C. H. B. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMa Artese textos, 2000.

LAWLOR, D. W. Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. **Annals of botany**, v. 89, p. 871–885, 2002.

LEUFEN, G.; NOGA, G.; HUNSCHE, M. Drought stress memory in sugar beet: mismatch between biochemical and physiological parameters. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 35, n. 3, p. 680-689, 2016.

LI, R. et al. Plasma membrane intrinsic proteins SIPIP2; 1, SIPIP2; 7 and SIPIP2; 5 conferring enhanced drought stress tolerance in tomato. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-15, 2016.

LIAN, H-L. et al. The role of aquaporin RWC3 in drought avoidance in rice. **Plant and Cell**

**Physiology**, v. 45, n. 4, p. 481-489, 2004.

LICHTENTHALER, H. K. Vegetation Stress: an Introduction to the Stress Concept in Plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 148, n. 1–2, p. 4–14, 1996.

LIN, C. et al. Diel ecosystem conductance response to vapor pressure deficit is suboptimal and independent of soil moisture. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 250, p. 24-34, 2018.

LIU, C.-C. et al. Influence of drought intensity on the response of six woody karst species subjected to successive cycles of drought and rewatering. **Physiologia plantarum**, v. 139, n. 1, p. 39-54, 2010.

LUO, Y. et al. Photosynthetic performance and growth traits in *Pennisetum centrasiatium* exposed to drought and rewatering under different soil nutrient regimes. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, n. 2, p. 381-388, 2014.

MANSUR, R. J.; NOGUEIRA, C.; BARBOSA, D.C.A. Comportamento fisiológico em plantas jovens de quatro espécies lenhosas da caatinga submetidas a dois ciclos de estresse hídrico. **Phyton**, v. 68, p. 97-106, 2000.

MANTOAN, L. P. B. et al. Rapid dehydration induces long-term water deficit memory in sorghum seedlings: advantages and consequences. **Environmental and Experimental Botany**, v. 180, p. 104252, 2020.

MANTOAN, L. P. B.; FERREIRA, G.; BOARO, C. S. F. Chlorophyll a fluorescence in *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer plants subjected to water stress and after rehydration. **Scientia Horticulturae**, v. 184, p. 23-30, 2015.

MARTINEZ-MEDINA, A. et al. Recognizing plant defense priming. **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 10, p. 818-822, 2016.

MARTRE, P. et al. Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit. **Plant physiology**, v. 130, n. 4, p. 2101-2110, 2002.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. **Journal of experimental botany**, v. 51, n. 345, p. 659-668, 2000.

MIRZAI, M.; MOEINI, A.; GHANATI, F. Effects of drought stress on the lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in two canola (*Brassica napus* L.) cultivars. **Journal Agricultural Science Technology**, 15, 593–602, 2013.

- MOSA, K.A.; ISMAIL, A.; HELMY, M. **Plant stress tolerance: an integrated omics approach**. Cham, Switzerland: Springer, 2017.
- NEPOMUCENO, A. L. et al. Tolerância à seca em plantas: mecanismos fisiológicos e moleculares. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 23, n. 1, p. 12-18, 2001.
- NOCTOR, G.; FOYER, C. H. A re-evaluation of the ATP: NADPH budget during C3 photosynthesis: a contribution from nitrate assimilation and its associated respiratory activity?. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, n. 329, p. 1895-1908, 1998.
- NOGUEIRA, R.J. et al. Alterações na resistência à difusão de vapor das folhas e relações hídricas em aceroleiras submetidas a déficit de água. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 1, p. 75-87, 2001.
- OGLE, K. et al. Quantifying ecological memory in plant and ecosystem processes. **Ecology letters**, v. 18, n. 3, p. 221-235, 2015.
- OGLE, K.; BARBER, J. J. Plant and ecosystem memory. **Chance**, v. 29, n. 2, p. 16-22, 2016. **Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 2, p. 133–139, 2009.
- URAO, T. et al. A transmembrane hybrid-type histidine kinase in Arabidopsis functions as an osmosensor. **The Plant Cell**, v. 11, n. 9, p. 1743-1754, 1999.
- PALLIOTTI, A. et al. Morpho-structural and physiological response of container-grown Sangiovese and Montepulciano cvv.(*Vitis vinifera*) to re-watering after a pre-veraison limiting water deficit. **Functional Plant Biology**, v. 41, n. 6, p. 634-647, 2014.
- PANDEY, H. C. et al. Drought stress induced changes in lipid peroxidation and antioxidant system in genus *Avena*. **Journal of Environmental Biology**, v. 31, n. 4, 2010.
- PARK, W.J.; CAMPBELL, B.T. Aquaporins as targets for stress tolerance in plants: genomic complexity and perspectives. **Turkish Journal of Botany**, v. 39, n. 6, p. 879-886, 2015.
- PASSARDI, F. et al. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. **Plant cell reports**, v. 24, n. 5, p. 255-265, 2005.
- PATERSON, A. H. et al. The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses. **Nature**, v. 457, n. 7229, p. 551-556, 2009.
- PENG, C. L. et al. Response to high temperature in flag leaves of super high-yielding rice Pei'ai 64S/E32 and Liangyoupeijiu. **Rice Sci**, v. 12, 2005.



PINHEIRO, C.; CHAVES, M. M. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data?. **Journal of experimental botany**, v. 62, n. 3, p. 869-882, 2011.

POSTAIRE, O. et al. A PIP1 aquaporin contributes to hydrostatic pressure-induced water transport in both the root and rosette of Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 152, n. 3, p. 1418-1430, 2010.

QUAN, L.-J. et al. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, n. 1, p. 2-18, 2008.

RAI, A. C.; SINGH, M.; SHAH, K. Effect of water withdrawal on formation of free radical, proline accumulation and activities of antioxidant enzymes in ZAT12-transformed transgenic tomato plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 61, p. 108-114, 2012.

RAMÍREZ, D. A. et al. Improving potato drought tolerance through the induction of long-term water stress memory. **Plant Science**, v. 238, p. 26-32, 2015.

REDDY, B.V.S et al. Sorghum genetic enhancement for climate change adaptation. **Crop Adaptation to Climate Change**, v. 46, n. 63.4, p. 1.4, 2011.

REDDY, P. S. et al. Evaluation of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.)] reference genes in various tissues and under abiotic stress conditions for quantitative real-time PCR data normalization. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 529, 2016.

REDDY, P. S. et al. Genome-wide identification and characterization of the aquaporin gene family in *Sorghum bicolor* (L.). **Plant Gene**, v. 1, p. 18-28, 2015.

RIBEIRO, R. V. et al. Proposal of an index of stability for evaluating plant drought memory: A case study in sugarcane. **Journal of Plant Physiology**, v. 260, p. 153397, 2021.

RODRIGUES, O. et al. Aquaporins facilitate hydrogen peroxide entry into guard cells to mediate ABA-and pathogen-triggered stomatal closure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 34, p. 9200-9205, 2017.

RODRÍGUEZ, P. et al. Effects of NaCl salinity and water stress on growth and leaf water relations of *Asteriscus maritimus* plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 53, n.2, p. 113-123, 2005.

ROSA, L. et al. Global agricultural economic water scarcity. **Science Advances**, v. 6, n. 18,

p.eaaz6031, 2020.

SAKAI, A.; LARCHER, W. **Frost survival of plants: responses and adaptation to freezing stress**. Springer Science & Business Media, 2012.

SANTOS, M. G. et al. The role of inorganic phosphate on photosynthesis recovery of common bean after a mild water deficit. **Plant Science**, v. 170, n. 3, p. 659-664, 2006.

SCHAR, C. et al. The role of increasing temperature variability in European summer heatwaves. **Nature**, v. 427, n. 6972, p. 332-336, 2004.

SCHARWIES, J. D.; DINNENY, J. R. Water transport, perception, and response in plants. **Journal of plant research**, v. 132, n. 3, p. 311-324, 2019.

SECCHI, F. et al. Functional analysis of putative genes encoding the PIP2 water channel subfamily in *Populus trichocarpa*. **Tree Physiology**, v. 29, n. 11, p. 1467-1477, 2009.

SHAWON, R. A. et al. Influence of drought stress on bioactive compounds, antioxidant enzymes and glucosinolate contents of Chinese cabbage (*Brassica rapa*). **Food chemistry**, v. 308, p. 125657, 2020.

SIEFRITZ, F. et al. PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: from cellular effects to function in plants. **The Plant Cell**, v. 14, n. 4, p. 869-876, 2002.

SILVA, M. A.; PINCELLI, R. P. Alterações morfofisiológicas na cana-de-açúcar em resposta à deficiência hídrica. **CRUSCIOL, CAC; SILVA, MA; ROSSETO, R.; SORATTO, RP Tópicos em ecofisiologia da cana-de-açúcar. Botucatu: FEPAF–Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais**, p. 43-48, 2010.

SKIRYCYZ, A.; INZÉ, D. More from less: plant growth under limited water. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 197–203, 2010.

SMART, R. E.; BINGHAM, G. E. Rapid estimates of relative water content. **Plant physiology**, v. 53, n. 2, p. 258-260, 1974.

SOUZA, R. P. et al. Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. **Environmental and experimental botany**, v. 51, n. 1, p. 45-56, 2004.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017.

TARDIEU, F.; SIMONNEAU, T. Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric

behaviours. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, n. Special, p. 419–432, 1998.

TEISSEIRE, H.; GUY, V. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). **Plant science**, v. 153, n. 1, p. 65-72, 2000.

THELLIER, M.; LÜTTGE, U. Plant memory: a tentative model. **Plant Biology**, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2013.

THOMAS, D. S.; EAMUS, D.; SHANAHAN, S. Influence of season, drought and xylem ABA on stomatal responses to leaf-to-air vapour pressure difference of trees of the Australian wet-dry tropics. **Australian Journal of Botany**, v. 48, n. 2, p. 143-151, 2000.

TRENBERTH, K. E. et al. The changing character of precipitation. **Bulletin of the American Meteorological Society**, v. 84, n. 9, p. 1205-1218, 2003.

TREWAVAS, A. Aspects of plant intelligence. **Annals of botany**, v. 92, n. 1, p. 1-20, 2003.

TSUDA, M.; TYREE, M. T. Plant hydraulic conductance measured by the high pressure flow meter in crop plants. **Journal of experimental botany**, v. 51, n. 345, p. 823-828, 2000.

TÜRKAN, I. et al. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. **Plant Science**, v. 168, n. 1, p. 223-231, 2005.

TYERMAN, S. D.; NIEMIETZ, C. M.; BRAMLEY, H. Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. **Plant, cell & environment**, v. 25, n. 2, p. 173-194, 2002.

VIRLOUVET, L.; FROMM, M. Physiological and transcriptional memory in guard cells during repetitive dehydration stress. **New Phytologist**, v. 205, n. 2, p. 596-607, 2015.

WALTER, J. et al. Do plants remember drought? Hints towards a drought-memory in grasses. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, n. 1, p. 34-40, 2011.

WALTER, J. et al. Ecological stress memory and cross stress tolerance in plants in the face of climate extremes. **Environmental and Experimental Botany**, v. 94, p. 3-8, 2013.

WAN, J. et al. Development of drought-tolerant canola (*Brassica napus* L.) through genetic modulation of ABA-mediated stomatal responses. **Crop Science**, v. 49, n. 5, p. 1539-1554, 2009.

WANG, Y.; CHEN, X.; XIANG, C.-B. Stomatal Density and Bio-water Saving. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 49, n. 10, p. 1435–1444, 2007.

WEINHOLD, A. Transgenerational stress-adaption: an opportunity for ecological epigenetics. **Plant cell reports**, v. 37, n. 1, p. 3-9, 2018.

WINGLER, A. et al. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 355, n. 1402, p. 1517-1529, 2000.

WITZANY, G. Memory and learning as key competences of living organisms. In: **Memory and learning in plants**. Springer, Cham, p. 1-16, 2018.

XIONG, S. et al. Effects of drought stress and rehydration on physiological and biochemical of four oak species in China. **Research Square**, 2021. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-605400/v1>.

XU, Z.; ZHOU, G.; SHIMIZU, H. Plant responses to drought and rewatering. **Plant signaling & behavior**, v. 5, n. 6, p. 649-654, 2010.

YANEFF, A.; VITALI, V.; AMODEO, G. PIP1 aquaporins: Intrinsic water channels or PIP2 aquaporin modulators?. **FEBS letters**, v. 589, n. 23, p. 3508-3515, 2015.

ZARDOYA, R. Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family. **Biology of the Cell**, v. 97, n. 6, p. 397-414, 2005.

ZEGADA-LIZARAZU, W.; MONTI, A. Photosynthetic response of sweet sorghum to drought and re-watering at different growth stages. **Physiologia plantarum**, v. 149, n. 1, p. 56-66, 2013.

ZHANG, J.; KIRKHAM, M. B. Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. **Plant and Cell Physiology**, v. 35, n. 5, p. 785-791, 1994.

ZHANG, J.; KIRKHAM, M. B. Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. **New phytologist**, v. 132, n. 3, p. 361-373, 1996.

ZHOU, Y.; LAM, H. M.; ZHANG, J. Inhibition of photosynthesis and energy dissipation induced by water and high light stresses in rice. **Journal of experimental botany**, v. 58, n. 5, p. 1207–1217, 2007.