



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



TOLERÂNCIA AO DÉFICE HÍDRICO RECORRENTE MODULADO POR PADRÕES FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E EPIGENÉTICOS

LUÍS PAULO BENETTI MANTOAN

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutor no Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas (Botânica), Área de
concentração: Fisiologia e Bioquímica Vegetal.

BOTUCATU - SP

- 2019 -



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

TOLERÂNCIA AO DÉFICE HÍDRICO RECORRENTE
MODULADO POR PADRÕES FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E
EPIGENÉTICOS

LUÍS PAULO BENETTI MANTOAN

PROF. DR LUIZ FERNANDO ROLIM DE ALMEIDA

ORIENTADOR

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutor no Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas (Botânica), Área de
concentração: Fisiologia e Bioquímica Vegetal.

BOTUCATU - SP

- 2019 -

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Mantoan, Luís Paulo Benetti.

Tolerância ao déficit hídrico recorrente modulado por
padrões fisiológicos, bioquímicos e epigenéticos / Luís
Paulo Benetti Mantoan. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Luiz Fernando Rolim de Almeida
Capes: 20303033

1. Hidratação. 2. Secas. 3. Sorgo. 4. Estresse vegetal.
5. Desidratação (Hídrica). 6. Epigenética.

Palavras-chave: H3K4me3; reidratação; seca recorrente;
sorgo; "memória" do estresse.

Agradecimentos

À Deus por toda a força, ajuda e conforto que tem me dado e por sempre estar ao meu lado nos momentos difíceis.

À minha família, em especial aos meus pais Rafael Aparecido Mantoan e Sônia Maria Benetti Mantoan pelo carinho, compreensão e amor.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao professor Dr. Luiz Fernando Rolim de Almeida pela orientação e apoio durante o desenvolvimento do doutorado e por todo o apoio e auxílio que recebi durante o período do mestrado.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica).

Aos docentes do Departamento de Botânica.

Aos funcionários do Departamento de Botânica Inara Moreira, Auro Pires, Kleber Campos, Heloíza Cassola e, em especial, ao José Eduardo Costa por todo o auxílio durante o período que estive na Pós-Graduação e principalmente pelos momentos de descontração.

À professora Dr.^a Tatiane Maria Rodrigues que disponibilizou o laboratório de anatomia vegetal, bem como os instrumentos utilizados na análise de densidade estomática.

Ao professor Dr. Fernando Broetto pelo auxílio durante o desenvolvimento da tese, especialmente por ter disponibilizado o uso do laboratório e equipamentos nos momentos de maior necessidade.

À professora Dr.^a Claudia Aparecida Rainho cuja colaboração e conhecimentos foram excepcionais para a adaptação e realização do método de imunoprecipitação da cromatina utilizado nesta tese. Por ser um grande exemplo de dedicação e amor a pesquisa e ensino, o qual terei como base para minha vida profissional.

À minha namorada Carla Verônica Corrêa por todo seu amor, companheirismo, lealdade e paciência. Por estar ao meu lado em todos os momentos do doutorado me auxiliando e confortando nos momentos mais difíceis e por fazer parte da minha vida.

Aos amigos e colegas de Pós-Graduação Angelo Bertholdi, Angélica Rodrigues, Danilo Miralha, Felipe Yamashita, Livia Leite, Roberto Portella, Tais Arruda, Thayssa Schley,

Fabricio Custodio, Felipe Giroto, Sérgio Adachi, Diana Pacheco, Príncilla Pâmela, Janaina Cruz, Barbara Mitsuyasu, João Henrique, Fernanda, Magda, Diogo, Mariana Arcuri, Henrique, Edilson e outros que de alguma forma me auxiliaram no doutorado ou estiveram presentes.

Aos youtubers Wilson Rafael (Sr. Wilson) e Matheus Canella cujos vídeos sempre proporcionaram momentos de alegria ao final de cada dia de trabalho.

À todas as pessoas que de alguma forma colaboraram, incentivaram e me apoiaram durante todo o doutorado.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1.INTRODUÇÃO GERAL	3
2.REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1.ESTRESSE E DÉFICE HÍDRICO EM PLANTAS.....	4
2.2.IMPRESSÃO DO ESTRESSE E EPIGENÉTICA	9
2.3.SORGHUM BICOLOR.....	12
3.OBJETIVO	13
4.HIPÓTESES	14
5.CAPÍTULO I: IMPRESSÃO DO ESTRESSE E SUAS CONSEQUÊNCIAS EM SORGHUM BICOLOR (L.) MOENCH: RESPOSTAS FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E EPIGENÉTICAS AO DÉFICE HÍDRICO RECORRENTE.	15
5.1.Resumo.....	16
5.2.Introdução.....	17
5.3.Material e métodos	20
5.3.1.Área experimental e cultivo.....	20
5.3.2.Delineamento experimental.....	21
5.3.3.Irrigação e conteúdo de água no solo (CAS)	23
5.3.4.Conteúdo relativo de água na folha (CRA_{Folha}).....	24
5.3.5.Densidade estomática e densidade estomática relativa à área foliar.....	24
5.3.6.Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a.....	25
5.3.7.Área foliar e massa seca da parte aérea	26
5.3.8.Conteúdo de peróxido de hidrogênio e nível de peroxidação lipídica.....	27
5.3.9.Obtenção do extrato bruto para determinação de proteínas solúveis totais e atividade enzimática foliar	28
5.3.10.Conteúdo de proteínas solúveis totais	29
5.3.11.Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).....	29
5.3.12.Atividade da enzima peroxidase (POD)	30
5.3.13.Atividade da enzima catalase (CAT)	30
5.3.14.Extração e determinação do conteúdo de açúcares solúveis totais e sacarose	31
5.3.15.Imunoprecipitação da cromatina	32
5.3.16.Análises estatísticas.....	33
5.4.Resultados.....	34
5.4.1.Conteúdo de água no solo (CAS) e conteúdo relativo de água na folha (CRA_{Folha})	34
5.4.2.Densidade estomática e densidade estomática relativa à área foliar.....	35
5.4.3.Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a.....	37
5.4.4.Crescimento da parte aérea	42

5.4.5. Açúcares solúveis totais e sacarose.....	44
5.4.6. Conteúdo de H_2O_2 e peroxidação lipídica.....	45
5.4.7. Atividade da enzima peroxidase (POD), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT).....	47
5.4.8. Ocorrência de trimetilação na lisina 4 da histona 3 (H3K4me3) no nucleossomo do gene Sb04g038610	47
5.5. Discussão	49
5.6. Conclusão	57
5.7. Reconhecimento	58
5.8. Material suplementar.....	59
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

Lista de figuras

Figura 1: Média do conteúdo relativo de água no solo (CAS)	35
Figura 2: Média das trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i> do primeiro experimento .	39
Figura 3: Média das trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i> do segundo experimento .	40
Figura 4: Média do conteúdo de açúcares solúveis totais	44
Figura 5: Média do conteúdo de sacarose	45
Figura 6: Média do conteúdo de H ₂ O ₂	46
Figura 7: Média do nível de peroxidação lipídica	46
Figura 8: Média da atividade da enzima peroxidase (POD).....	47
Figura 9: Média da ocorrência da H3K4me3 no gene Sb04g038610, comparação entre tratamentos	48
Figura 10: Média da ocorrência da H3K4me3 no gene Sb04g038610, comparação ao longo do tempo	49
Figura suplementar 1: Média da temperatura do ar e umidade relativa do ar do primeiro experimento	59
Figura suplementar 2: Média da temperatura do ar e umidade relativa do ar do segundo experimento	59

Lista de tabelas

Tabela 1: Média do do potencial hídrico da parte aérea de <i>Sorghum bicolor</i> aos 15 dias após semeadura do primeiro e segundo experimento	21
Tabela 2: Média do conteúdo relativo de água na folha (CRA_{Folha})	35
Tabela 3: Média da densidade estomática relativa à área foliar	36
Tabela 4: Média do rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m)	41
Tabela 5: Média da massa seca do caule (MSC), massa seca da folha (MSF), massa seca total (MST) e área foliar (AF)	43
Tabela suplementar 1: Sequência de primers para a quantificação da H3K4me3.....	60
Tabela suplementar 2: Média da densidade estomática após 27 dias de reidratação.....	60
Tabela suplementar 3: Média das trocas gasosas e da fluorescência da clorofila <i>a</i> no primeiro dia de reidratação do primeiro experimento	61
Tabela suplementar 4: Média das trocas gasosas e da fluorescência da clorofila <i>a</i> no primeiro dia de reidratação do segundo experimento	61
Tabela suplementar 5: Média da eficiência do uso da água (<i>EUA</i>), “quenching” fotoquímico (<i>qP</i>) e fração do excesso de energia não dissipada pelas antenas e não utilizadas fotoquimicamente na condição de luz (<i>Ex</i>) no último dia de déficit hídrico	62
Tabela suplementar 6: Média da atividade da enzima superóxido dismutase e da atividade da enzima catalase no último dia de déficit hídrico e no segundo dia de reidratação	62

Lista de abreviaturas

ANOVA	–	Análise de variância
AF	–	Área foliar
A_{Net}	–	Assimilação de CO ₂
g_s	–	Condutância estomática
CAS	–	Conteúdo de água no solo
CRA _{Folha}	–	Conteúdo relativo de água na folha
CAT	–	Catalase
DHFA	–	Défice Hídrico na Fase Adulta
DHFJ	–	Défice Hídrico na Fase Juvenil
DHR	–	Défice Hídrico Recorrente
DFFFA	–	Densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos
DAS	–	Dias após a semeadura
EUA	–	Eficiência de uso da água
ERO	–	Espécies reativas de oxigênio
PSII	–	Fotossistema II
D	–	Fração da energia dissipada pelas antenas como calor na condição de luz
Ex	–	Fração do excesso de energia não dissipada pelas antenas e não utilizadas fotoquimicamente na condição de luz
Sb04g038610	–	Gene de <i>Sorghum bicolor</i> (similar to Class III peroxidase 32 precursor)
Sb03g040880	–	Gene de <i>Sorghum bicolor</i> (Actin 1)
MDA	–	Malondialdeído
MSC	–	Massa seca do caule
MSF	–	Massa seca de folha
MST	–	Massa seca total
H ₂ O ₂	–	Peróxido de hidrogênio
Reid. (1 dia)	–	Primeiro dia de reidratação
qP	–	“quenching” fotoquímico
Reid. (4 dias)	–	Quarto dia de reidratação
Φ_{PSII}	–	Rendimento quântico efetivo
F_v/F_m	–	Rendimento quântico máximo do fotossintema II
F_v'/F_m'	–	Rendimento quântico máximo do fotossistema II sob condição de luz
Reid. (2 dias)	–	Segundo dia de reidratação

Reid. (6 dias) – Sexto dia de reidratação

SOD – Superóxido dismutase

E – Transpiração

H3K4me3 – Trimetilação do aminoácido lisina na posição 4 da cauda amino terminal da histona 3

DH – Último dia de déficit hídrico

MANTOAN, L.P.B. **TOLERÂNCIA AO DÉFICE HÍDRICO RECORRENTE MODULADO POR PADRÕES FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E MOLECULARES.** 2019. 79P. TESE (DOUTORADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA.

RESUMO

Plantas que presenciam a seca podem armazenar informações sobre esta experiência, tal como uma memória ao estresse. As informações adquiridas com a memória do estresse podem ser utilizadas para aumentar a tolerância a futuros eventos de déficit hídrico, porém, o crescimento das plantas pode ser limitado. O objetivo deste estudo foi investigar as respostas fisiológicas, bioquímicas e epigenéticas de *Sorghum bicolor* (L.) Moench durante e após o primeiro e segundo evento de déficit hídrico, bem como as vantagens e desvantagens de eventos recorrentes de seca para a tolerância e crescimento. Neste estudo foram utilizados quatro tratamentos que foram: Controle, onde a irrigação foi mantida, Déficit Hídrico na Fase Juvenil, onde as plantas foram submetidas a desidratação na fase juvenil seguido de reidratação, Déficit Hídrico na Fase Adulta, onde a irrigação foi suspensa na fase adulta seguido de reidratação e Déficit Hídrico Recorrente, onde a irrigação foi suspensa na fase juvenil e adulta seguido de reidratação. Foram avaliadas as trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, conteúdo relativo de água na folha, densidade estomática, crescimento, enzimas atioxidativas, conteúdo de açúcares totais e sacarose e ocorrência da H3K4me3 no gene Sb04g038610. Mesmo com o intervalo entre o primeiro e o segundo evento de seca, o que poderia resultar na remoção da memória do estresse formada no primeiro evento, as respostas fotossintéticas, antioxidativas, morfo-anatomicas e de estado hídrico demonstraram que plantas de *S. bicolor* apresentaram maior tolerância a seca durante o déficit recorrente em relação às plantas submetidas a apenas um evento de déficit. Além disso, plantas sob déficit hídrico recorrente apresentaram maior ocorrência da marca epigenética H3K4me3 no gene Sb04g038610 durante a seca e reidratação, sendo a H3K4me3 mantida durante a reidratação de plantas submetidas ao déficit hídrico único e recorrente por seis dias. Contudo, a massa seca da parte aérea e a área foliar de plantas sob seca recorrente foi reduzida em relação a plantas sob déficit hídrico único. Desta forma, conclui-se que *S. bicolor* apresenta impressão do estresse por déficit hídrico a longo prazo, pois durante o segundo evento de seca as plantas apresentam maior tolerância e presença, com posterior manutenção, da H3K4me3. Entretanto, o crescimento destas plantas é prejudicado.

Palavras-chave: H3K4me3, “Memória” do estresse, Reidratação, Seca recorrente, Sorgo, Planta cultivada.

MANTOAN, L.P.B. **TOLERANCE TO THE RECURRENT WATER DEFICIT MODULATED BY PHYSIOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND MOLECULAR PATTERNS.** 2019. 79P. THESIS (DOCTORATE DEGREE) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA.

ABSTRACT

Plants that experience drought can store information about this experience, such as a memory of stress. Information acquired with stress memory can be used to increase tolerance to future water deficit events, however, plant growth may be limited. The objective of this study was to investigate the physiological, biochemical and epigenetic responses of *Sorghum bicolor* (L.) Moench during and after the first and second water deficit event, as well as the advantages and disadvantages of recurrent drought events for tolerance and growth. Four treatments were used: Control, where irrigation was maintained, Water Deficit in the Juvenile Phase, where the plants were submitted to dehydration in the juvenile phase followed by rehydration, Water Deficit in the Adult Phase, where irrigation was suspended in the adult phase followed by rehydration and Recurrent Water Deficit, where irrigation was suspended in the juvenile and adult phases followed by rehydration. Gas exchanges, chlorophyll *a* fluorescence, relative leaf water content, stomatal density, plant growth, antioxidant enzymes, total sugar and sucrose content and the occurrence of H3K4me3 in the Sb04g038610 gene were evaluated. Even with the interval between the first and second drought events, which could result in the removal of the stress memory, the photosynthetic, antioxidant, morpho-anatomical and water status responses demonstrated that *S. bicolor* plants showed increased tolerance to drought during recurrent water deficit in relation to plants submitted to only one water deficit event. In addition, plants under recurrent drought presented a higher occurrence of the epigenetic mark H3K4me3 in the gene Sb04g038610 during drought and rehydration, with H3K4me3 being maintained during the rehydration of plants submitted to a single and recurrent drought for six days. However, dry shoot mass and leaf area of plants under recurrent drought was reduced in relation to plants under single drought conditions. In this way, it is concluded that *S. bicolor* presents stress imprint to water deficit to long-term, because during the second drought event the plants present greater tolerance and presence of H3K4me3, with subsequent maintenance of this epigenetic mark in rehydration.

Key words: H3K4me3, “Stress memory”, Rehydration, Recurring drought, Sorghum, Cultivated plant.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A seca está entre os eventos ambientais mais preocupantes para a agricultura. Sendo assim, eventos de seca podem afetar a segurança alimentar de um grande número de pessoas gerando uma cascata de consequências na economia, geopolítica e sociedade (WILHITE, 2000; GRAYSON, 2013; TOMBESI *et al.*, 2018). Acredita-se que a frequência e severidade dos eventos de seca serão maiores no futuro devido à redução na precipitação e ao aumento da evapotranspiração ocasionada pelo aumento da temperatura global (SHEFFIELD; WOOD, 2008; DAI, 2011; SHEFFIELD; WOOD; RODERICK, 2012; TOMBESI *et al.*, 2018). Em resposta ao aquecimento global, alguns pesquisadores acreditam que haverá mudanças no padrão de distribuição das chuvas, as quais ocorrerão de modo desuniforme. Além disso, os eventos de seca irão acontecer mais cedo e de forma mais longa e intensa (TRENBERTH *et al.*, 2014; TOMBESI *et al.*, 2018).

A seca coloca em perigo a sobrevivência de espécies nativas e agrícolas que são anuais e perenes. Entretanto, as espécies anuais, tal como a espécie *Sorghum bicolor* (L.) Moench, apresentam maior número de estratégias para resistir e se adaptar as mudanças climáticas do que espécies perenes. As espécies anuais podem mudar seu fenótipo de acordo com as mudanças climáticas devido alta plasticidade e capacidade evolutiva, sendo esta última proporcionada pelo rápido ciclo reprodutivo das plantas anuais (FRANKS; WEBER; AITKEN, 2014; TOMBESI *et al.*, 2018). Contudo, com as mudanças no clima, as plantas estão enfrentando períodos de seca cada vez mais frequentes e intensos. Isto representa um sério perigo para as comunidades vegetais, pois o curto intervalo de recuperação entre um período e outro de seca pode não ser suficiente para as plantas se recuperarem do primeiro evento de estresse. Desta forma, durante o segundo evento de seca, a planta apresenta ajustes aos danos causados pelo evento atual e pelos eventos anteriores (WALTER *et al.*, 2013).

Segundo Bruce *et al.* (2007) as plantas são capazes de armazenar informações sobre eventos anteriores de estresse. Tais informações podem ser utilizadas durante o evento recorrente, tornando a resposta a este segundo evento mais eficiente. Neste sentido, pode-se dizer que as plantas apresentam mecanismos para armazenar tais informações ambientais, tal como uma “memória” para o estresse (BRUCE *et al.*, 2007). A “memória” do estresse, também chamada de impressão do estresse, ocorre quando a planta, a qual foi submetida anteriormente a um determinado evento estressante, apresenta respostas mais eficientes e rápidas durante o segundo evento do mesmo estresse, o que confere maior tolerância a eventos recorrentes (BRUCE *et al.*, 2007; WALTER *et al.*, 2013; CRISP *et al.*, 2016). A impressão do estresse

pode atuar para estabilizar uma comunidade de plantas sobre frequentes extremos climáticos de forma a aumentar a resiliência e reduzir a mortalidade das plantas (WALTER *et al.*, 2013). Entretanto, a manutenção da impressão do estresse pode apresentar desvantagens para o crescimento, pois a planta acaba utilizando seus recursos em favor da sobrevivência (CHINNUSAMY; ZHU, 2009; SKIRYCZ; INZÉ, 2010; MARTINEZ-MEDINA *et al.*, 2016).

Dentre os possíveis mecanismos envolvidos na formação da impressão do estresse estão o acúmulo de fatores de transcrição, proteínas sinalizadoras e modificações epigenéticas (BRUCE *et al.*, 2007; CRISP *et al.*, 2016). Estudos realizados em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. tem apontado os mecanismos epigenéticos como responsáveis pela impressão do estresse (DING; FROMM; AVRAMOVA, 2012; KIM *et al.*, 2012). Entretanto, a maioria das pesquisas sobre a impressão do estresse é focada em estudos genéticos e epigenéticos (WALTER *et al.*, 2013). Sendo assim, estudos que relacionem as respostas moleculares, bioquímicas e os demais parâmetros funcionais são necessários para a real compreensão das respostas das plantas aos recorrentes eventos de estresse, bem como as possíveis consequências da manutenção da impressão do estresse para o crescimento (CHINNUSAMY; ZHU, 2009; WALTER *et al.*, 2011; WALTER *et al.*, 2013; VRIET; HENNIG; LALOI, 2015; MARTINEZ-MEDINA *et al.*, 2016).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Estresse e déficit hídrico em plantas

Na fisiologia vegetal existem diversas definições de estresse, o que dificulta o entendimento do termo. Por exemplo, Larcher (1987) define o estresse como o estado onde a planta presencia uma mudança que demanda resposta. Caso a resposta demandada esteja dentro do limite de tolerância, a planta se recupera, caso contrário danos permanentes irão ocorrer. Lichtenthaler (1996) define estresse como qualquer substância ou condição desfavorável que afete o metabolismo, o crescimento ou desenvolvimento. Gaspar *et al.* (2002) define estresse como mudanças fisiológicas que ocorrem quando a espécie está exposta a condições desfavoráveis que não necessariamente representa ameaça para a vida, mas induz a respostas de alarme.

A maioria das definições de estresse apresentam em comum o fato de descrevê-lo como mudanças nas condições abióticas ou bióticas, as quais induzem a alguma resposta nas plantas, podendo ou não ocorrer danos ao organismo (MOSA; ISMAIL; HELMY, 2017). A razão pela

qual existem tantas definições de estresse é explicada pelo fato de cada pesquisador trabalhar com um tipo de estresse diferente, desta forma, cada pesquisador acaba definindo o estresse de acordo com sua própria linha de pesquisa (MOSA; ISMAIL; HELMY, 2017).

Na física quando um estresse é aplicado sobre um material, este sofre uma deformação, a qual pode ser elástica, quando no fim do estresse a deformação é reversível, ou plástica, quando a deformação é irreversível (KRANNER *et al.*, 2010; MOSA; ISMAIL; HELMY, 2017). Na biologia vegetal uma analogia pode ser feita quanto a esta capacidade de deformação. Dependendo da intensidade e duração do estresse, as plantas podem apresentar uma resposta elástica, na qual os efeitos do estresse são revertidos graças aos mecanismos de reparo, mantendo assim a função e viabilidade, ou podem apresentar uma resposta plástica, onde as plantas apresentam danos irreversíveis devido à falha nos mecanismos de reparo (KRANNER *et al.*, 2010).

As plantas são capazes de perceber o estresse por meio de mecanismos de detecção do estresse. Tais mecanismos são diversos e dependem da espécie, do órgão e do tipo de estresse (KRANNER *et al.* 2010; MOSA; ISMAIL; HELMY, 2017). Como exemplo, o déficit hídrico no solo pode ser percebido por meio de osmosensores nas células da raiz (URAO *et al.*, 1999; MOSA; ISMAIL; HELMY, 2017). A detecção do estresse é o primeiro evento que ocorre após a exposição ao agente estressor, sendo este evento responsável por dar início à resposta da planta ao estresse.

Existem quatro fases de resposta ao estresse que são a fase de alarme, a fase de resistência, a fase de exaustão e a fase de regeneração (KRANNER *et al.* 2010; MOSA; ISMAIL; HELMY, 2017). A fase de alarme ocorre quando as plantas reconhecem as mudanças causadas pelo estresse nas condições consideradas ótimas para o crescimento, tal fase pode ser observada ao se verificar alterações nas atividades fisiológicas em comparação com plantas sob condições normais. Na fase de resistência a planta começa a responder ao agente estressor, o qual ainda está afetando o crescimento, por meio do processo de reparo e aclimação. Nesta fase os mecanismos de tolerância e aclimação estabelecem um novo padrão fisiológico considerado ótimo para a sobrevivência na condição estressante. Entretanto, existe um limite máximo para a resistência, sendo assim, se o estresse for prolongado ou intenso as plantas não serão capazes de adequar suas respostas fisiológicas a condição estressante. Caso isto ocorra, as plantas entrarão na fase de exaustão. Nesta fase, as reservas da planta encontram-se exauridas e o estresse é tão intenso que os mecanismos de controle dos danos já não conseguem amenizar as consequências do estresse, o que resulta no acúmulo de danos e por fim na morte da planta.

Contudo, se o estresse for removido a planta entrará na fase de regeneração. Nesta fase ocorre a recuperação pós estresse, onde a planta poderá recuperar seu padrão fisiológico original ou não dependendo da intensidade e do tempo de exposição ao agente estressor (LICHTENTHALER, 1996; KRANNER *et al.* 2010; MOSA; ISMAIL; HELMY, 2017).

A seca é considerada o principal tipo de estresse abiótico, pois afeta diversos aspectos da planta como o crescimento, desenvolvimento e reprodução (MOSA; ISMAIL; HELMY, 2017). A seca pode ser definida como o período em que a precipitação em determinada área está abaixo do esperado para uma determinada época, o que resulta em redução na umidade do solo, no volume dos rios e reservatórios subterrâneos e até na disponibilidade de água potável (MISHRA; SINGH, 2010). O estado hídrico da planta é influenciado pela interação de fatores atmosféricos, das plantas e do solo. Desta forma, a quantidade de água no solo, a demanda atmosférica por evaporação, a capacidade da raiz em absorver água, a habilidade da planta em transporta-la para as folhas e a resposta do estômato controlando a transpiração podem influenciar na condição hídrica da planta (FEDDES; DAM, 2005; GIMENEZ; GALLARDO; THOMPSON, 2005; BLUM, 2011). Segundo Gimenez, Gallardo e Thompson (2005) e Blum (2011) a planta apresenta condição hídrica adequada quando a absorção de água pela raiz é suficiente para suprir a demanda gerada pela transpiração, porém, quando isso não ocorre, o déficit hídrico pode surgir.

O déficit hídrico, capaz de levar a planta a condição de estresse, surge quando a disponibilidade de água do ambiente é insuficiente para manter a demanda de água pela planta, o que interfere no estado de equilíbrio fisiológico ótimo da planta de tal forma que seu crescimento e funcionamento normal é reduzido (GASPAR *et al.*, 2002; GIMENEZ; GALLARDO; THOMPSON, 2005). Contudo, as plantas apresentam mecanismos que possibilitam a resistência ao déficit hídrico, sendo esta resistência definida como a habilidade de sobreviver à condição de baixa disponibilidade de água (GASPAR *et al.*, 2002; BLUM, 2011). Existem três tipos de mecanismos de resistência ao déficit hídrico que são: o mecanismo de tolerância, de evitar o déficit hídrico e de escape (BLUM, 2011), sendo que dentro das quatro fases de resposta ao estresse definidas por Kranner *et al.* (2010) e Mosa, Ismail e Helmy (2017), apenas os mecanismos de tolerância e de evitar a seca estão relacionados a fase de resistência.

Segundo Gaspar *et al.* (2002) e Blum (2011) a tolerância ao déficit hídrico é definida como a habilidade da planta em manter a atividade metabólica sob condições de baixa hidratação. O mecanismo de escape é associado ao rápido ciclo de vida, a fim de garantir a reprodução da espécie antes do período de seca. O mecanismo de evitar o déficit hídrico é

definido como a capacidade da planta em manter a alta hidratação mesmo em condições de baixa disponibilidade de água no solo, sem prejuízo aos demais processos metabólicos (GASPAR *et al.*, 2002; BLUM, 2011).

A fotossíntese é o principal processo afetado pelo déficit hídrico (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009; HASANUZZAMAN *et al.*, 2013), sendo comum a redução na taxa de assimilação de CO₂ durante a diminuição no potencial hídrico do solo e da folha (LAWLOR, 2002; CHAVES; MAROCO; PEREIRA, 2003; SANTOS *et al.*, 2006). Além disso, o “status” de água na folha interage com a condutância estomática e transpiração, sendo que sob déficit hídrico é observada correlação entre o potencial hídrico da folha e a condutância estomática, pois o fechamento estomático é a principal resposta contra a perda de água pela transpiração (TARDIEU; SIMONNEAU, 1998; FLEXAS; ESCALONA; MEDRANO, 1999; CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009; WAN *et al.*, 2009; GILBERT; MEDINA, 2016).

Apesar de limitar a perda de água, o fechamento estomático restringe a entrada de CO₂, o que leva a redução da assimilação fotossintética de carbono (MEDRANO *et al.*, 2002; SLAMA *et al.*, 2007; ARAÚJO; DEMINICIS, 2009; DITMAROVÁ *et al.*, 2010), sendo esta resposta conhecida como limitação estomática da fotossíntese (YIN *et al.*, 2005). Contudo, com o aumento da intensidade e duração do estresse a limitação da assimilação de carbono também passa a ser influenciada por fatores não estomáticos, como a redução da atividade da enzima rubisco e do processo fotoquímico (SILVA; ARRABACA, 2004; GALMÉS; MEDRANO; FLEXAS, 2007; XU; ZHOU; SHIMIZU, 2009).

Segundo Moreno-Sotomayor *et al.* (2002) as trocas gasosas podem ser influenciadas pela estrutura e anatomia da folha. Desta forma, a abertura do poro estomático e o número de estômatos na epiderme das folhas influenciam nas respostas fotossintéticas (HETHERINGTON; WOODWARD, 2003) e na condição hídrica da folha (WANG; CHEN; XIANG, 2007). Segundo Wang *et al.* (2016) muitos estudos têm apontado para a importância da densidade estomática para a fotossíntese em diversas espécies, entre elas está a espécie *Sorghum bicolor* (L.) Moench (MUCHOW; SINCLAIR, 1989). Embora a anatomia das folhas seja determinada geneticamente, fatores ambientais também desempenham papel importante na expressão das características anatômicas (MORENO-SOTOMAYOR *et al.*, 2002). Segundo Hetherington e Woodward (2003), Nadeau e Sack (2002) e Nadeau e Sack (2003) a densidade estomática também é determinada por fatores genéticos, porém, fatores ambientais como o déficit hídrico também influenciam na densidade estomática.

A combinação da avaliação de trocas gasosas e da fluorescência da clorofila *a* tem sido usada para investigar o envolvimento do efeito não estomático na limitação da fotossíntese sob estresse hídrico (ENNAHLI; EARL, 2005). A ação sinérgica do alto nível de radiância e déficit hídrico reduz a capacidade do sistema fotossintético de utilizar a luz incidente, levando ao aumento no grau de dano ao aparato fotossintético devido ao acúmulo das espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas na etapa fotoquímica como consequência do estresse (FOYER; LELANDAIS; KUNERT, 1994; WINGLER *et al.*, 2000; ZHOU; LAM; ZHANG, 2007). Sob condições ambientais, onde a energia do fóton é superior à assimilação de CO₂, o fotossistema II (PSII) é o principal alvo do processo de fotoinibição (BOWLER; MONTAGU; INZE, 1992; MELIS, 1999; SANDA *et al.*, 2011; WU; BAO, 2011), sendo este processo definido como uma inibição da etapa fotoquímica devido ao aumento excessivo da luz acima da capacidade de utilização pela fotossíntese (LEMOS FILHO, 2000).

A produção de ERO é uma inevitável consequência da vida aeróbica como subprodutos de processos metabólicos normais dos peroxissomos, cloroplastos e mitocôndrias (APEL; HIRT, 2004). As ERO podem ser prejudiciais para as funções celulares causando danos às membranas, proteínas e DNA, porém, também podem atuar na sinalização. As principais ERO são conhecidas como radicais superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e oxigênio singlete ¹O₂ (ALLEN, 1995; VRANOVÁ; INZÉ; BREUSEGEM, 2002; DANON *et al.*, 2005; GRENNAN, 2008). Em plantas submetidas ao déficit hídrico, a fotorrespiração é o processo que gera H₂O₂ em grandes quantidades nos peroxissomos (CENTRITTO *et al.*, 2005; LUNA *et al.*, 2005). Além disso, os elétrons que fluem pela cadeia de transporte de elétrons do cloroplasto podem ser transferidos para o O₂ em condições de déficit hídrico, produzindo O₂⁻ em uma reação conhecida como reação de Mehler ou ciclo água-água (HIDEG; SPETEA; VASS, 1995; CHEN *et al.*, 2004).

A capacidade da planta em ativar o sistema de defesa antioxidativo é o principal mecanismo para a resistência contra danos oxidativos causados pelas ERO. Esta resistência é, principalmente, conectada com mudanças nos níveis de atividade de uma ou mais enzimas antioxidantes (ALLEN, 1995; BRAY, 1997; CHANDRA; BHATT; MISRA, 1998; DUBEY; CHANDRA, 2003). Estes mecanismos incluem enzimas antioxidantes tais como superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1), peroxidases (POD; EC 1.11.1.7) e catalase (CAT; EC 1.11.1.6) (WANG; LÜTTGE; RATAJCZAK, 2004).

Como consequência do efeito da seca, a produtividade de sistemas agrícolas e naturais sob condição de déficit hídrico é prejudicada (BOYER, 1982; MYERS *et al.*, 2017), sendo uma

das formas de estresse que causa maior restrição na produtividade e crescimento das plantas (FAROOQ *et al.*, 2012; DEVNARAIN *et al.*, 2016). Trata-se de um problema global que têm graves efeitos na agricultura e, consequentemente, na segurança alimentar (DEVNARAIN *et al.*, 2016).

2.2. Impressão do estresse e epigenética

A maioria dos estudos que buscam compreender as respostas das plantas ao estresse aborda apenas um único evento. Porém, na natureza é comum que o estresse, tal como a seca, ocorra de forma recorrente (LÄMKE; BÄURLE, 2017). Além disso, com as mudanças climáticas, ocorrerá um agravamento na frequência e intensidade dos eventos de seca (SHEFFIELD; WOOD, 2008; DAI, 2011; SHEFFIELD; WOOD; RODERICK, 2012; TOMBESI *et al.*, 2018). Segundo Walter *et al.* (2013), a alta frequência e intensidade do estresse pode resultar em acúmulo de danos nas plantas, pois as mesmas teriam pouco tempo para se aclimatar e recuperar em um curto intervalo entre eventos de estresse. Contudo, existem estudos que demonstram que certos processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares em plantas são modificados por eventos de estresse anteriores (WALTER *et al.*, 2011; WALTER *et al.*, 2013; DING *et al.*, 2014a; LI *et al.*, 2014).

Estudos realizados por Walter *et al.* (2011), Ding *et al.* (2014a) e por Li *et al.* (2014) comparando plantas submetidas a evento único e recorrente de estresse demonstraram que as respostas fisiológicas, antioxidativas e moleculares destas plantas são diferentes. Como exemplo, Walter *et al.* (2011) demonstraram que plantas de *Arrhenatherum elatius* (L.) submetidas ao déficit hídrico recorrente apresentaram maior capacidade fotoprotetora e maior quantidade de biomassa viva em relação a plantas sem histórico de seca. Li *et al.* (2014) demonstraram que plantas de trigo com experiência prévia ao frio apresentaram maior atividade fotossintética e maior atividade das enzimas superóxido dismutase e ascorbato peroxidase no evento recorrente de frio. Em plantas de milho sob recorrentes eventos de seca Ding *et al.* (2014a) observaram maior expressão dos genes GRMZM2G179462, GRMZM2G053669 e GRMZM2G011598, bem como maior conteúdo relativo de água na folha em relação as plantas sem experiência ao estresse.

Embora as espécies e os tipos de estresse dos estudos citados anteriormente sejam diferentes, estes mesmos estudos apresentam em comum o fato das plantas apresentarem em algum momento da vida uma experiência prévia ao correspondente estresse avaliado. Segundo

Bruce *et al.* (2007), as plantas apresentam a capacidade de armazenar informações sobre os eventos anteriores de estresse. Tais informações podem ser usadas em eventos recorrentes do mesmo estresse a fim de melhorar a resposta de tolerância, tal como uma “memória” ao estresse. A “memória” do estresse, também chamada de impressão do estresse, ocorre quando a planta, a qual possui uma experiência prévia de estresse, apresenta respostas mais eficientes e rápidas durante o segundo evento do mesmo estresse (BRUCE *et al.*, 2007; WALTER *et al.*, 2011, WALTER *et al.*, 2013; CRISP *et al.*, 2016).

Entre os possíveis mecanismos responsáveis pela formação da impressão do estresse estão o acúmulo de proteínas de sinalização inativas, as quais podem se tornar ativas com o estresse recorrente, e de fatores de transcrição, os quais podem acelerar a transcrição dos genes de tolerância no segundo evento de estresse (CONRATH *et al.*, 2006; BRUCE *et al.*, 2007; CRISP *et al.*, 2016). Estudos realizados por Beckers *et al.* (2009) e por Stief *et al.* (2014) tem comprovado a ocorrência da impressão do estresse regulada por tais mecanismos. Contudo, a impressão do estresse pode estar relacionada com mudanças epigenéticas (BRUCE *et al.*, 2007; MARTINEZ-MEDINA *et al.*, 2016; HE; LI, 2018). Estas mudanças resultam de alterações na estrutura da cromatina de forma a ativar ou silenciar a transcrição gênica sem que haja alteração da sequência de nucleotídeos (BIRD, 2007; MADLUNG; COMAI, 2004; HE; LI, 2018). Em outras palavras, a expressão do genoma é influenciada pela estrutura da cromatina (ZHU, 2008; MAEJI; NISHIMURA, 2018). A cromatina é formada por repetições de sua unidade básica chamada de nucleossomo, sendo o mesmo formado por 147 pares de base de DNA que se enrolam em um octâmero de proteínas histonas, o qual contém duas moléculas cada de histonas H2A, H2B, H3 e H4. Além disso, também existe a histona H1, a qual está associada ao DNA unindo nucleossomos adjacentes para formar a cromatina e alcançar um alto grau de condensação (VRIET; HENNIG; LALOI, 2015; LÄMKE; BÄURLE., 2017; NOROUZITALLAB *et al.*, 2019).

Dentre os tipos de mudanças epigenéticas está à alteração das principais histonas dos nucleossomos (H2A, H2B, H3, H4) (LOIDL, 2004; SUDAN; RAINA; SINGH, 2018). As modificações de histonas podem afetar a estrutura da cromatina alterando a interação proteína-DNA (histona-DNA) de forma a permitir ou não, dependendo do tipo de modificação, o acesso das proteínas de transcrição ao DNA, ativando ou silenciando o gene (REA *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2010; BANNISTER; KOUZARIDES, 2011; LÄMKE; BÄURLE., 2017). Um exemplo de modificação de histona é a metilação do aminoácido lisina na cauda amino terminal destas

proteínas histonas, sendo esta metilação realizada por processos enzimáticos (LIU *et al.*, 2010; WATERBORG, 2011; SUDAN; RAINA; SINGH, 2018).

Alterações nos padrões de metilação de histonas são influenciadas pelo ambiente e apresentam papel decisivo na resposta ao estresse abiótico como no caso da seca (ZHU *et al.*, 2008; ZONG *et al.*, 2012; SUDAN; RAINA; SINGH, 2018). Como exemplo, Kim *et al.* (2008) observaram aumento da trimetilação (me3) do aminoácido lisina na posição 4 (K4) da cauda amino terminal da histona H3 (H3K4me3) na região codificante dos genes de resposta a seca *RD29A*, *RD29B*, *RD20* e *RAP2.4* avaliados em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Além disso, os mesmos autores correlacionaram o aumento da H3K4me3 com a ativação e transcrição destes quatro genes. Além deste, outros estudos como os de Ding, Avramova e Fromm (2011); Ding *et al.* (2012); Ding, Fromm e Avramova (2012) e Zong *et al.* (2012) também mostram que a H3K4me3 ocorre em genes de resposta a seca.

Além de regular a transcrição gênica, outra possível função para a metilação da histona poderia ser a de “memória” molecular para genes recentemente transcritos (NG *et al.*, 2003; HE; LI, 2018). Kim *et al.* (2012) observaram manutenção da trimetilação da H3K4 em genes de resposta a seca de *A. thaliana* após cinco horas de reidratação. Em outro estudo, Ding, Fromm e Avramova (2012) observaram manutenção da trimetilação da H3K4 após cinco dias de reidratação em *A. thaliana* submetida a eventos de déficit hídrico seguido de reidratação. Segundo Ng *et al.* (2003) e He e Li (2018) a presença da H3K4me3 é considerada o principal marcador molecular para a verificação da “memória” em estresses abióticos e bióticos, uma vez que a marca epigenética H3K4me3 permanece no nucleossomo dos genes de tolerância deixando-os em um estado permissível a transcrição mesmo após a inativação da transcrição do gene, o que resulta em aumento da tolerância durante o recorrente evento de estresse (BRUCE *et al.*, 2007; WALTER *et al.*, 2011).

A impressão do estresse gerada pelas modificações de histonas pode atuar para estabilizar a comunidade de plantas sobre frequentes extremos climáticos de forma a aumentar a resiliência e reduzir a mortalidade vegetal em eventos recorrentes de estresse (CHINNUSAMY; GONG; ZHU, 2008; BOYKO; KOVALCHUK, 2011; WALTER *et al.*, 2013). Contudo, avaliações sobre os custos e benefícios da impressão do estresse envolvendo modificações de histonas devem ser realizadas (HULTEN *et al.*, 2006; BALUŠKA; GAGLIANO; WITZANY, 2018). Segundo Conrath *et al.* (2006) para que ocorra a ativação das respostas de defesa ao estresse é necessário que os recursos da planta sejam realocados para este fim, o que por sua vez gera grandes custos para o crescimento e reprodução. Em *A. thaliana*

Hulten *et al.* (2006) demonstraram que a aplicação de ácido β -aminobutírico e benzotiadiazol para a formação da impressão do estresse a patógenos resultou em custos para o vigor das plantas. Contudo, ao expor as plantas com impressão do estresse aos patógenos *Pseudomonas syringae* e *Hyaloperonospora parasítica* os danos ao vigor durante esta exposição foram menores, enquanto que nas plantas sem impressão do estresse, os danos ao vigor durante a exposição aos patógenos foram bem maiores. Sendo assim, apesar da indução da impressão do estresse em plantas resultar em certos prejuízos para o crescimento e vigor, estas mesmas plantas tenderão a apresentar perdas menores nos eventos recorrentes do estresse, enquanto que plantas sem experiência prévia ao estresse tenderão a apresentar as maiores perdas (CONRATH *et al.*, 2006; HULTEN *et al.*, 2006).

Por fim, segundo Walter *et al.*, (2011) estudos sobre a impressão do estresse que relacionem as respostas moleculares e bioquímicas com os demais parâmetros funcionais são necessários para o entendimento das respostas das plantas frente às mudanças climáticas. A compreensão dos mecanismos que levam a impressão do estresse poderia ter implicações positivas para o cultivo de espécies agrícolas e para a restauração de áreas naturais onde a seca é frequente. Contudo, ainda não há consenso sobre as consequências desta impressão para o crescimento e para a produtividade das plantas (CHINNUSAMY; ZHU, 2009; WALTER *et al.*, 2013). Além disso, também existe o desafio de se determinar por quanto tempo a impressão do estresse permanece na planta após o primeiro evento de estresse (HAN; WAGNER, 2014).

2.3. *Sorghum bicolor*

Pertencente à família Poaceae a espécie *Sorghum bicolor* (L.) Moench., conhecida popularmente no Brasil como sorgo, é um importante cereal de clima tropical, o qual é cultivado tanto para a alimentação humana como para a produção de forragem para a alimentação animal (LIM, 2013; TARI *et al.*, 2013). Além da alimentação, o sorgo também apresenta importância na produção de biocombustíveis (SASAKI; ANTONIO, 2009; LIM, 2013; NGARA; NDIMBA, 2014). Originária da África esta espécie é amplamente cultivada na África, Índia, China, Austrália, México, Estados Unidos e América do Sul, sendo os Estados Unidos o maior produtor mundial, enquanto que o Brasil se encontra como o 11º maior produtor (LIM, 2013; TARI *et al.*, 2013).

A espécie *S. bicolor* é uma planta típica de regiões quentes e secas, sendo conhecida por tolerar a deficiência hídrica e crescer em regiões áridas e semiáridas onde a produção de outras

culturas é limitada (LIM, 2013; SUTKA *et al.*, 2016). Esta espécie pode ser cultivada em ampla variedade de solos desde os argilosos até os arenosos com pH entre 5.0 – 8.5, além disso, também apresenta tolerância a solos salinos. A cultura se desenvolve em altitudes que variam entre o nível do mar e 1000 m, sendo também possível cultivá-la em altitudes de até 2300 m em regiões situadas nas latitudes entre 40° N a 40° S. O sorgo pode se desenvolver em locais de baixa pluviosidade com precipitação média anual variando entre 750 – 400 mm. Além disso, apresenta temperatura ótima para o crescimento na faixa de 25 – 31°C, não resistindo a temperaturas abaixo de 15°C (LIM, 2013). Por se tratar de uma planta com metabolismo fotossintético do tipo C₄ (ISHIKAWA *et al.*, 2009; TARI *et al.*, 2013), o sorgo necessita de grande quantidade de luz para seu desenvolvimento ideal (LIM, 2013).

Segundo Sutka *et al.* (2016) *S. bicolor* é considerada uma espécie tolerante a seca. Esta capacidade de tolerância tem sido atribuída a fatores fisiológicos, bioquímicos, morfológicos e genéticos (BUCHANAN *et al.*, 2005; TARI *et al.*, 2013; NGARA; NDIMBA, 2014). Como exemplo, pode-se citar o profundo sistema radicular, a cutícula espessa e cerosa, a capacidade de ajuste osmótico, a diversidade de genes e alelos relacionados à tolerância e o metabolismo fotossintético do tipo C₄, o qual permite alta taxa fotossintética mesmo sob condições de déficit hídrico (BUCHANAN *et al.*, 2005; TARI *et al.*, 2013; NGARA; NDIMBA, 2014). Sendo assim, por se tratar de uma espécie cultivada e comprovadamente tolerante ao déficit hídrico, Ngara e Ndimba (2014) sugerem o uso do sorgo como planta modelo para estudos sobre a seca, uma vez que esta espécie apresenta o genoma sequenciado e disponível publicamente (PATERSON *et al.*, 2009; NGARA; NDIMBA, 2014).

3. OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo investigar as respostas fisiológicas, bioquímicas e epigenéticas de *Sorghum bicolor* (L.) Moench durante e após o segundo evento de déficit hídrico. Além disso, também objetiva-se compreender as vantagens e desvantagens de eventos recorrentes de seca para a tolerância e crescimento.

4. HIPÓTESES

Para este estudo foram formuladas duas hipóteses que são:

1) Plantas da espécie *Sorghum bicolor* (L.) Moench que passaram por evento de déficit hídrico na fase juvenil do desenvolvimento apresentarão respostas fisiológicas, antioxidativas, de ajuste osmótico e epigenéticas que caracterizem a ocorrência da impressão do estresse. Entretanto, o crescimento de plantas submetidas ao segundo evento será reduzido. Tal fato indicaria que a experiência prévia ao déficit hídrico condiciona a espécie apresentar uma estratégia de sobrevivência em detrimento do crescimento.

2) Plantas de *S. bicolor* com experiência prévia ao déficit hídrico no início do desenvolvimento apresentarão maior adição e manutenção a longo prazo da marca epigenética H3K4me3, responsável pelo estado de predisposição a transcrição, no nucleossomo do gene Sb04g038610 (*similar to Class III peroxidase 32 precursor*) durante a reidratação do segundo evento de déficit hídrico.

5. CAPÍTULO I: Impressão do estresse e suas consequências em *Sorghum bicolor* (L.) Moench: Respostas fisiológicas, bioquímicas e epigenéticas ao déficit hídrico recorrente.

Conforme estabelecido pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), os resultados obtidos neste estudo foram reunidos em um único capítulo intitulado “Impressão do estresse e suas consequências em *Sorghum bicolor* (L.) Moench: Respostas fisiológicas, bioquímicas e epigenéticas ao déficit hídrico recorrente”, o qual foi redigido na forma de artigo para ser submetido ao periódico científico “Journal of experimental botany”

Luís Paulo Benetti Mantoan^{1*} (luismantoan@gmail.com), Carla Verônica Corrêa² (cvcorrea1509@gmail.com), Claudia Aparecida Rainho³ (claudia.rainho@unesp.br), Luiz Fernando Rolim de Almeida¹ (luiz.rolim@unesp.br).

¹Departamento de Botânica, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu-SP, CEP:18618-970, Brasil

²Departamento de Horticultura, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu-SP, CEP:18.610-307, Brasil

³Departamento de Genética, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu-SP, CEP:18618-970, Brasil

*Autor correspondente: luismantoan@gmail.com, telefone: (55 14 3880 0116)

Highlight: *Sorghum bicolor* apresenta maior tolerância ao evento recorrente de seca, além de manter a marca de memória H3K4me3 no gene Sb04g038610 após reidratação, contudo, o crescimento é prejudicado.

5.1. Resumo

Plantas que presenciam à seca podem armazenar informações sobre esta experiência, tal como uma marca ou impressão deixada por este estresse. As informações adquiridas com a impressão do estresse podem ser utilizadas para aumentar a tolerância a futuros eventos de déficit hídrico, porém, o crescimento das plantas pode ser limitado. O objetivo deste estudo foi investigar as respostas fisiológicas, bioquímicas e epigenéticas de *Sorghum bicolor* (L.) Moench durante e após o segundo evento de déficit hídrico, bem como as vantagens e desvantagens de eventos recorrentes de seca para a tolerância e crescimento. Mesmo com o intervalo entre o primeiro e o segundo evento de seca, o que poderia resultar na remoção da impressão do estresse formada no primeiro evento, as respostas fotossintéticas, antioxidativas, morfo-anatomicas e de estado hídrico demonstraram que plantas de *S. bicolor* apresentaram maior tolerância a seca durante o déficit hídrico recorrente em relação às plantas submetidas a apenas um evento de déficit. Além disso, plantas sob seca recorrente apresentaram maior ocorrência da marca de “memória” epigenética H3K4me3 no gene Sb04g038610 durante a seca e reidratação, sendo a H3K4me3 mantida durante a reidratação de plantas submetidas à seca única e recorrente por seis dias. Contudo, a massa seca da parte aérea e a área foliar de plantas sob seca recorrente foi reduzida em relação a plantas sob seca única. Desta forma, conclui-se que *S. bicolor* apresenta impressão do estresse por déficit hídrico a longo prazo, pois durante o segundo evento de seca as plantas apresentam maior tolerância e presença, com posterior manutenção, da H3K4me3. Entretanto, o crescimento destas plantas é prejudicado.

Palavras-chave: H3K4me3, “Memória” do estresse, Planta cultivada, Reidratação, Seca recorrente, Sorgo.

5.2. Introdução

As mudanças climáticas têm aumentado a frequência dos estresses abióticos, tal como a seca, influenciando negativamente as comunidades vegetais e diminuindo a capacidade de aclimação e tolerância ao déficit hídrico, pois o curto período de recuperação entre dois eventos de seca pode resultar no acúmulo de danos do primeiro evento (HEGERL; HANLON; BEIERKUHNLEIN, 2011; MIN *et al.*, 2011; WALTER *et al.*, 2013). Sendo assim, segundo Kreps *et al.* (2002), Bruce *et al.* (2007) e Walter *et al.* (2013) as plantas que passam por frequentes eventos de déficit hídrico precisam ser capazes de apresentar ajustes em suas respostas de forma que ocorra aumento na resistência a futuros eventos de déficit hídrico.

Existem evidências que certos processos fisiológicos em plantas são modificados por eventos de estresse anteriores (WALTER *et al.*, 2013). Como exemplo, pode-se citar a espécie *Sorghum bicolor* (L.) Moench, a qual não sobrevive a concentrações de 0.3 mol/L de NaCl. Porém, a mesma espécie sobrevive a tal concentração após 20 dias de pré-tratamento em concentrações não letais de NaCl (0.15 mol/L) (AMZALLAG; LERNER; POLJAKOFF-MAYBER, 1990). Em outro estudo Walter *et al.* (2011) observaram aumento na fotoproteção e maior biomassa fresca em *Arrhenatherum elatius* (L.) submetida ao segundo evento de seca em relação a plantas sob evento único deste estresse. Consequentemente, os autores concluíram que *A. elatius* apresentou e manteve impressão do estresse para o déficit hídrico, o que facilitou uma resposta rápida ao estresse recorrente.

A impressão do estresse, também chamada de “memória” do estresse, ocorre quando a planta, a qual possui uma experiência prévia de estresse, apresenta melhora nas respostas de resistência quando submetida a recorrentes experiências deste estresse (BRUCE *et al.*, 2007; WALTER *et al.*, 2011; WALTER *et al.*, 2013). Respostas de defesa ao estresse associadas aos processos bioquímicos e fisiológicos são mais rápidas e/ou mais fortes em plantas que apresentam impressão do estresse (MARTINEZ-MEDINA *et al.*, 2016). Como exemplo, Li *et al.* (2014) verificaram aumento na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e ascorbato peroxidase de folhas de trigo no segundo evento de exposição a baixas temperaturas, o que demonstrou que a exposição prévia ao frio aumentou a capacidade de defesa antioxidativa no segundo evento. Além dos parâmetros bioquímicos, o monitoramento de parâmetros fisiológicos como o conteúdo relativo de água na folha, fotossíntese e crescimento também podem indicar, durante o evento recorrente de seca, a ocorrência da impressão do estresse (NEVES *et al.*, 2017).

Modificações fisiológicas ocasionadas pela impressão do estresse podem ser decisivas em face de repetidos eventos deste estresse e podem estimular o rápido início dos mecanismos de proteção e de resistência a eventos recorrentes (CONRATH *et al.*, 2006; BRUCE *et al.*, 2007; WALTER *et al.*, 2011; WALTER *et al.*, 2013). Sendo assim, a compreensão dos mecanismos que levam a impressão do estresse poderia ter implicações positivas para o cultivo de espécies agrícolas e para a restauração de áreas naturais onde a seca é frequente. Contudo, ainda não há consenso sobre as possíveis consequências desta impressão para o crescimento e para a produtividade das plantas (CHINNUSAMY; ZHU, 2009; WALTER *et al.*, 2013).

O estresse ambiental frequentemente leva a modificações em proteínas histonas, as quais estão associadas ao DNA, e como consequência desta alteração a expressão de diversos genes de tolerância pode ser ativada sem que haja qualquer modificação na sequência de nucleotídeos (JASKIEWICZ; CONRATH; PETERHÄNSEL, 2011; AVRAMOVA, 2015; KIM *et al.*, 2015; HE; LI, 2018). As modificações de histonas podem permanecer durante toda a vida da planta, sendo propagadas por meio de divisões mitóticas (“memória” somática), tais modificações permanentes são consideradas marcas epigenéticas (SANI *et al.*, 2013; AVRAMOVA, 2015; HE; LI, 2018). Estas marcas são mantidas mesmo após a completa recuperação do estresse, o que resulta em um mecanismo epigenético de impressão do estresse favorecendo a rápida ativação de genes de tolerância durante eventos recorrentes de estresse (AVRAMOVA, 2015; MARTINEZ-MEDINA *et al.*, 2016; HE; LI, 2018).

Apesar de serem vantajosas, as modificações de histonas, bem como a manutenção destas, consomem os recursos das plantas. Sendo assim, é comum que sejam deletadas com o fim do estímulo estressante, a fim de garantir o desenvolvimento e o crescimento normal da planta (BAROUX *et al.*, 2011; CRISP *et al.*, 2016; MARTINEZ-MEDINA *et al.*, 2016; TAO *et al.*, 2017). Segundo, Crisp *et al.* (2016), é no período de recuperação do déficit hídrico em que a planta deve escolher entre a consolidação da impressão do estresse, a fim de aumentar a tolerância a futuros eventos de seca, ou se deleta esta impressão, a fim de evitar a redução no crescimento.

A trimetilação da lisina localizada na posição 4 da cauda amino terminal da histona H3 (H3K4me3) é uma importante marca epigenética responsável por ativar a transcrição genica, deixando o gene em um estado permissível ao acesso da maquinaria de transcrição (BERGER, 2007; BRUCE *et al.*, 2007; GARCIA *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2010; BANNISTER; KOUZARIDES, 2011; LIJSEBETTENS; GRASSER, 2014). Em estudo realizado por Kim *et al.* (2012) em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. submetida a seca em condições de laboratório,

foi demonstrado que a H3K4me3 permanece nos genes de tolerância *RD20* e *RD29A* após cinco horas de reidratação. Em outro estudo realizado por Ding, Fromm e Avramova (2012) também foi observado a manutenção da H3K4me3 em *A. thaliana* após cinco dias de reidratação, o que demonstra que a H3K4me3 pode atuar como uma marca de “memória” epigenética pós estresse (HE; LI, 2018). Contudo, segundo Ngara e Ndimba (2014) *A. thaliana* não seria o melhor modelo para estudos de tolerância a seca, uma vez que tal espécie não é reconhecidamente resistente a tal estresse. Sendo assim, uma planta modelo com reconhecida capacidade de tolerância a seca, como a espécie *S. bicolor*, seria o modelo mais adequado.

Estudos que relacionem as respostas moleculares, bioquímicas e os demais parâmetros funcionais são necessários para a real compreensão das respostas das plantas aos recorrentes eventos de seca, bem como as possíveis consequências da manutenção da impressão do estresse para o crescimento (CHINNUSAMY; ZHU, 2009; WALTER *et al.*, 2011; WALTER *et al.*, 2013; VRIET; HENNIG; LALOI, 2015; MARTINEZ-MEDINA *et al.*, 2016). Além disso, existe o desafio de determinar por quanto tempo a impressão do estresse permanece na planta após o primeiro evento de estresse (HAN; WAGNER, 2014).

Desta forma, para este estudo foram formuladas duas hipóteses que são: 1) Plantas da espécie *Sorghum bicolor* (L.) Moench que passaram por evento de déficit hídrico na fase juvenil do desenvolvimento apresentarão respostas fisiológicas, antioxidativas, de ajuste osmótico e epigenéticas que caracterizem a ocorrência da impressão do estresse. Entretanto, o crescimento de plantas submetidas ao segundo evento será reduzido. Tal fato indicaria que a experiência prévia ao déficit hídrico condiciona a espécie apresentar uma estratégia de sobrevivência em detrimento do crescimento. 2) Plantas de *S. bicolor* com experiência prévia ao déficit hídrico no início do desenvolvimento apresentarão maior adição e manutenção a longo prazo da marca epigenética H3K4me3, responsável pelo estado de predisposição a transcrição, no nucleossomo do gene Sb04g038610 (*similar to Class III peroxidase 32 precursor*) durante a reidratação do segundo evento de déficit hídrico.

Por fim, este estudo teve como objetivo investigar as respostas fisiológicas, bioquímicas e epigenéticas de *Sorghum bicolor* (L.) Moench durante e após o segundo evento de déficit hídrico. Além disso, também objetiva-se compreender as vantagens e desvantagens de eventos recorrentes de seca para a tolerância e crescimento.

5.3. Material e métodos

5.3.1. Área experimental e cultivo

O presente estudo foi dividido em dois experimentos, sendo ambos realizados em casa de vegetação localizada no Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da UNESP (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”) de Botucatu-SP. Para o primeiro experimento foi realizada análises de trocas gasosas, fluorescência da clorofila a, conteúdo relativo de água na folha, área foliar, massa seca da parte aérea e densidade estomática. Para o segundo experimento foi realizada análises de trocas gasosas, fluorescência da clorofila a, conteúdo relativo de água na folha, atividade de enzimas antioxidativas, conteúdo de H₂O₂, peroxidação lipídica, conteúdo de açúcares totais, conteúdo de sacarose e ocorrência da trimetilação da lisina 4 da histona H3 (H3K4me3) no gene Sb04g038610.

Para os dois experimentos foram utilizadas sementes de sorgo granífero (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) da variedade BRS 332 fornecidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa milho e sorgo) no município de Sete Lagoas-MG. O cultivo foi realizado de forma semelhante para os dois experimentos, porém, o primeiro ocorreu entre janeiro a abril de 2017 e o segundo entre setembro a novembro de 2017. A semeadura foi realizada em bandejas de isopor de 72 células preenchidas com substrato do tipo vermiculita expandida de textura média e irrigadas uma vez por dia até se observar percolação. Durante a segunda semana de semeadura em bandejas uma irrigação com solução de Hoagland e Arnon (1950) a 25% de força iônica foi realizada como forma de adubação.

Após 15 dias de semeadura, plantas de sorgo com aproximadamente 12 cm de altura foram retiradas das bandejas onde foram cultivadas e suas raízes foram lavadas para a remoção do substrato. Em seguida, estas plantas foram separadas em dois grupos, sendo o primeiro sem a indução de déficit hídrico aos 15 dias após a semeadura (DAS) (“fase juvenil”) e o segundo grupo com a indução do déficit hídrico na “fase juvenil” seguido de reidratação. As plantas do primeiro grupo foram transplantadas para vasos de 12 L, onde se utilizou duas plantas por vaso. Estas foram mantidas irrigadas até o início dos tratamentos de suspensão de irrigação, o que ocorreu aos 49 DAS para o primeiro experimento e 54 DAS para o segundo experimento, momento em que as folhas se apresentaram completamente expandidas no porte “adulto” (“fase adulta”). As plantas do segundo grupo foram removidas das bandejas e suas raízes também foram lavadas com água para a remoção do substrato. Em seguida, estas plantas foram deixadas sobre bancada ao ar livre por duas horas e meia para induzir a deficiência hídrica. Após este período, estas plantas também foram transplantadas para vasos de 12 L com duas plantas por

vaso, onde foram mantidas irrigadas até o início dos tratamentos de suspensão de irrigação na “fase adulta”.

Para confirmar a ocorrência do déficit hídrico no grupo de plantas com indução deste estresse na “fase juvenil” após o período de duas horas e meia sobre a bancada, a parte aérea de 12 plantas do primeiro grupo (sem indução de estresse) e de 12 plantas do segundo grupo (com indução de estresse) foram recortadas e separadas em quatro repetições por grupo. Estas foram usadas para medir o potencial hídrico das plantas sem e com indução ao déficit hídrico por meio de psicrômetro gerador de ponto de orvalho modelo WP4-T (Decagon Devices, USA), onde se verificou, por meio de teste t ($P < 0.05$), redução significativa no potencial hídrico das plantas com indução ao déficit hídrico na “fase juvenil” em relação às plantas sem indução de déficit tanto no primeiro experimento como no segundo experimento (tabela 1).

Tabela 1: Média ($n=4$) do potencial hídrico da parte aérea (MPa) de plantas de *Sorghum bicolor* com e sem indução de déficit hídrico na “fase juvenil” (15 DAS) por 2:30 h no primeiro experimento e no segundo experimento.

Tratamento	Potencial hídrico da parte aérea (MPa)	Potencial hídrico da parte aérea (MPa)
	1º Experimento	2º Experimento
Sem indução de déficit hídrico por 2:30 h	-1.45 a ± 0.21	-1.59 a ± 0.08
Com indução de déficit hídrico por 2:30 h	-2.42 b ± 0.14	-1.96 b ± 0.14

Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa entre tratamentos pelo teste t ($P < 0.05$).

Como substrato para os vasos em ambos os experimentos foi utilizado solo corrigido conforme descrito por Wiethölter *et al.* (2004) para a cultura do sorgo. Além disso, durante todo o período de crescimento as plantas receberam uma vez por semana solução de Hoagland e Arnon (1950) a 50% de força iônica como forma de complementar a adubação.

5.3.2. Delineamento experimental

Para ambos os experimentos foram utilizados quatro tratamentos, os quais foram formados a partir das plantas de sorgo sem a indução do déficit hídrico e com indução do déficit hídrico na “fase juvenil”, descritas na seção “Área experimental e cultivo”, sendo os tratamentos nomeados e descritos a seguir:

1) Controle: plantas sem indução do déficit hídrico na “fase juvenil” foram transplantadas para os vasos e irrigadas em dias alternados durante todo o experimento.

2) Déficit Hídrico na Fase Juvenil (DHFJ): plantas com indução do déficit hídrico na “fase juvenil” foram transplantadas para vasos e irrigadas em dias alternados durante todo o restante do experimento.

3) Déficit Hídrico na Fase Adulta (DHFA): plantas sem a indução do déficit hídrico na “fase juvenil” foram transplantadas para vasos e irrigadas até a “fase adulta”, sendo na “fase adulta” o momento no qual estas plantas foram expostas ao seu primeiro evento de déficit hídrico por suspensão de irrigação com posterior reidratação.

4) Déficit Hídrico Recorrente (DHR): plantas com a indução do déficit hídrico na “fase juvenil” foram transplantadas para vasos e irrigadas até a “fase adulta”, sendo na “fase adulta” o momento no qual estas plantas foram expostas ao seu segundo evento de déficit hídrico por suspensão de irrigação com posterior reidratação.

O delineamento experimental do primeiro experimento foi realizado em blocos casualizados com quatro tratamentos e cinco repetições, sendo utilizados 110 vasos com 2 plantas por vaso, totalizando 220 plantas. Para os quatro tratamentos foram utilizados 20 plantas para as análises de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* realizadas no último dia de déficit hídrico e no primeiro, segundo, terceiro, quarto e sexto dia após reidratação (54, 55, 56, 57, 58 e 60 DAS, respectivamente), 40 plantas para as análises de conteúdo relativo de água na folha realizadas no último dia de déficit hídrico e no primeiro dia de reidratação (54 e 55 DAS, respectivamente), 20 plantas para avaliar a densidade estomática e densidade estomática total após 27 dias de reidratação (81 DAS) e 140 plantas para avaliar a área foliar e a massa seca de caule e folha aos 15, 30, 49, 54, 64, 80 e 125 DAS.

O delineamento experimental do segundo experimento foi realizado em blocos casualizados com quatro tratamentos e cinco repetições, sendo utilizados 97 vasos com 2 plantas por vaso, totalizando 194 plantas. Para os quatro tratamentos foram utilizados 20 plantas para as análises de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* no último dia de déficit hídrico e no primeiro, segundo, terceiro e sétimo dia após reidratação (66, 67, 68, 69 e 73 DAS), 40 plantas para as análises de conteúdo relativo de água na folha no último dia de déficit hídrico e no segundo dia de reidratação (66 e 68 DAS), 80 plantas para avaliar o conteúdo de açúcares solúveis totais, o conteúdo de sacarose, o conteúdo de peróxido de hidrogênio, nível de peroxidação lipídica e a atividade das enzimas superóxido dismutase, peroxidase e catalase no último dia de déficit hídrico e no segundo dia de reidratação (66 e 68 DAS) e 54 plantas para quantificar a ocorrência de trimetilação na lisina 4 da histona 3 (H3K4me3) no gene

Sb04g038610 em três repetições dos tratamentos Controle, DHFA e DHR no último dia de déficit hídrico e no segundo e sexto dia após reidratação (66, 68 e 72 DAS).

No período entre 49 – 54 DAS ocorreu a suspensão de irrigação dos tratamentos DHFA e DHR do primeiro experimento, enquanto que no segundo experimento a suspensão de irrigação ocorreu no período entre 54 – 66 DAS. O conteúdo de água no solo entre 30 – 20 % foi usado como critério para definir o limite da suspensão de irrigação e início da reidratação dos tratamentos DHFA e DHR de ambos os experimentos. Além disso, critérios visuais como enrolamento das folhas e observação da murcha das folhas também influenciaram na decisão do momento da reidratação.

Os dados de temperatura (°C) e umidade relativa do ar (%) desde o início dos tratamentos até o final das avaliações de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* do primeiro e segundo experimento encontram-se nas figuras suplementares 1 e 2, respectivamente.

5.3.3. Irrigação e conteúdo de água no solo (CAS)

Até os 15 DAS às plantas de sorgo semeadas em bandejas de isopor contendo vermiculita como substrato foram irrigadas diariamente até se observar percolação. Após este período, as plantas foram transplantadas para vasos de 12 L contendo terra, como descrito na seção “Área experimental e cultivo”.

Nos vasos a irrigação e a perda de água foram monitoradas pelo método gravimétrico. Para isso, antes do transplante, cada recipiente vazio (vasos) utilizado no experimento foi pesado individualmente e sua massa foi anotada. Em seguida, em cada vaso foi adicionado terra seca até a massa do vaso e da terra seca somarem 10 kg, sendo este conjunto nomeado como Massa do Vaso com 0 % de retenção de água ($MV_{0\% \text{ de retenção}}$). Posteriormente, cada vaso foi irrigado com água até se observar o início da percolação, os quais ficaram em repouso durante o período noturno para que toda a água gravitacional fosse perdida. No início da manhã seguinte, os vasos irrigados (recipiente + terra + água) foram pesados e sua massa foi anotada para ser usada como Massa dos Vasos na capacidade máxima de retenção de água ($MV_{100\% \text{ de retenção}}$).

Durante o primeiro e segundo experimento, os vasos foram pesados em dias alternados para a obtenção da Massa dos Vasos de cada tratamento ($MV_{\text{tratamento}}$). A partir desta massa, foi calculado o conteúdo de água no solo (CAS), em porcentagem, por meio da fórmula ($CAS =$

$(MV_{\text{tratamento}} - MV_{0\% \text{ de retenção}})/(MV_{100\% \text{ de retenção}} - MV_{0\% \text{ de retenção}})*100$). Antes do início dos tratamentos e após a reidratação todos os vasos foram mantidos com CAS entre 90 – 75 %. Durante o período de suspensão de irrigação o CAS dos tratamentos Controle e DHFJ foi padronizado entre 90 – 75 %, enquanto que nos tratamentos DHFA e DHR a irrigação foi interrompida.

5.3.4. Conteúdo relativo de água na folha (CRA_{Folha})

O conteúdo relativo de água na folha (CRA_{Folha}) do primeiro experimento foi avaliado as 6 h no último dia de déficit hídrico (54 DAS) e no primeiro dia de reidratação (55 DAS), enquanto que no segundo experimento o CRA_{Folha} foi avaliado as 6 h no último dia de déficit hídrico (66 DAS) e no segundo dia de reidratação (68 DAS).

Para a avaliação do CRA_{Folha} em ambos os experimentos foram utilizadas cinco repetições por tratamento, sendo que de cada planta foi recortada da primeira ou segunda folha completamente expandida um quadrado de 2 cm x 2 cm, o qual foi pesado para determinação da massa fresca (MF). Após a pesagem, a amostra foi imersa em água deionizada por 24 horas a 4°C para a determinação da massa túrgida (MT). Em seguida, a amostra foi levada para estufa de circulação forçada de ar a 65°C até atingir massa constante para a determinação da massa seca (MS). Os valores das massas foram usados na fórmula proposta por Weatherley (1949), $CRA_{\text{Folha}} = (MF - MS)/(MT - MS) * 100$, para a determinação do CRA_{Folha} .

5.3.5. Densidade estomática e densidade estomática relativa à área foliar

Para avaliar a densidade estomática e a densidade estomática relativa à área foliar foi utilizada a técnica da impressão do estômato em cola, a qual foi adaptada de Segatto *et al.* (2004). Estas análises foram realizadas no primeiro experimento em cinco repetições por tratamento após 27 dias de reidratação (81 DAS), momento em que foi possível coletar a impressão estomática de folhas de diferentes idades, ou seja, as que presenciaram o déficit hídrico aos 49 – 54 DAS (folhas velhas) e as que surgiram no período de reidratação e que não presenciaram este estresse (folhas novas). Além disso, tanto em folhas velhas como em folhas novas, foi coletada a impressão estomática das posições abaxial e adaxial das folhas de cada tratamento.

Na técnica da impressão estomática em cola, utilizou-se lamina de microscópio com uma gota de cola universal (super bonder®) em cada lamina. Estas lamina foram pressionadas por 40 segundos na face adaxial e abaxial de folhas velhas e novas para formar a impressão dos

estômatos sobre as laminas. Em seguida, as laminas foram fotografadas por meio de câmera fotográfica acoplada ao microscópio de luz (Olympus, Japão) utilizando o aumento de 20x. Posteriormente, as fotos foram analisadas no software Cell[^]B (Olympus, Japão) por meio do qual foi medida a área da região fotografada (0.326 mm^2) e realizada a contagem do número de estômatos.

A densidade estomática de cada tratamento na posição abaxial e adaxial tanto de folhas novas como de folhas velhas foi calculada a partir do número de estômatos dividido pela área da foto (N° de estômatos/ mm^2). Para calcular a densidade estomática relativa à área foliar de cada tratamento utilizou-se o número de estômatos de cada repetição, a área da foto em cm^2 (0.00326 cm^2) e a área foliar total de cada repetição coletada aos 80 DAS. Estes dados foram utilizados na seguinte relação: densidade estomática relativa à área foliar = (N° de estômatos $\times$ área foliar do tratamento) / 0.00326 .

5.3.6. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*

As medidas de trocas gasosas e de fluorescência da clorofila *a* foram realizadas ao mesmo tempo por meio de um analisador de gás CO_2 e vapor d'água por radiação infravermelha (Infra Red Gas Analyser – IRGA, modelo GSF 3000, Walz, Alemanha) acoplado a um fluorômetro de pulso modulado. As avaliações foram realizadas no primeiro experimento no período das 11 horas no último dia de déficit hídrico e no primeiro, segundo, terceiro, quarto e sexto dia após reidratação (54, 55, 56, 57, 58 e 60 DAS), enquanto que no segundo experimento as avaliações ocorreram as 11 h no último dia de déficit hídrico e no primeiro, segundo, terceiro e sétimo dia após reidratação (66, 67, 68, 69 e 73 DAS). Para ambos os experimentos foi utilizado cinco repetições de cada tratamento padronizando a primeira ou segunda folha completamente expandida.

As configurações utilizadas no IRGA durante as medidas de trocas gasosas foram padronizadas da seguinte forma: CO_2 e H_2O de referência de acordo com o ambiente, “flow” em $750 \mu\text{mol/s}$ (recomendação de fábrica), temperatura e umidade relativa da câmara de acordo com o ambiente e a densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) em $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Os parâmetros de trocas gasosas avaliados foram: assimilação de CO_2 (A_{Net}), condutância estomática (g_s), transpiração (E) e eficiência de uso da água (EUA).

Para as análises de fluorescência da clorofila *a*, foi aplicado um pulso de luz com $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de DFFFA para a obtenção da fluorescência estável (F_s) no momento em que as

leituras de trocas gasosas estiveram estáveis. Em seguida, um pulso de saturação de $10000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de DFFFA com 0.6 segundos foi aplicado para a obtenção da fluorescência máxima da folha sob luz (F_M'), seguido da fluorescência mínima da folha sob luz (F_O'). A partir destes dados foram calculados os seguintes parâmetros: rendimento quântico efetivo (Φ_{PSII}), o “quenching” fotoquímico (qP), o rendimento quântico máximo do PSII na luz (F_V'/F_M'), fração da energia dissipada pelas antenas como calor na condição de luz (D) e fração do excesso de energia não dissipada pelas antenas e não utilizadas fotoquimicamente na condição de luz (Ex).

Além destes parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, também foi avaliado o rendimento quântico máximo do PSII (F_V/F_M). Para isso, foi utilizado um fluorômetro de pulso modulado modelo Jr-PAM (Walz, Alemanha), estas medidas ocorreram no primeiro experimento em cinco repetições por tratamento no período das 5, 10 e 18 horas aos 54, 55, 58 e 60 DAS utilizando a primeira ou segunda folha completamente expandida, a qual foi adaptada ao escuro por 30 minutos envolvendo-a com papel alumínio. Durante cada medida, foi obtida a fluorescência mínima da folha sob escuro (F_O) seguido de um pulso de saturação de $10000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de DFFFA com 0.6 segundos, a fim de se obter a fluorescência máxima da folha sob escuro (F_M). Por meio destes dados foi calculado o F_V/F_M a partir da fórmula ($F_V/F_M = (F_M - F_O)/F_M$).

5.3.7. Área foliar e massa seca da parte aérea

A determinação da área foliar e da massa seca da parte aérea foi realizada no primeiro experimento em cinco repetições por tratamento aos 15, 30, 49, 54, 64, 80 e 125 DAS. Durante as coletas, as plantas foram separadas em folhas e caules, sendo que a área foliar (AF, cm^2) foi imediatamente determinada em aparelho integralizador óptico de área modelo Li 3100 (LI-COR, USA). Em seguida, tanto as folhas como os caules foram embalados separadamente em sacos de papel e levados para a secagem em estufa de circulação forçada de ar a 65°C até obtenção de massa constante. A massa seca de folha (MSF) e de caule (MSC) de cada coleta foi anotada para se calcular a massa seca total (MST). Aos 80 e 125 DAS ocorreu a formação das hastes das flores, flores e das sementes, as quais também foram coletadas e separadas em sacos de papel para posterior secagem em estufa, como descrito anteriormente, sendo estes dados de massa seca computados na massa seca total.

5.3.8. *Conteúdo de peróxido de hidrogênio e nível de peroxidação lipídica*

No segundo experimento foi avaliado o conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o nível de peroxidação lipídica. Para isso, foram coletadas a primeira e segunda folha completamente expandida de cinco repetições por tratamento no último dia de déficit hídrico e no segundo dia de reidratação (66 e 68 DAS) no período das 6 h. Estas folhas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, onde foram completamente maceradas com auxílio de almofariz e pistilo, para posteriormente serem armazenadas em freezer $-80^{\circ}C$ até o início das avaliações.

O conteúdo de H_2O_2 foi determinado de acordo com o método de Alexieva *et al.* (2001) descrito por Sperotto (2014), com algumas modificações, utilizando cinco repetições biológicas e duas repetições técnicas. Para a obtenção do extrato de H_2O_2 foram utilizadas amostras de 200 mg de tecido foliar macerado, o qual foi acondicionado em tubos de microcentrifuga de 2 ml. Em cada amostra foi adicionado 2 ml de ácido tricloroacético 0.1%, onde as amostras foram homogeneizadas por agitação vigorosa em vortex por 1 minuto. Em seguida, o material homogeneizado foi centrifugado a temperatura ambiente a 12000 rpm por 15 minutos, onde o sobrenadante resultante foi coletado e armazenado em um novo tubo de microcentrifuga de 2 ml a $-20^{\circ}C$ até o início da avaliação.

Em tubos de ensaio de 5 ml ocorreu a montagem do meio de reação para a determinação do conteúdo de H_2O_2 . Para isso, em cada tubo foi adicionado 500 μ l de tampão fosfato de potássio 0.1 M (pH 7.0), 500 μ l do extrato de H_2O_2 e 2 ml de iodeto de potássio 1 M. Em seguida, este meio de reação foi acondicionado no escuro por 1 hora. Após este tempo, o meio de reação foi levado para a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 390 nm, utilizando cubeta de vidro. Entretanto, antes das leituras, o aparelho foi zerado utilizando o mesmo meio de reação como branco, porém, substituindo o extrato de H_2O_2 por H_2O deionizada. Para os cálculos da concentração de H_2O_2 foi utilizada curva padrão de H_2O_2 com concentrações conhecidas (20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280 e 300 μ M). Os resultados obtidos foram expressos como μ M de H_2O_2 g^{-1} de massa fresca.

O nível de peroxidação lipídica foi avaliado conforme o método de Janero (1990), com algumas modificações, utilizando cinco repetições biológicas e duas repetições técnicas. Para este método, amostras com 200 mg de tecido foliar macerado foram acomodados em tubos falcon de 15 ml, nos quais foi adicionado 4 ml de ácido tricloroacético 1%. Estas amostras foram homogeneizadas por meio de agitação vigorosa em vortex por 1 minuto seguido de centrifugação a temperatura ambiente a 4500 rpm por 30 minutos. Após centrifugação o

sobrenadante foi retirado e transferido para novo tubo falcon de 15 ml, o qual foi armazenado em freezer -20°C até o início das avaliações.

Em tubos falcon de 15 ml novos, foi montado o meio de reação para a determinação do nível de peroxidação lipídica. Para isso, em cada tubo foi adicionado 1 ml de sobrenadante da etapa anterior e 3 ml de uma solução composta por ácido tiobarbitúrico 0.5% e ácido tricloroacético 20%. Estes tubos foram fechados com suas respectivas tampas e incubados em banho maria a 95°C por 60 minutos. Em seguida, os tubos foram submetidos ao choque térmico, mergulhando-os em água fria por 1 minuto. Posteriormente, os tubos foram levados para a leitura da absorbância em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 532 nm e 660 nm, utilizando cubetas de vidro, onde o branco do espectrofotômetro foi realizado com o mesmo meio de reação descrito anteriormente, porém, usando H₂O deionizada no lugar do sobrenadante. Para calcular o nível de peroxidação lipídica foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 155 mM⁻¹ cm⁻¹, sendo os resultados expressos em mol de malondialdeído (MDA) por grama de massa fresca.

5.3.9. Obtenção do extrato bruto para determinação de proteínas solúveis totais e atividade enzimática foliar

A determinação do conteúdo de proteínas solúveis totais e da atividade das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD) e catalase (CAT)) foi realizada no segundo experimento. Para isso, foram coletadas em cinco repetições por tratamento a primeira e segunda folha completamente expandida no último dia de déficit hídrico e no segundo dia de reidratação (66 e 68 DAS) no período das 6 horas. Estas folhas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, onde foram completamente maceradas com auxílio de almofariz e pistilo para posteriormente serem armazenadas em freezer -80°C.

Para a obtenção do extrato bruto, foram utilizadas por amostra 200 mg de material foliar macerado, o qual foi homogeneizado em 2 ml de tampão fosfato de potássio 0.1 M (pH 6.8) e 100 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP) com auxílio de almofariz e pistilo. Em seguida, as amostras foram transferidas para tubos de microcentrifuga de 2 ml, onde foram centrifugadas a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi transferido para novos tubos de microcentrifuga de 2 ml e armazenados em freezer -20°C. Este sobrenadante foi utilizado como extrato bruto para a determinação de proteínas solúveis totais e para a atividade da enzima SOD, POD e CAT de folhas.

5.3.10. Conteúdo de proteínas solúveis totais

O conteúdo de proteínas solúveis totais foi determinado de acordo com o método de Bradford (1976), com algumas modificações, utilizando cinco repetições biológicas por tratamento e duas repetições técnicas. O preparo da solução de Bradford foi realizado dissolvendo 100 mg de comassie brilliant blue G-250 em 50 ml de etanol 95%, seguido da adição de 100 ml de ácido fosfórico 85%. Esta solução foi dissolvida em H₂O deionizada até completar 1 L, em seguida, a mesma solução foi 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 µl 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, foi utilizada 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 µg µl⁻¹). Os resultados obtidos foram utilizados para calcular a atividade específica das enzimas antioxidantes descritas abaixo.

5.3.11. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) foi determinada de acordo com o método de Giannopolitis e Ries (1977), com algumas modificações, utilizando cinco repetições biológicas por tratamento e duas repetições técnicas. O princípio deste método consiste em avaliar a atividade da SOD mensurando a capacidade da enzima em inibir a formação de formazana pela fotoredução do azul de nitrotetrazólio cloreto (NBT) na presença de luz.

A reação foi montada em placas de cultura de células de 24 poços sob ausência de luz, sendo que em cada poço foram adicionados 50 µl de extrato bruto (descrito anteriormente) em 2.95 ml de uma solução contendo 0.05 M de tampão fosfato de potássio (pH 7.8), 13 mM de metionina, 75 µM de NBT, 0.1 µM de EDTA e 2 µM de riboflavina. A reação foi iniciada ao expor duas placas contendo as amostras a duas fontes de luz incandescentes de 100 W por cinco minutos. Após este período, o meio de reação foi levado para a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 560 nm utilizando cubeta de vidro. Para realizar o branco do aparelho foi utilizado o mesmo meio de reação descrito anteriormente, porém, sem exposição à luz. Além disso, em conjunto com as amostras, foi realizada uma reação controle

sem amostra em cada rodada de avaliações, cujos resultados deste controle mais amostra foram utilizados para calcular a atividade da SOD.

5.3.12. Atividade da enzima peroxidase (POD)

A atividade da peroxidase (POD; EC 1.11.1.7) foi determinada de acordo com o método de Peixoto *et al.* (1999), com algumas modificações, utilizando cinco repetições biológicas por tratamento e duas repetições técnicas. Neste método, a atividade da POD foi determinada pela ação desta enzima na conversão do ácido pirogálico em purpurogalina em conjunto com H_2O_2 .

A reação foi montada em tubos de ensaio de 10 ml contendo 100 μl do extrato bruto (descrito anteriormente), no qual foram adicionados 4.9 ml de uma solução contendo 0.025 M de tampão fosfato de potássio (pH 6.8), 20 mM de ácido pirogálico e 20 mM de H_2O_2 . Após um minuto de reação, a mesma foi interrompida pela adição de 500 μl de H_2SO_4 a 5%. Em seguida, o meio de reação foi levado para a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 420 nm utilizando uma cubeta de vidro. Para o branco do espectrofotômetro, foi utilizado o mesmo meio de reação contendo o ácido sulfúrico, porém, sem o extrato bruto. Para o cálculo da atividade da POD, foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 2.47 mM cm^{-1} .

5.3.13. Atividade da enzima catalase (CAT)

A atividade da catalase (CAT; EC 1.11.1.6) foi determinada de acordo com o método de Peixoto *et al.* (1999), com algumas modificações, utilizando cinco repetições biológicas por tratamento e duas repetições técnicas. O método consistiu na avaliação da atividade da CAT mensurando em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 240 nm, a redução na absorbância do H_2O_2 em função do tempo. Para isso, em uma cubeta de quartzo contendo 50 μl do extrato bruto (descrito anteriormente), foram adicionados 950 μl de uma solução de tampão fosfato de sódio 0.05 M (pH 7.0) enriquecido com H_2O_2 na concentração final de 12.5 mM.

Imediatamente após a adição do reagente, foi realizada a primeira leitura da absorbância, após 40 segundos foi realizada a segunda leitura da absorbância. A diferença entre a leitura 1 e a leitura 2 foi utilizada juntamente com o coeficiente de extinção molar do H_2O_2 (39.4 mM cm^{-1}) para se calcular a atividade da CAT. Como branco para o espectrofotômetro, foi utilizado apenas o tampão fosfato de sódio descrito anteriormente.

5.3.14. Extração e determinação do conteúdo de açúcares solúveis totais e sacarose

Na extração e determinação do conteúdo de açúcares solúveis totais e do conteúdo de sacarose realizada no segundo experimento, foram utilizadas cinco repetições por tratamento das quais foram coletadas a primeira e segunda folha completamente expandida no último dia de déficit hídrico e no segundo dia de reidratação (66 e 68 DAS) no período das 6 horas. Estas folhas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, onde foram maceradas com auxílio de almofariz e pistilo até formar um pó fino, sendo posteriormente armazenado em freezer -80°C.

Para a extração de açúcares foi utilizado o método de Garcia *et al.* (2006). Neste método, foram utilizados 100 mg de amostra foliar macerada em microtubos de 2 ml, no qual foi adicionado 1 ml de etanol 80% seguido de agitação vigorosa em vortex por 1 minuto. Em seguida, os tubos foram incubados em banho maria a 80°C por 15 minutos com posterior centrifugação a 12000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante obtido foi coletado e armazenado em tubo falcon de 15 ml. O procedimento de extração foi repetido mais duas vezes utilizando sempre o mesmo pellet resultante da centrifugação, sendo o sobrenadante de cada extração adicionado ao coletado anteriormente no tubo falcon de 15 ml. O volume do extrato de açúcares no final do processo de extração foi ajustado para 3 ml com H₂O deionizada e o mesmo foi armazenado em geladeira (4°C).

A determinação de açúcares solúveis totais ocorreu por meio do método do reagente de antrona descrito por Morris (1948) e Yemm e Willis (1954), sendo utilizados cinco repetições biológicas por tratamento e duas repetições técnicas. Para preparar o reagente de antrona, foram utilizados 222 mg de antrona em 100 ml de H₂SO₄.

O meio de reação foi formado pela adição de 50 µl do extrato de açúcares e 950 µl de H₂O deionizada em tubos de ensaio de 5 ml, onde ocorreu a adição de 2 ml do reagente de antrona. Após agitação vigorosa dos tubos em vortex, os mesmos foram levados para banho maria a 90°C por três minutos. Com o resfriamento dos tubos, as amostras foram levadas para a leitura da absorbância utilizando cubeta de vidro em espectrofotômetro no comprimento de onda de 620 nm. O branco para zerar o espectrofotômetro foi realizado com 2 ml do reagente de antrona e mais 1 ml de H₂O. Para o cálculo do conteúdo de açúcares solúveis totais foi utilizado uma curva padrão de glicose.

A determinação do conteúdo de sacarose foi realizada de acordo com o método de Passos (1996) utilizando cinco repetições biológicas por tratamento e duas repetições técnicas. Para este método foi utilizado o reagente de antrona, descrito anteriormente, e hidróxido de potássio 30%.

O meio de reação foi formado pela adição de 50 µl do extrato de açúcares e 50 µl de H₂O deionizada em tubos de ensaio de 5 ml contendo 100 µl de hidróxido de potássio 30%. Estes tubos foram agitados vigorosamente em vortex e levados para banho maria 90°C por 10 minutos. Após este tempo, com as amostras em temperatura ambiente, foi adicionado 2 ml do reagente de antrona. Estes tubos foram novamente agitados manualmente e incubados em banho maria 40°C por 10 minutos. Com os tubos em temperatura ambiente, as amostras foram levadas para a leitura da absorbância em cubeta de vidro utilizando espectrofotômetro no comprimento de onda de 620 nm. Para o branco do aparelho, foi utilizado o mesmo meio de reação descrito anteriormente, porém, no lugar do extrato foi utilizado H₂O deionizada. Para calcular a concentração de sacarose na folha, foi utilizada uma curva padrão de sacarose.

5.3.15. Imunoprecipitação da cromatina

Para quantificar a ocorrência da modificação da histona H3 causada pela adição de três grupos metil no aminoácido lisina localizada na posição 4 da porção amino terminal da proteína histona H3 (H3K4me3), foi utilizado o método de imunoprecipitação da cromatina associada a técnica de PCR quantitativa em tempo real. Por meio desta técnica, a H3K4me3 foi quantificada na região situada entre 246 – 144 pares de base acima do sitio de início de transcrição do gene Sb04g038610 (*similar to Class III peroxidase 32 precursor*), cujo acesso encontra-se no site: phytozome.jgi.doe.gov.

A quantificação da H3K4me3 ocorreu no segundo experimento no último dia de déficit hídrico e no segundo e sexto dia após reidratação (66, 68 e 72 DAS), sendo coletado a primeira e segunda folha completamente expandida de três repetições dos tratamentos Controle, DHFA, DHR no período entre 7 e 9 horas. Após a coleta, o material foliar fresco foi tratado como descrito por Heimann *et al.* (2013). Sendo assim, a nervura central das folhas foi removida e o material foliar foi cortado transversalmente até se obter 1 g. Em seguida, as amostras foram lavadas em H₂O deionizada autoclavada e secas em papel toalha. Estas amostras foram imersas em 37 ml de formaldeído 1% e submetidas ao vácuo por 10 minutos. Após este período, foram adicionados 2.5 ml de glicina a 2 M na solução de formaldeído contendo as amostras seguido de mais 5 minutos de infiltração a vácuo. Após a infiltração, as amostras foram lavadas três vezes em H₂O deionizada autoclavada e secas em papel toalha. Por fim, o material foliar tratado foi macerado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80°C.

A imunoprecipitação da cromatina foi realizada usando o kit “ChIP Kit - Plants®” (ab117137) da Abcam seguindo o protocolo do fabricante com algumas modificações. Dentre estas modificações estão à redução da quantidade de amostra de 1 g para 300mg e a redução do

volume dos reagentes em oito vezes até a etapa de sonicação. A etapa de sonicação das amostras foi realizada com sonificador Branson 250 utilizando 4 ciclos de 10 segundo com intervalos de 1 minuto no gelo. Por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% foi avaliada a eficiência da sonicação, onde se verificou fragmentos de DNA entre 1000 – 100 pares de base como descrito no protocolo do kit. Para a etapa de imunoprecipitação foram utilizados 2.5 µl do anticorpo policlonal “Anti-Histone H3 (tri methyl K4) antibody - ChIP Grade” (ab8580) da Abcam como descrito por Heimann *et al.* (2013) para cada amostra sonicada. O DNA purificado obtido no final do processo de imunoprecipitação foi quantificado no espectrofotômetro NanoVue Plus® (GE Healthcare Life Sciences) e utilizado na técnica de PCR quantitativa em tempo real.

A PCR quantitativa em tempo real foi realizada em triplicata no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System® (Applied Biosystems™). As condições de amplificação foram de 10 minutos a 95°C para a desnaturação do DNA, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C para desnaturação e 1 minuto a 60°C para o anelamento do DNA. Para a reação foi utilizado o kit “GoTaq® qPCR Systems” (Promega) seguindo as recomendações do fabricante. Os primers para o gene alvo Sb04g038610 encontram-se na tabela suplementar 1, os quais foram desenhados utilizando o software online PrimerQuest Tool (www.idtdna.com). Para isso, foi utilizada uma parte da sequência do gene Sb04g038610 situada 500 pares de base acima e 500 pares de base abaixo do sitio de início de transcrição, sendo esta sequência acessada pela base de dados Phytozome (phytozome.jgi.doe.gov). Para confirmar a especificidade, tamanho de amplicon e presença de primer dimers nos primers desenhados, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%.

Como forma de normalização dos resultados foi utilizado o gene Sb03g040880 (*Actin 1*) como controle positivo para a presença da H3K4me3 em sorgo, sendo os primers para este gene descritos por Heimann *et al.* (2013) (tabela suplementar 1). A quantificação da ocorrência da H3K4me3 para os tratamentos DHFA e DHR foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) usando o gene Sb03g040880 como normalizador.

5.3.16. Análises estatísticas

Para as análises estatísticas foi utilizado o software estatístico SigmaPlot versão 12.0. Todos os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk ($P < 0.05$).

No primeiro experimento, os parâmetros de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* (Φ_{PSII} , qP , F_V'/F_M' , D e Ex), CAS, CRA_{Folha} , área foliar e massa seca da parte aérea foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($P < 0.05$). O F_V/F_M foi

submetido a análise de variância (ANOVA) de dois fatores seguido do teste de Tukey ($P < 0.05$), sendo o fatorial de 4 tratamentos x 3 horários. A densidade estomática e a densidade estomática total foram submetidas a análise de variância (ANOVA) de três fatores seguido do teste de Tukey ($P < 0.05$), sendo que para ambos os parâmetros o fatorial foi de 4 tratamentos x 2 posições dos estômatos na folha x 2 idades da folha.

No segundo experimento, os parâmetros de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* (Φ_{PSII} , qP , F_v'/F_m' , D e Ex), CAS, CRA_{Folha} , conteúdo de açúcares solúveis totais e sacarose, conteúdo de H_2O_2 , nível de peroxidação lipídica e atividade das enzimas superóxido dismutase, peroxidase e catalase foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($P < 0.05$). Os dados de ocorrência da $H3K4me3$ foram submetidos ao teste t ($P < 0.05$) quando comparado os tratamentos DHFA e DHR e também a ANOVA seguido do teste de Tukey ($P < 0.05$) quando comparado os tempos: último dia de déficit hídrico, dois dias de reidratação e seis dias de reidratação (66, 68 e 72 DAS).

5.4. Resultados

5.4.1. Conteúdo de água no solo (CAS) e conteúdo relativo de água na folha (CRA_{Folha})

A suspensão de irrigação influenciou na redução do CAS dos tratamentos DHFA e DHR em relação ao Controle e ao DHFJ no último dia de déficit hídrico (figura 1A e 1B), onde se verificou valores de CAS inferiores a 30% para os tratamentos DHFA e DHR em ambos os experimentos (figura 1A e 1B). Enquanto isso, nos tratamentos Controle e DHFJ, os quais foram mantidos irrigados, o CAS foi superior a 75% em ambos os experimentos (figura 1A e 1B).

Embora tenha ocorrido redução no CAS do tratamento DHR em relação ao Controle no último dia de déficit hídrico (figura 1A e 1B), o CRA_{Folha} do DHR não diferiu do tratamento Controle no último dia de déficit hídrico do primeiro e segundo experimento (tabela 2), porém, o tratamento DHFA apresentou menor CRA_{Folha} em relação ao Controle em ambos os experimentos (tabela 2), o que indica que plantas de *S. bicolor* com histórico de déficit hídrico apresentam maior capacidade de retenção de água nos tecidos foliares durante o evento recorrente de seca.

Durante a reidratação em ambos os experimentos, foi observado que o CAS dos tratamentos DHFA e DHR retornou a condição hídrica estabelecida para os tratamentos Controle e DHFJ (90 – 75%) (figura 1A e 1B). Como consequência deste retorno no CAS, foi

verificado que o CRA_{Folha} dos tratamentos DHFA e DHR de ambos os experimentos também retornaram a condição Controle (tabela 2).

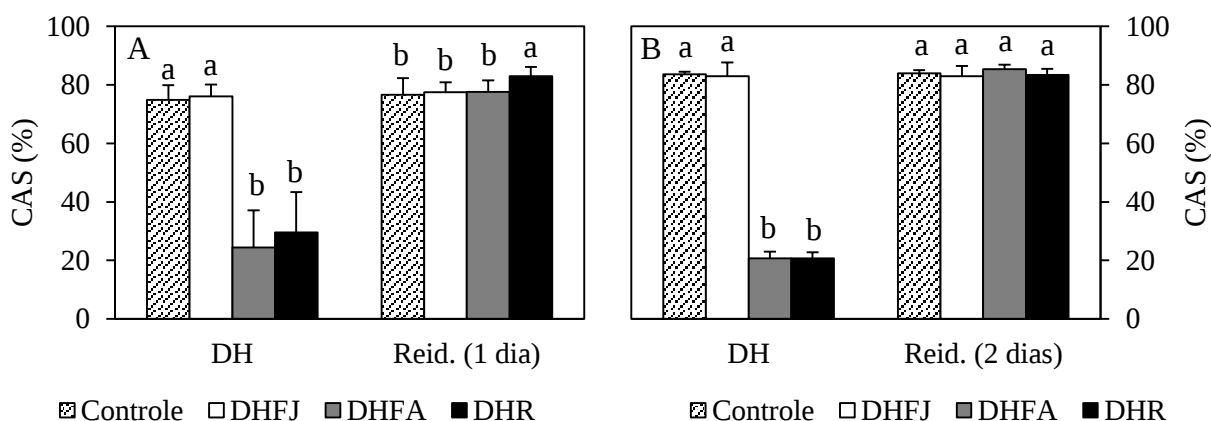


Figura 1: Média ($n=20$) do conteúdo relativo de água no solo (CAS, %) nos tratamentos Controle (barra branca com linhas diagonais), Déficit Hídrico na Fase Juvenil (DHFJ) (barra branca), Déficit Hídrico na Fase Adulta (DHFA) (barra cinza) e Déficit Hídrico Recorrente (DHR) (barra preta). (A) CAS do primeiro experimento no último dia de déficit hídrico (DH) e após um dia de reidratação (Reid. (1 dia)); (B) CAS do segundo experimento no último dia de déficit hídrico (DH) e após dois dias de reidratação (Reid. (2 dias)). Letras diferentes indicam diferença entre tratamentos pela análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($P<0.05$). Linhas verticais indicam desvio padrão.

Tabela 2: Média ($n=5$) do conteúdo relativo de água na folha (CRA_{Folha} , %) de *S. bicolor* às 5 horas nos tratamentos Controle, Déficit Hídrico na Fase Juvenil (DHFJ), Déficit Hídrico na Fase Adulta (DHFA) e Déficit Hídrico Recorrente (DHR). Avaliações no último dia de déficit hídrico (DH) do primeiro e segundo experimento, no primeiro dia de reidratação (Reid. (1 dia)) do primeiro experimento e no segundo dia de reidratação (Reid. (2 dias)) do segundo experimento.

Tratamento	Experimento 1 CRA_{Folha} (%)		Experimento 2 CRA_{Folha} (%)	
	DH	Reid. (1 dia)	DH	Reid. (2 dias)
Controle	94 a ± 2.5	94 a ± 2.5	87 a ± 1.2	91 a ± 1.0
DHFJ	94 a ± 2.1	94 a ± 2.1	91 a ± 1.4	89 a ± 1.7
DHFA	69 b ± 14.5	95 a ± 2.0	72 b ± 11.4	94 a ± 13.5
DHR	80 ab ± 14.0	96 a ± 2.5	83 a ± 3.2	92 a ± 1.0

Letras diferentes nas colunas indicam diferença significativa pela análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($P<0.05$).

5.4.2. Densidade estomática e densidade estomática relativa à área foliar

Para a densidade estomática não houve diferença entre tratamentos, até mesmo a interação entre o fator tratamento com os demais fatores não foi observada (tabela suplementar 2). Entretanto, foi verificada interação entre os fatores posição dos estômatos na face da folha e idade da folha, tais dados encontram-se representados na tabela suplementar 2.

Ao submeter os dados de densidade estomática relativa à área foliar a ANOVA de três fatores, foi verificada diferença entre tratamentos, entre posição dos estômatos na folha e entre idade da folha de forma independente (tabela 3). Sendo assim, ao comparar os tratamentos, a densidade estomática relativa à área foliar do tratamento Controle foi maior em relação aos tratamentos de deficiência hídrica (DHFJ, DHFA e DHR) (tabela 3), o que demonstra que a seca influencia negativamente na distribuição total dos estômatos na folha. Nas plantas submetidas a dois eventos de déficit hídrico (DHR) foi observado que a densidade estomática relativa à área foliar foi menor em relação ao DHFA (tabela 3), indicando que eventos recorrentes de seca intensificam a redução na densidade estomática total.

Para o fator posição dos estômatos na folha foi verificada maior densidade estomática relativa à área foliar na face abaxial, enquanto que para o fator idade da folha, as folhas novas apresentaram a maior densidade (tabela 3).

Tabela 3: Média ($n=5$) da densidade estomática relativa à área foliar (Nº estômatos/área foliar total em cm^2) do primeiro experimento após 27 dias de reidratação (81 DAS) na posição adaxial e abaxial de folhas que presenciaram o déficit hídrico aos 49 – 54 DAS (folhas velhas) e que surgiram após 27 dias de recuperação (folhas novas) em *S. bicolor* submetido aos tratamentos Controle, Déficit Hídrico na Fase Juvenil (DHFJ), Déficit Hídrico na Fase Adulta (DHFA) e Déficit Hídrico Recorrente (DHR).

Tratamento	Nº estômatos/área foliar total
Controle	22.800 10^6 a
DHFJ	18.584 10^6 bc
DHFA	19.147 10^6 b
DHR	15.793 10^6 c
Posição	Nº estômatos/área foliar total
Adaxial	17.181 10^6 b
Abaxial	20.981 10^6 a
Idade	Nº estômatos/área foliar total
Folha nova	20.539 10^6 a
Folha velha	17.623 10^6 b
Significância	
Tratamento	$P < 0.001$
Posição dos estômatos	$P < 0.001$
Idade da folha	$P < 0.001$
Tratamento x Posição dos estômatos	N.S.
Tratamento x Idade da folha	N.S.
Posição dos estômatos x Idade da folha	N.S.
Tratamento x Posição dos estômatos x Idade da folha	N.S.

Letras diferentes nas colunas indicam diferença significativa pela análise de variância (ANOVA) de três fatores (4 tratamentos x 2 posições dos estômatos x 2 idades da folha) seguido do teste de Tukey ($P < 0.05$). N.S. indica diferença não significativa.

5.4.3. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*

Na avaliação de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* realizadas no último dia de déficit hídrico do primeiro experimento, o tratamento DHFA apresentou redução na assimilação de CO₂ (A_{Net}), na condutância estomática (g_s), transpiração (E), rendimento quântico efetivo (Φ_{PSII}) e rendimento quântico máximo do PSII sob condição de luz (F_V'/F_M') em relação aos tratamentos Controle e DHFJ (figuras 2A, 2B, 2C, 2D e 2E, respectivamente), o que demonstra que a fotossíntese de plantas sem histórico de déficit hídrico é afetada negativamente pela seca. Entretanto, o DHR não diferiu do tratamento Controle e DHFJ nos parâmetros de A_{Net} , g_s , E , Φ_{PSII} e F_V'/F_M' (figura 2A, 2B, 2C, 2D e 2E, respectivamente), o que indica que a fotossíntese de plantas com experiência prévia a seca apresentam maior tolerância a seca recorrente. Enquanto isso, para a fração da energia dissipada pelas antenas como calor (D), foi observado aumento deste parâmetro apenas no tratamento DHFA em relação aos demais tratamentos (figura 2F).

A avaliação de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* no último dia de déficit hídrico do segundo experimento demonstrou que o tratamento DHR apresentou redução em relação ao tratamento Controle nos parâmetros A_{Net} , g_s , E e Φ_{PSII} (figura 3A, 3B, 3C e 3D), sendo este padrão de resposta diferente do observado no final da seca do experimento 1 (figura 2A, 2B, 2C e 2D). Entretanto, no último dia de déficit hídrico do segundo experimento, não houve diferença entre o DHR e o Controle para os parâmetros de F_V'/F_M' e D (figura 3E e 3F).

Durante a fase de reidratação dos dois experimentos, as trocas gasosas e a fluorescência da clorofila *a* dos tratamentos DHFA e DHR apresentaram recuperação significativa ao nível do tratamento Controle logo no primeiro dia de recuperação, sendo que nos demais dias de reidratação também não se observou diferença entre os tratamentos Controle, DHFA e DHR (tabela suplementar 3 e 4).

No último dia de déficit hídrico de ambos os experimentos não foram observadas diferenças entre tratamentos para os parâmetros de eficiência de uso da água (EUA), “quenching” fotoquímico (qP) e fração do excesso de energia não dissipada pelas antenas e não utilizadas fotoquimicamente (Ex) (tabela suplementar 5).

Para o rendimento quântico máximo (F_V/F_M) a ANOVA de dois fatores demonstrou que houve interação entre os fatores tratamento e tempo no último dia de seca (tabela 4). Considerando esta interação, ao comparar estatisticamente o fator tempo dentro de um determinado tratamento, observou-se que no tratamento DHFA o F_V/F_M foi maior às 5 e 10h

(tabela 4). Enquanto isso, no DHR o período das 5h apresentou maior F_V/F_M em relação às 18h, sendo que às 10h não houve diferença entre o período das 5 e 18h (tabela 4). Ao comparar o fator tratamento dentro de um determinado tempo, verificou-se que no período das 18h o tratamento DHFA apresentou menor F_V/F_M em relação aos demais tratamentos também avaliados as 18h (tabela 4).

No primeiro dia de reidratação a ANOVA de dois fatores também demonstrou interação entre os fatores tratamento e tempo para o F_V/F_M (tabela 4). Nesta interação, a comparação estatística entre tempo para um determinado tratamento demonstrou que para todos os tratamentos o F_V/F_M foi maior as 5 e 18h (tabela 4). Ao comparar estatisticamente o F_V/F_M entre tratamentos para um determinado tempo, observou-se que tanto no período das 5 e 10h o tratamento DHFA apresentou menor F_V/F_M em relação aos demais tratamentos (tabela 4).

Após quatro e seis dias de reidratação não foi verificado interação entre os fatores tratamento e tempo. Entretanto, foi observado diferença apenas para o fator tempo, onde o F_V/F_M foi maior às 5h com posterior redução significativa no período das 18h seguido do menor valor observado as 10h (tabela 4).

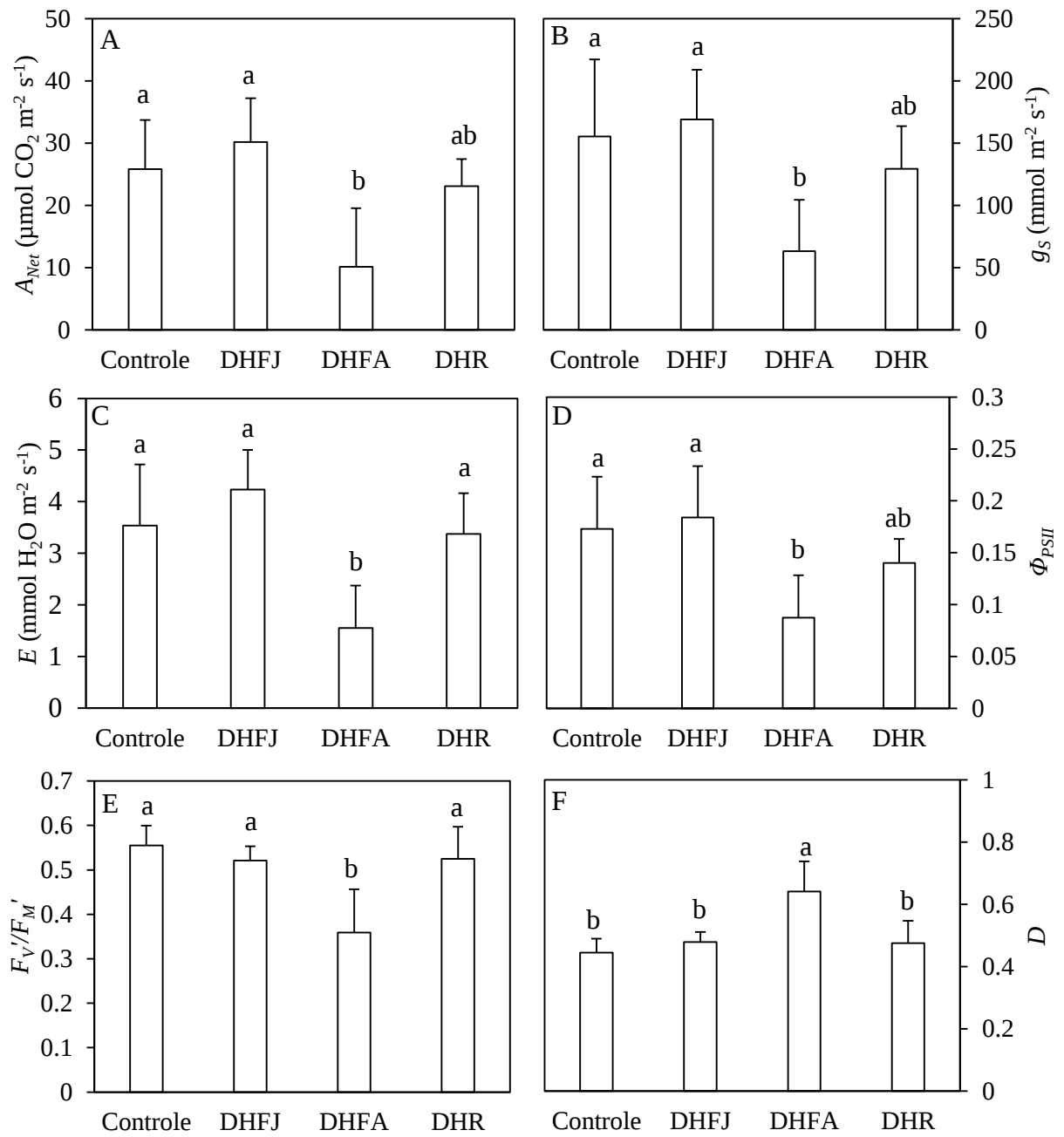


Figura 2: Média ($n=5$) das trocas gasosas e da fluorescência da clorofila *a* de *S. bicolor* para os tratamentos Controle, Défice Hídrico na Fase Juvenil (DHFJ), Défice Hídrico na Fase Adulta (DHFA) e Défice Hídrico Recorrente (DHR). Avaliações realizadas no primeiro experimento no período das 11 h no último dia de déficit hídrico. (A) assimilação de CO_2 (A_{Net} , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); (B) condutância estomática (g_s , $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); (C) transpiração (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); (D) rendimento quântico efetivo (Φ_{PSII}); (E) rendimento quântico máximo do PSII sob condição de luz (F_V'/F_M'); (F) fração da energia dissipada pelas antenas como calor (D). Letras diferentes indicam diferença entre tratamentos pela análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($P<0.05$). Linhas verticais indicam desvio padrão.

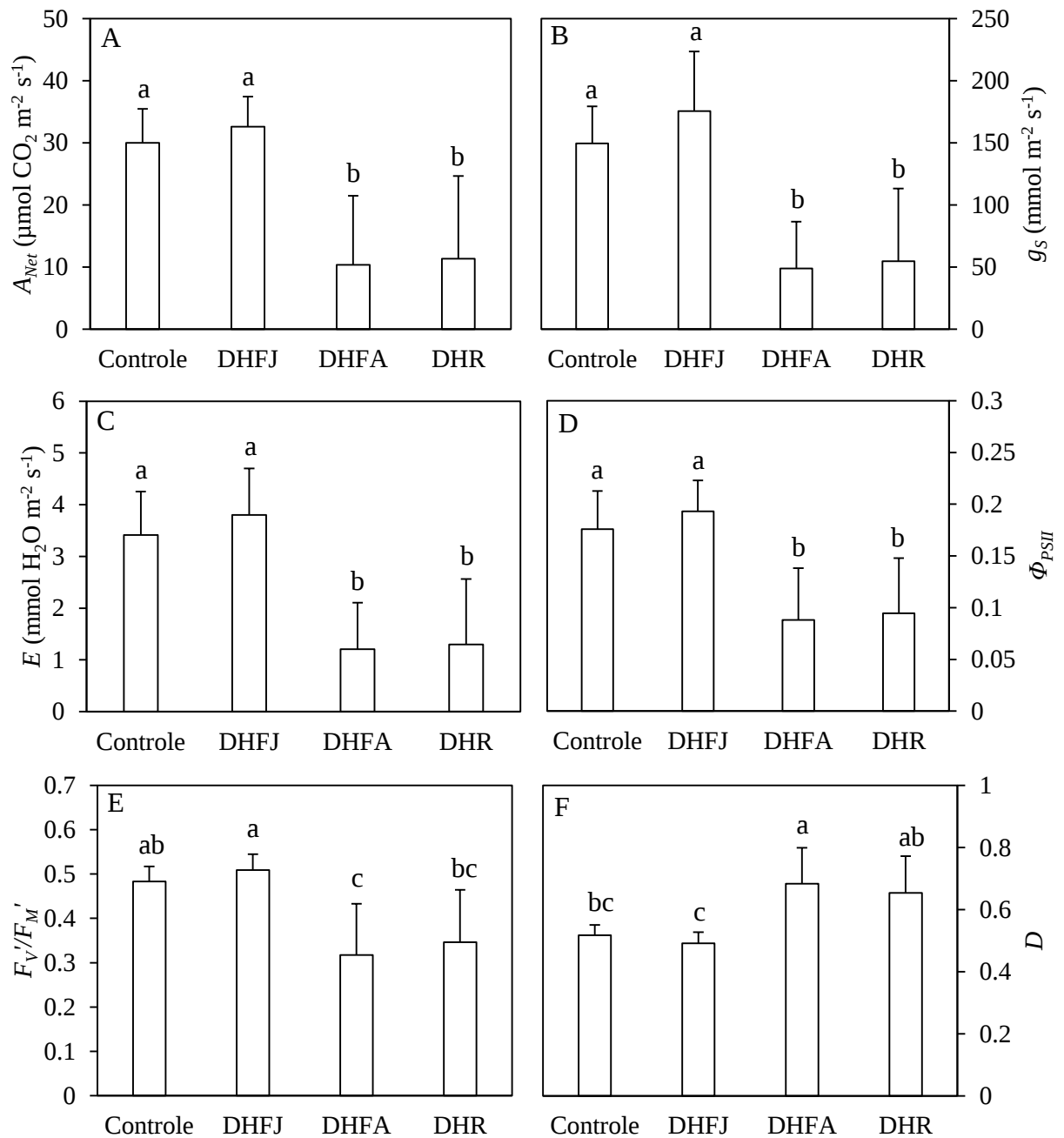


Figura 3: Média ($n=5$) das trocas gasosas e da fluorescência da clorofila *a* de *S. bicolor* para os tratamentos Controle, Déficit Hídrico na Fase Juvenil (DHFJ), Déficit Hídrico na Fase Adulta (DHFA) e Déficit Hídrico Recorrente (DHR). Avaliações realizadas no segundo experimento no período das 11 h no último dia de déficit hídrico. (A) assimilação de CO_2 (A_{Net} , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); (B) condutância estomática (g_s , $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); (C) transpiração (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); (D) rendimento quântico efetivo (Φ_{PSII}); (E) rendimento quântico máximo do PSII sob condição de luz (F_v'/F_m'); (F) fração da energia dissipada pelas antenas como calor (D). Letras diferentes indicam diferença entre tratamentos pela análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($P<0.05$). Linhas verticais indicam desvio padrão.

Tabela 4: Média ($n=5$) do rendimento quântico máximo do PSII (F_V/F_M) de *S. bicolor* às 5, 10 e 18 h nos tratamentos Controle, Défice Hídrico na Fase Juvenil (DHFJ), Défice Hídrico na Fase Adulta (DHFA) e Défice Hídrico Recorrente (DHR). Avaliações realizadas no último dia de déficit hídrico (DH), no primeiro dia de reidratação (Reid. (1 dia)), no quarto dia de reidratação (Reid. (4 dias)) e no sexto dia de reidratação (Reid. (6 dias)) do primeiro experimento.

	DH	Reid. (1 dia)	Reid. (4 dias)	Reid. (6 dias)
Tratamento	F_V/F_M	F_V/F_M	F_V/F_M	F_V/F_M
Controle	-	-	-	-
DHFJ	-	-	-	-
DHFA	-	-	-	-
DHR	-	-	-	-
Tempo	F_V/F_M	F_V/F_M	F_V/F_M	F_V/F_M
5 h	-	-	0.835 a	0.835 a
10 h	-	-	0.761 c	0.758 c
18 h	-	-	0.781 b	0.819 b
Tratamento x tempo	F_V/F_M	F_V/F_M	F_V/F_M	F_V/F_M
Controle 5 h	0.839 Aa	0.830 Aa	-	-
Controle 10 h	0.769 Aa	0.753 Ab	-	-
Controle 18 h	0.795 Aa	0.806 Aa	-	-
DHFJ 5 h	0.837 Aa	0.830 Aa	-	-
DHFJ 10 h	0.768 Aa	0.758 Ab	-	-
DHFJ 18 h	0.794 Aa	0.803 Aa	-	-
DHFA 5 h	0.804 Aa	0.758 Ba	-	-
DHFA 10 h	0.769 Aa	0.692 Bb	-	-
DHFA 18 h	0.627 Bb	0.782 Aa	-	-
DHR 5 h	0.833 Aa	0.809 Aa	-	-
DHR 10 h	0.773 Aab	0.745 Ab	-	-
DHR 18 h	0.750 Ab	0.797 Aa	-	-
Significância				
Tratamento	P<0.01	P<0.01	N.S.	N.S.
Tempo	P<0.01	P<0.001	P<0.001	P<0.001
Tratamento x tempo	P<0.05	P<0.05	N.S.	N.S.

Letras diferentes nas colunas indicam diferença significativa pela análise de variância (ANOVA) de dois fatores (4 tratamentos x 3 tempos) seguido do teste de Tukey ($P<0.05$). Letras maiúsculas comparam diferentes tratamentos em um determinado tempo e letras minúsculas comparam diferentes tempos para um determinado tratamento. N.S. indica diferença não significativa.

5.4.4. Crescimento da parte aérea

Aos 15, 30 e 49 DAS, não foram observadas diferenças entre tratamentos na massa seca de caule (MSC), massa seca de folha (MSF), massa seca total (MST) e área foliar (AF) (tabela 5). Entretanto, aos 54, 64, 80 e 125 DAS foram verificadas diferenças entre tratamentos para os parâmetros de MSC, MSF, MST e AF (tabela 5).

Aos 54 DAS, último dia de déficit hídrico, o tratamento Controle apresentou maior MSC, MSF e MST em relação aos tratamentos DHFJ e DHR (tabela 5). Contudo, o tratamento DHFA não diferiu das plantas Controle e do DHR na MSC, MSF e MST (tabela 5). Com relação a AF, verificou-se que o tratamento Controle apresentou maior AF do que os tratamentos DHFJ, DHFA e DHR, sendo que estes três últimos não diferiram entre si (tabela 5).

Aos 64 DAS (10 dias após a reidratação) o tratamento DHR apresentou redução na MSC em relação ao Controle (tabela 5). Entretanto, o tratamento DHFA não diferiu na MSC em relação aos tratamentos Controle, DHFJ e DHR (tabela 5). Para a MSF, foi verificado que o tratamento DHR apresentou menor MSF do que o tratamento DHFA (tabela 5), porém, ambos não diferiram do tratamento Controle (tabela 5). A MST do tratamento Controle e DHFA não diferiram entre si, entretanto, foram maiores em relação ao tratamento DHR (tabela 5).

Para os 80 DAS (26 dias após reidratação) o tratamento Controle apresentou maior MSC do que os demais tratamentos (tabela 5). Para a MSF, foi verificado que o tratamento DHR apresentou menor MSF em relação aos tratamentos Controle e DHFA (tabela 5), porém, o tratamento DHFA não diferiu dos tratamentos Controle e DHFJ (tabela 5). Na MST o tratamento Controle não diferiu de DHFA (tabela 5). Entretanto, o tratamento Controle apresentou maior MST em relação aos tratamentos DHFJ e DHR (tabela 5). Para a AF, o tratamento Controle não diferiu de DHFJ e DHFA, contudo, houve redução na AF do tratamento DHR em relação ao Controle (tabela 5).

Aos 125 DAS (71 dias após reidratação), o tratamento Controle apresentou maior MSC e MST em relação ao tratamento DHFA (tabela 5), porém, o tratamento DHR não diferiu dos demais tratamentos (tabela 5). Para a MSF e AF, o tratamento Controle apresentou os maiores valores em relação ao tratamento DHFA e DHR (tabela 5), porém, estes dois últimos não diferiram entre si (tabela 5).

Tabela 5: Média ($n=5$) da massa seca do caule (MSC, g), massa seca de folha (MSF, g), massa seca total da parte aérea (MST, g) e área foliar (AF, cm^2) de *S. bicolor* aos 15, 30, 49, 54, 64, 80 e 125 dias após semeadura (DAS) do primeiro experimento nos tratamentos Controle, Déficit Hídrico na Fase Juvenil (DHFJ), Déficit Hídrico na Fase Adulta (DHFA) e Déficit Hídrico Recorrente (DHR).

15 DAS	MSC (g)	MSF (g)	MST (g)	AF (cm^2)
Controle	0.009 $\pm$ 0.004	0.02 $\pm$ 0.006	0.03 $\pm$ 0.01	11.52 $\pm$ 2.62
DHFJ	0.01 $\pm$ 0.002	0.02 $\pm$ 0.004	0.03 $\pm$ 0.006	11.15 $\pm$ 1.77
DHFA	0.01 $\pm$ 0.002	0.02 $\pm$ 0.003	0.03 $\pm$ 0.005	10.74 $\pm$ 1.94
DHR	0.01 $\pm$ 0.002	0.02 $\pm$ 0.003	0.03 $\pm$ 0.004	11.24 $\pm$ 1.63
30 DAS	MSC (g)	MSF (g)	MST (g)	AF (cm^2)
Controle	0.15 $\pm$ 0.05	0.236 $\pm$ 0.03	0.382 $\pm$ 0.11	71.0 $\pm$ 21.3
DHFJ	0.10 $\pm$ 0.07	0.196 $\pm$ 0.13	0.297 $\pm$ 0.20	66.0 $\pm$ 45.0
DHFA	0.13 $\pm$ 0.04	0.217 $\pm$ 0.07	0.343 $\pm$ 0.12	64.0 $\pm$ 22.0
DHR	0.07 $\pm$ 0.01	0.123 $\pm$ 0.02	0.190 $\pm$ 0.03	37.8 $\pm$ 7.2
49 DAS	MSC (g)	MSF (g)	MST (g)	AF (cm^2)
Controle	1.84 $\pm$ 0.69	2.94 $\pm$ 1.16	4.78 $\pm$ 1.84	824 $\pm$ 285
DHFJ	1.03 $\pm$ 0.36	1.79 $\pm$ 0.49	2.82 $\pm$ 0.85	558 $\pm$ 143
DHFA	2.04 $\pm$ 0.68	3.36 $\pm$ 1.19	5.40 $\pm$ 1.86	927 $\pm$ 322
DHR	1.31 $\pm$ 0.60	2.18 $\pm$ 0.96	3.48 $\pm$ 1.55	648 $\pm$ 261
54 DAS	MSC (g)	MSF (g)	MST (g)	AF (cm^2)
Controle	4.00 a $\pm$ 1.17	6.29 a $\pm$ 1.74	10.3 a $\pm$ 2.86	1672 a $\pm$ 449
DHFJ	1.81 c $\pm$ 0.55	3.18 b $\pm$ 0.91	4.99 b $\pm$ 1.45	956 b $\pm$ 274
DHFA	3.44 ab $\pm$ 0.81	4.91 ab $\pm$ 0.92	8.35 ab $\pm$ 1.72	819 b $\pm$ 141
DHR	2.18 bc $\pm$ 0.50	3.37 b $\pm$ 0.87	5.55 b $\pm$ 1.36	670 b $\pm$ 105
64 DAS	MSC (g)	MSF (g)	MST (g)	AF (cm^2)
Controle	7.49 a $\pm$ 3.05	8.34 ab $\pm$ 0.93	15.8 a $\pm$ 3.70	1975 $\pm$ 236
DHFJ	4.90 ab $\pm$ 2.11	6.79 ab $\pm$ 2.12	11.7 ab $\pm$ 4.21	1716 $\pm$ 461
DHFA	7.36 ab $\pm$ 1.70	8.89 a $\pm$ 1.18	16.3 a $\pm$ 2.73	2127 $\pm$ 196
DHR	3.63 b $\pm$ 0.73	5.93 b $\pm$ 1.08	9.56 b $\pm$ 1.81	1625 $\pm$ 283
80 DAS	MSC (g)	MSF (g)	MST (g)	AF (cm^2)
Controle	27.4 a $\pm$ 3.59	9.18 a $\pm$ 0.66	36.6 a $\pm$ 4.21	1955 a $\pm$ 41
DHFJ	16.9 b $\pm$ 3.10	7.36 bc $\pm$ 0.86	24.3 b $\pm$ 3.88	1671 ab $\pm$ 177
DHFA	19.8 b $\pm$ 6.70	8.52 ab $\pm$ 1.01	28.4 ab $\pm$ 7.25	1772 ab $\pm$ 356
DHR	16.4 b $\pm$ 1.63	6.19 c $\pm$ 0.88	22.6 b $\pm$ 1.53	1480 b $\pm$ 258
125 DAS	MSC (g)	MSF (g)	MST (g)	AF (cm^2)
Controle	15.7 a $\pm$ 2.43	7.80 a $\pm$ 0.73	55.3 a $\pm$ 7.49	1381 a $\pm$ 128
DHFJ	14.5 ab $\pm$ 2.33	6.94 ab $\pm$ 0.82	54.1 ab $\pm$ 6.13	1258 ab $\pm$ 174
DHFA	9.93 b $\pm$ 3.34	5.98 b $\pm$ 1.13	42.7 b $\pm$ 9.61	1041 b $\pm$ 153
DHR	11.1 ab $\pm$ 2.55	5.74 b $\pm$ 0.51	44.9 ab $\pm$ 2.49	1060 b $\pm$ 100

Letras diferentes nas colunas indicam diferença significativa pela análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($P < 0.05$).

5.4.5. Açúcares solúveis totais e sacarose

No último dia de déficit hídrico o tratamento DHFA apresentou maior conteúdo de açúcares solúveis totais e maior conteúdo de sacarose na folha em relação ao Controle, DHFJ e DHR (figura 4 e 5, respectivamente), sendo que estes três últimos não diferiram entre si (figura 4 e 5, respectivamente).

Após dois dias de reidratação o Controle apresentou maior conteúdo de açúcares totais em relação ao DHR e DHFJ (figura 4). Enquanto isso, o tratamento DHFA não diferiu do Controle e do DHR (figura 4), porém, o DHFA apresentou maior conteúdo de açúcares totais em relação ao DHFJ (figura 4). Para o conteúdo de sacarose após dois dias de recuperação, foi observado que o tratamento DHFA apresentou maior conteúdo de sacarose em relação ao DHR (figura 5), enquanto que para os tratamentos Controle e DHFJ não houve diferença (figura 5).

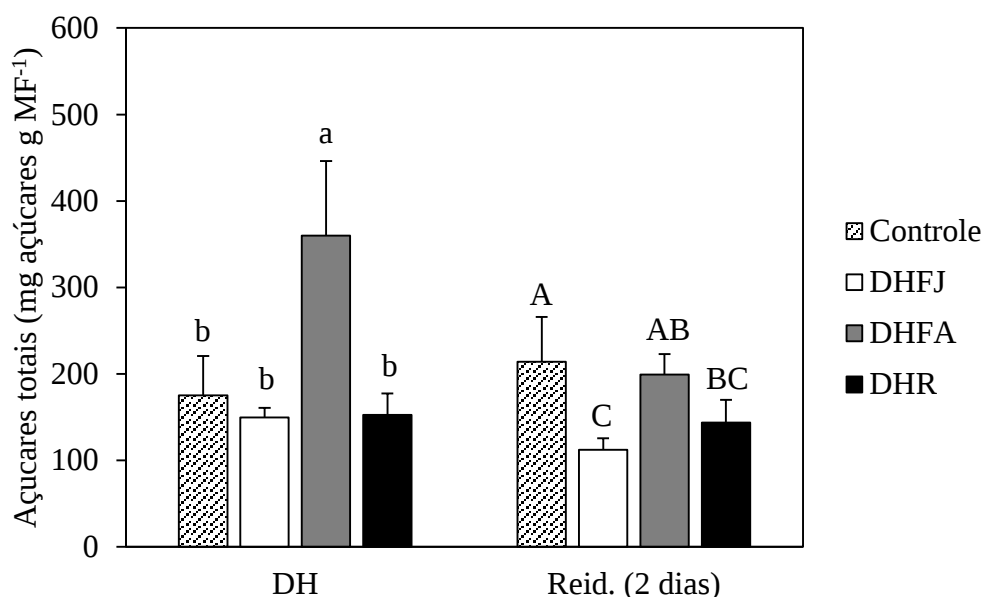


Figura 4: Média ($n=5$) do conteúdo de açúcares solúveis totais (mg açúcares g MF⁻¹) de *S. bicolor* para os tratamentos Controle, Déficit Hídrico na Fase Jovem (DHFJ), Déficit Hídrico na Fase Adulta (DHFA) e Déficit Hídrico Recorrente (DHR). Avaliações realizadas no segundo experimento no último dia de déficit hídrico (DH) e após dois dias de reidratação (Reid. (2 dias)). Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre tratamentos no último dia de déficit hídrico e letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre tratamentos após dois dias de recuperação pela análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($P<0.05$). Linhas verticais indicam desvio padrão.

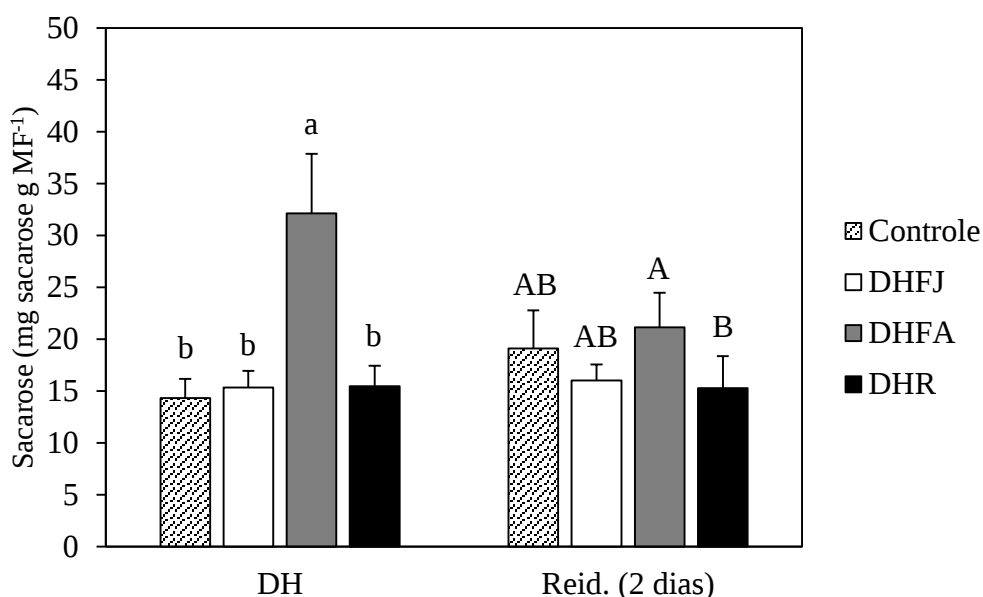


Figura 5: Média ($n=5$) do conteúdo de sacarose ($\text{mg sacarose g MF}^{-1}$) de *S. bicolor* para os tratamentos Controle, Déficit Hídrico na Fase Jovem (DHFJ), Déficit Hídrico na Fase Adulta (DHFA) e Déficit Hídrico Recorrente (DHR). Avaliações realizadas no segundo experimento no último dia de déficit hídrico (DH) e após dois dias de reidratação (Reid. (2 dias)). Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre tratamentos no último dia de déficit hídrico e letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre tratamentos após dois dias de recuperação pela análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($P<0.05$). Linhas verticais indicam desvio padrão.

5.4.6. Conteúdo de H_2O_2 e peroxidação lipídica

O conteúdo de H_2O_2 e o nível de peroxidação lipídica dos quatro tratamentos avaliados apresentaram padrão de resultados semelhantes no último dia de déficit hídrico e após dois dias de reidratação (figura 6 e 7, respectivamente). Sendo assim, no último dia de déficit hídrico, o tratamento DHFA apresentou maior conteúdo de H_2O_2 e de peroxidação lipídica em relação aos tratamentos Controle, DHFJ e DHR, sendo que entre estes três últimos não se verificou diferença (figura 6 e 7).

Após dois dias de recuperação não foram observadas diferenças para o conteúdo de H_2O_2 e de peroxidação lipídica entre os tratamentos Controle, DHFA e DHR (figura 6 e 7), porém, foi observado redução nestes mesmos parâmetros para o tratamento DHFJ ao ser comparado com DHFA (figura 6 e 7).

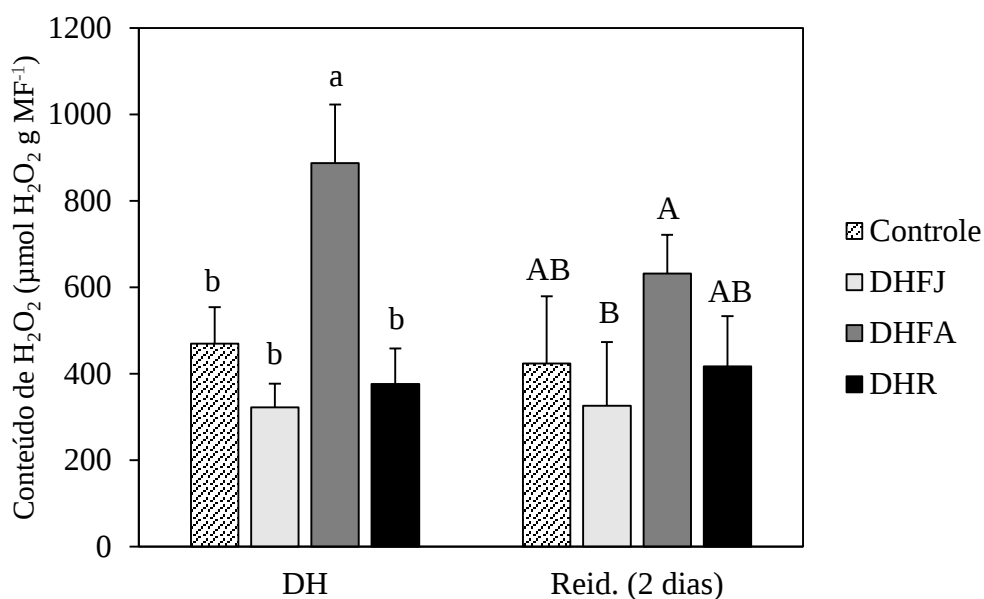


Figura 6: Média ($n=5$) do conteúdo de H_2O_2 ($\mu\text{mol } H_2O_2 \text{ g MF}^{-1}$) de *S. bicolor* para os tratamentos Controle, Déficit Hídrico na Fase Jovem (DHFJ), Déficit Hídrico na Fase Adulta (DHFA) e Déficit Hídrico Recorrente (DHR). Avaliações realizadas no segundo experimento no último dia de déficit hídrico (DH) e após dois dias de reidratação (Reid. (2 dias)). Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre tratamentos no último dia de déficit hídrico e letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre tratamentos após dois dias de recuperação pela análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($P < 0.05$). Linhas verticais indicam desvio padrão.

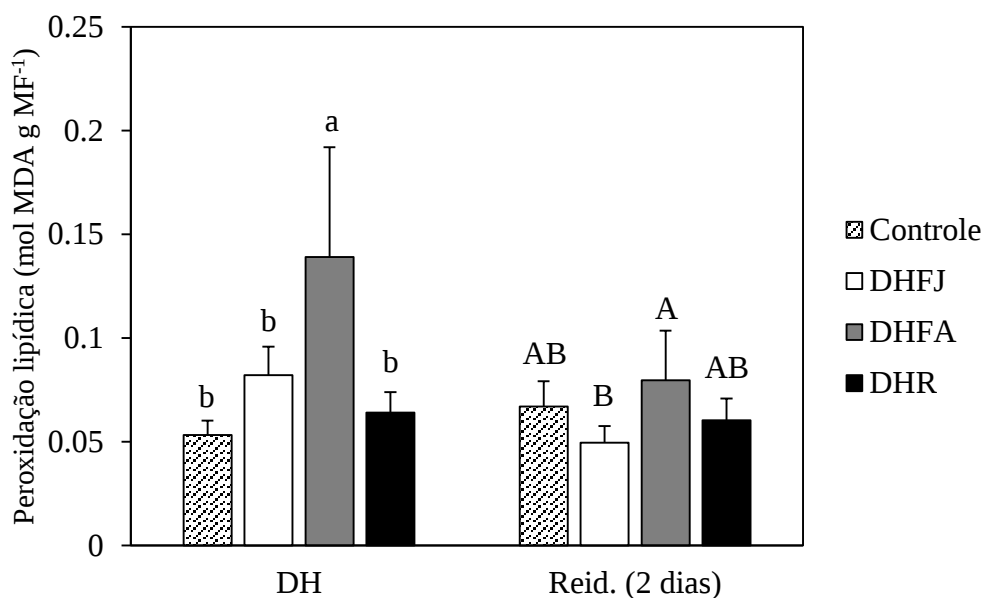


Figura 7: Média ($n=5$) do nível de peroxidação lipídica (conteúdo de malondialdeído, MDA) (mol MDA g MF⁻¹) de *S. bicolor* para os tratamentos Controle, Déficit Hídrico na Fase Jovem (DHFJ), Déficit Hídrico na Fase Adulta (DHFA) e Déficit Hídrico Recorrente (DHR). Avaliações realizadas no segundo experimento no último dia de déficit hídrico (DH) e após dois dias de reidratação (Reid. (2 dias)). Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre tratamentos no último dia de déficit hídrico e letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre tratamentos após dois dias de recuperação pela análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($P < 0.05$). Linhas verticais indicam desvio padrão.

5.4.7. Atividade da enzima peroxidase (POD), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT)

A atividade da enzima POD foi maior no tratamento DHFA quando comparado ao Controle e DHFJ, os quais apresentaram a menor atividade da POD (figura 8). No DHR a atividade da POD não diferiu dos tratamentos Controle, DHFJ e DHFA (figura 8). Para a atividade das enzimas SOD e CAT não foram observadas diferenças entre os tratamentos no último dia de déficit hídrico (tabela suplementar 6).

Após dois dias de reidratação, a atividade da POD do tratamento DHFA se manteve alta em relação aos tratamentos Controle, DHFJ e DHR, sendo que estes três últimos tratamentos não diferiram entre si (figura 8). Assim como ocorreu no último dia de seca, os tratamentos não diferiram na atividade da SOD e CAT após dois dias de recuperação (tabela suplementar 6).

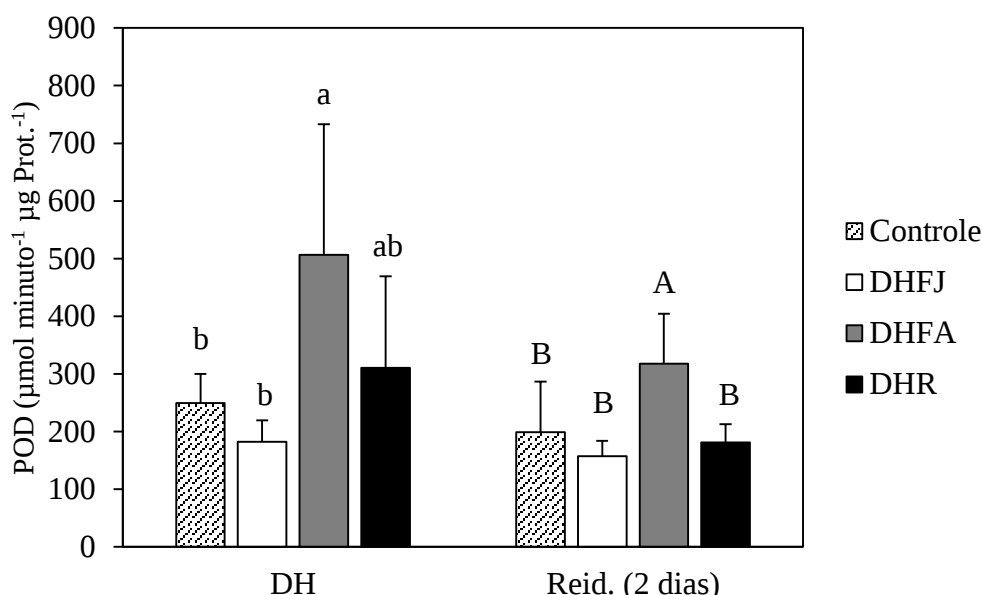


Figura 8: Média ($n=5$) da atividade da enzima peroxidase (POD) ($\mu\text{mol minuto}^{-1} \mu\text{g Prot.}^{-1}$) de *S. bicolor* para os tratamentos Controle, Déficit Hídrico na Fase Jovem (DHFJ), Déficit Hídrico na Fase Adulta (DHFA) e Déficit Hídrico Recorrente (DHR). Avaliações realizadas no segundo experimento no último dia de déficit hídrico (DH) e após dois dias de reidratação (Reid. 2 dias)). Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre tratamentos no último dia de déficit hídrico e letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre tratamentos após dois dias de recuperação pela análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($P<0.05$). Linhas verticais indicam desvio padrão.

5.4.8. Ocorrência de trimetilação na lisina 4 da histona 3 (H3K4me3) no nucleossomo do gene Sb04g038610

A ocorrência da H3K4me3, a qual foi avaliada no nucleossomo situado entre 246 – 144 pares de base acima do sítio de início de transcrição do gene Sb04g038610 (*similar to Class III peroxidase 32 precursor*), foi observada nos tratamentos DHFA e DHR no último dia de déficit

hídrico (figura 9). Contudo, o tratamento DHR apresentou maior enriquecimento relativo para a H3K4me3 em relação ao DHFA no último dia de seca (figura 9).

Após dois e seis dias de reidratação ainda foi possível verificar a ocorrência da H3K4me3 nos tratamentos DHFA e DHR no gene Sb04g038610 (figura 9). Com dois dias de reidratação o tratamento DHR apresentou aumento na H3K4me3 em relação ao DHFA (figura 9). Porém, após seis dias de recuperação, não houve diferença entre tratamentos (figura 9).

Ao avaliar a ocorrência da H3K4me3 para cada tratamento ao longo do tempo, foi possível observar que para o tratamento DHFA a ocorrência da H3K4me3 foi crescente no decorrer do tempo (figura 10). Sendo assim, no DHFA a presença da H3K4me3 foi maior após seis dias de recuperação quando comparado ao último dia de déficit hídrico (figura 10). Enquanto isso, para o DHR o maior enriquecimento relativo da H3K4me3 ocorreu após dois dias de reidratação, com posterior redução da ocorrência desta marca epigenética após seis dias de recuperação, igualando-se ao nível observado no último dia de déficit hídrico deste mesmo tratamento (figura 10).

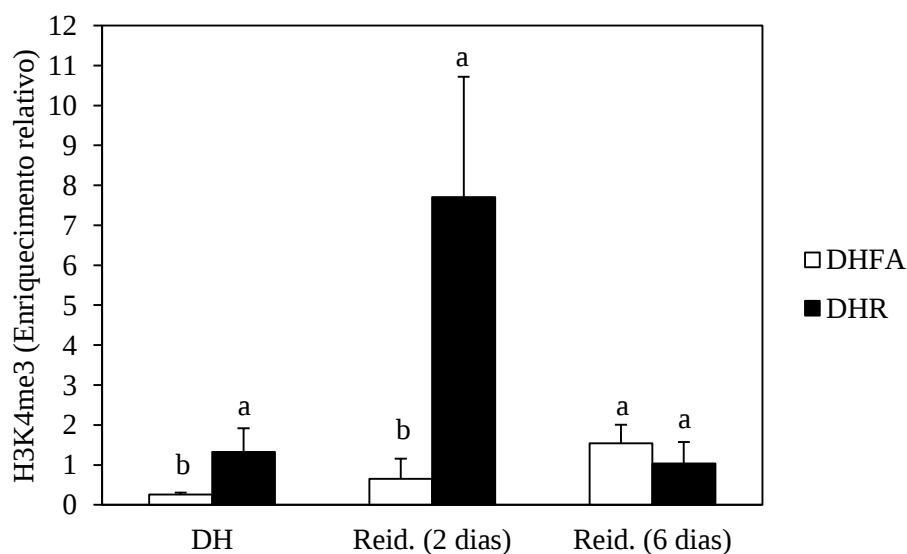


Figura 9: Média ($n=3$) da ocorrência da H3K4me3 no nucleossomo situado entre 246 – 144 pares de base acima do sítio de início de transcrição do gene Sb04g038610 (*similar to Class III peroxidase 32 precursor*) para os tratamentos Déficit Hídrico na Fase Adulta (DHFA) (barra branca) e Déficit Hídrico Recorrente (DHR) (barra preta). Avaliações realizadas no segundo experimento no último dia de déficit hídrico (DH), dois dias após reidratação (Reid. (2 dias)) e seis dias após reidratação (Reid. (6 dias)). Valores apresentados como enriquecimento da H3K4me3 relativo ao enriquecimento da H3K4me3 no controle positivo Sb03g040880 (*Actin 1*). Letras diferentes indicam diferença entre tratamentos pelo teste t ($P<0.05$). Linhas verticais indicam desvio padrão.

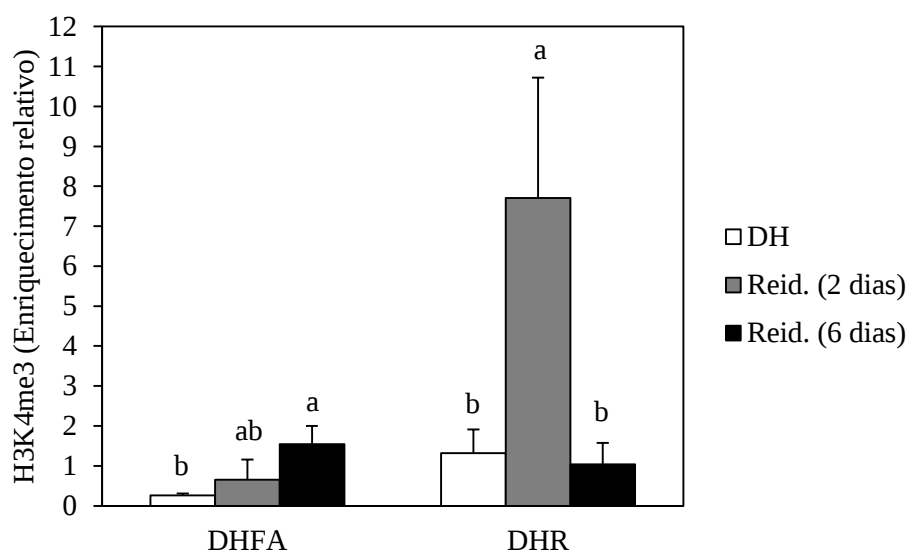


Figura 10: Média ($n=3$) da ocorrência da H3K4me3 no nucleossomo situado entre 246 – 144 pares de base acima do sitio de início de transcrição do gene Sb04g038610 (*similar to Class III peroxidase 32 precursor*) ao longo do tempo. Avaliações realizadas no segundo experimento no último dia de déficit hídrico (barra branca), dois dias após reidratação (barra cinza) e após seis dias de reidratação (barra preta) para o tratamento Déficit Hídrico na Fase Adulta (DHFA) e Déficit Hídrico Recorrente (DHR). Valores apresentados como enriquecimento da H3K4me3 relativo ao enriquecimento da H3K4me3 no controle positivo Sb03g040880 (*Actin 1*). Letras diferentes indicam diferença entre dias pela análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($P<0.05$). Linhas verticais indicam desvio padrão.

5.5. Discussão

A impressão do estresse por déficit hídrico, também conhecida como “memória” do estresse, é observada quando uma planta submetida ao segundo evento de déficit hídrico apresenta respostas que resultam em aumento da tolerância em relação a planta que presencia este déficit pela primeira vez (BRUCE *et al.*, 2007; WALTER *et al.*, 2011; WALTER *et al.*, 2013). Considerando esta definição, o tratamento DHR apresentou um padrão de resposta durante a seca recorrente que está de acordo com a definição de impressão do estresse descrita acima. Este padrão consistiu na ausência de diferenças entre o tratamento DHR e o Controle, o que foi verificado no último dia de déficit hídrico nas trocas gasosas (figura 2A, 2B e 2C), fluorescência da clorofila *a* (figura 2D, 2E, 2F, 3E, 3F e tabela 4), CRA_{Folha} (tabela 2), conteúdo de açúcares totais e conteúdo de sacarose (figura 4 e 5), conteúdo de H_2O_2 (figura 6), peroxidação lipídica (figura 7) e atividade da POD (figura 8). Tal padrão de resposta indicou que *S. bicolor* submetido ao déficit hídrico recorrente apresentou maior tolerância a seca em relação as plantas que presenciaram este déficit pela primeira vez, o que deixa evidente a ocorrência da impressão do estresse relatado por Bruce *et al.* (2007), Walter *et al.* (2011) e Walter *et al.* (2013).

Outra possível explicação para o aumento da tolerância ao déficit hídrico observada no tratamento DHR seria a manutenção da aclimação que poderia ter ocorrido no primeiro evento de déficit hídrico do tratamento DHR aos 15 DAS, o que não caracterizaria o efeito de impressão do estresse por déficit hídrico. Entretanto, a impressão do estresse tem característica temporal. Sendo assim, só pode ser estudada quando o metabolismo retorna à condição anterior ao estresse (WALTER *et al.*, 2013). Segundo Gaspar *et al.* (2002) a aclimação é a habilidade de uma planta em ajustar suas características fisiológicas em resposta ao estresse. Tais ajustes levam a um novo estado fisiológico, o qual é diferente da condição anterior ao estresse, possibilitando a sobrevivência da planta. Nesse sentido, ao comparar o tratamento DHFJ, o qual foi submetido ao déficit hídrico apenas no início do desenvolvimento (15 DAS), com o tratamento Controle nas avaliações de CRA_{Folha} (tabela 2), fotossíntese (figura 2 e 3) e atioxidativas (figura 6, 7 e 8) realizadas no último dia de déficit hídrico na “fase adulta”, é possível observar que o tempo de recuperação entre eventos de estresse foi suficiente para que o metabolismo retornasse a condição anterior ao déficit hídrico. Sendo assim, o incremento na tolerância fotossintética e antioxidativa a seca recorrente observada no tratamento DHR é atribuído a impressão do estresse por déficit hídrico.

No último dia de déficit hídrico houve redução no CAS dos tratamentos DHFA e DHR em relação as plantas Controle (figura 1A e 1B). Apesar disso, o CRA_{Folha} dos tratamentos Controle e DHR não diferiram no último dia de déficit hídrico (tabela 2). Tal fato indica que plantas de *S. bicolor* submetidas a recorrentes eventos de déficit hídrico tendem a apresentar estratégia de economia no uso da água durante o déficit hídrico, diferente do que é observado em plantas hidratadas, onde a absorção de água pelas plantas tende a satisfazer a demanda por evaporação (GIMENEZ; GALLARDO; THOMPSON, 2005), o que leva a perda excessiva de água. Tal estratégia de economia estaria de acordo com o conceito de “biological water saving”, onde as plantas exploram todo o seu potencial fisiológico e genético a fim de manter um alto desempenho e produção mesmo sob condições de menor disponibilidade de água (WANG; CHEN; XIANG, 2007). Desta forma, considerando o baixo CAS no DHR (figura 1A e 1B), o melhor desempenho do tratamento DHR em relação ao DHFA no último dia de déficit hídrico para os parâmetros fotossintéticos (figura 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F, 3E e 3F) e o baixo conteúdo de H_2O_2 (figura 6) e de peroxidação lipídica (figura 7) do DHR no último dia de seca, fica evidente que plantas de *S. bicolor* que passam pela experiência de déficit hídrico durante o início do desenvolvimento apresentam uma estratégia de resistência a este estresse baseado no conceito de “biological water saving”.

Estudos realizados por George-Jaeggli, Mortlock e Borrell (2017) demonstraram que a redução na área foliar de *S. bicolor* resulta em consumo mais lento da água do solo, o que por sua vez melhora a eficiência do uso da água devido a redução na superfície transpirante. Sendo assim, ao relacionar a densidade estomática com a área foliar total, a qual foi avaliada aos 80 DAS, foi possível verificar diferença entre os tratamentos na densidade estomática em relação a área foliar total, a qual foi definida neste estudo como densidade estomática relativa à área foliar (tabela 3). A densidade estomática é reconhecida como um fator capaz de afetar a fotossíntese e a transpiração. Desta forma, a redução no número de estômatos influencia a condição hídrica da planta, o que resulta em redução na perda de água com consequente aumento na eficiência de uso da água (WANG; CHEN; XIANG, 2007; MEI *et al.*, 2013). O tratamento Déficit Hídrico na Fase Juvenil (DHFJ), o qual foi submetido ao déficit hídrico apenas aos 15 DAS, apresentou baixa densidade estomática relativa à área foliar (tabela 3), o que indica que o tratamento DHR também apresentou redução desta densidade desde os 15 DAS. Desta forma, é possível que tal redução na densidade estomática relativa à área foliar do tratamento DHR (tabela 3) explique a manutenção do CRA_{Folha} do DHR ao nível do tratamento Controle no último dia de déficit hídrico (tabela 2).

Segundo Trewavas (2003) qualquer alteração estrutural originada durante o evento de estresse que resulte em melhora na resistência ao segundo evento pode ser considerada uma forma de impressão do estresse, uma vez que tais modificações tendem a permanecer durante toda a vida da planta. Sendo assim, as respostas observadas na densidade estomática relativa à área foliar demonstram que a espécie *S. bicolor* apresenta mecanismos morfo-anatômicos de impressão do estresse por déficit hídrico, os quais não foram encontrados observando apenas um único parâmetro, mas sim observando a associação entre densidade estomática e área foliar. Segundo Wang, Chen e Xiang (2007) e Zhao *et al.* (2015) pouca atenção tem sido direcionada para estudos sobre os efeitos da densidade estomática na fotossíntese e na perda de água. Sendo assim, este estudo contribui para a compreensão da importância da densidade estomática para o efeito da impressão do estresse.

Embora a redução na densidade estomática relativa à área foliar observada no DHFJ e DHR (tabela 3) possa resultar em diminuição na perda de água, com consequente aumento na tolerância a eventos futuros de déficit hídrico, existe uma possível desvantagem para esta redução na densidade estomática relativa à área foliar, a qual está ligada a limitação na fotossíntese. O tratamento DHFJ, o qual foi submetido ao déficit hídrico apenas aos 15 DAS, apresentou redução na densidade estomática relativa à área foliar mesmo após 66 dias de

recuperação (tabela 3), contudo, não foi observada redução na taxa de assimilação de CO₂ do tratamento DHFJ em relação as plantas controle (figura 2A). Em plantas geneticamente modificadas de *Zea mays* L. submetidas a seca com a super expressão do gene *ZmSDD1*, o qual regula negativamente a densidade estomática, foi verificado que mesmo com a redução no número de estômatos, a taxa de assimilação de CO₂ destas plantas sob seca ficou acima das não geneticamente modificadas (LIU *et al.*, 2015). A ausência de interferência da redução na densidade estomática relativa à área foliar nas taxas de assimilação de CO₂ em *S. bicolor* pode estar no fato desta espécie apresentar a fotossíntese com metabolismo C₄ (ISHIKAWA *et al.*, 2009). Neste metabolismo, a enzima fosfoenolpiruvato carboxilase realiza a captura do CO₂ atmosférico no mesofilo, o qual é transformado em ácido oxalacético e, após sucessivas reações, liberado nos cloroplastos das células da bainha do feixe vascular, responsáveis pela fase bioquímica da fotossíntese (EVANS, 2013; TAIZ *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2015). Portanto, mesmo que ocorra redução na concentração de estômatos na folha, a planta ainda apresenta mecanismos metabólicos que garantem a captura e concentração do CO₂ atmosférico.

Segundo Gaspar *et al.* (2002) para que a planta esteja em situação de estresse é necessário que algum recurso do ambiente seja alterado de forma não usual, onde o excesso ou o déficit deste recurso resulta em alteração no estado fisiológico ótimo alcançado por esta planta no ambiente em que se encontra. Considerando esta descrição de estresse e os resultados semelhantes dos tratamentos Controle e DHR no último dia de déficit hídrico para os parâmetros de trocas gasosas (figura 2A, 2B e 2C), de fluorescência da clorofila *a* (figura 2D, 2E e tabela 4), conteúdo de açúcares totais (figura 4), conteúdo de sacarose (figura 5), conteúdo de H₂O₂ (figura 6), peroxidação lipídica (figura 7) e atividade da POD (figura 8), é possível dizer que plantas de *S. bicolor* que passam pelo segundo evento de déficit hídrico (DHR) são capazes de reconhecer a seca como um fator usual do ambiente.

Enquanto isso, as plantas do tratamento DHFA, as quais diferiram do Controle nos mesmos parâmetros citados anteriormente, reconhecem o déficit hídrico como um fator não usual do ambiente, necessitando adequar as respostas fisiológicas à nova condição ambiental. Por fim, a ausência de diferença entre os tratamentos Controle e DHR no último dia de déficit hídrico está de acordo com o que é esperado para plantas que apresentam a impressão do estresse, pois foram capazes de reconhecer o agente causador de estresse a partir de uma exposição inicial ao mesmo, o que resultou em aumento na tolerância durante o segundo evento de déficit hídrico (QIN; XU; CI, 2017).

Em geral as plantas submetidas ao estresse hídrico severo recuperam somente 40 a 60% da máxima taxa de fotossíntese no dia após a reidratação, sendo que a recuperação continua nos dias seguintes, no entanto a máxima taxa de fotossíntese nem sempre se recupera (FLEXAS *et al.*, 2004; SOFO *et al.*, 2004a; SOUZA *et al.*, 2004). Porém, neste estudo, após a reidratação em ambos os experimentos foi verificado que as trocas gasosas e a fluorescência da clorofila *a* dos tratamentos DHFA e DHR apresentaram recuperação dos parâmetros fotossintéticos no primeiro dia de reidratação (tabela suplementar 3 e 4).

No último dia de déficit hídrico, o tratamento DHFA apresentou redução no F_v/F_m em relação aos demais tratamentos as 18 h (tabela 4), enquanto que o DHR não apresentou redução no F_v/F_m entre tratamentos em nenhum dia avaliado (tabela 4). Segundo Maxwell e Johnson, (2000) e Baker e Rosenqvist, (2004), o F_v/F_m é um parâmetro muito utilizado para indicar a ocorrência de estresse em plantas, uma vez que a redução no F_v/F_m reflete na redução da habilidade do PSII em reduzir o acceptor primário Q_A (quinona A) (CALATAYUD; BARRENO, 2001). Esta redução no F_v/F_m apresentada pelo DHFA em relação aos demais tratamentos se manteve no primeiro dia de reidratação no período das 5 e 10 h (tabela 4), o que indicaria o início de uma fotoinibição causada pelo efeito combinado da alta luminosidade com o déficit hídrico (ZHOU; LAM; ZHANG, 2007; SANDA *et al.*, 2011; WU; BAO, 2011) em plantas sem experiência prévia de seca, uma vez que o déficit hídrico causa inibição do ciclo de reparo do PSII em especial a proteína D1 (HAKALA *et al.*, 2005; OHNISHI *et al.*, 2005; NISHIYAMA *et al.*, 2006).

A impressão do estresse tem implicações positivas quando se trata das populações vegetais em ambientes estressantes e também para a conservação de espécies *in situ* (CHINNUSAMY; ZHU, 2009), pois aumenta a resiliência e pode reduzir a mortalidade de indivíduos de uma mesma população em momentos de déficit hídrico (WALTER *et al.*, 2013). Porém, é possível que exista consequências para a planta que apresenta este efeito de impressão do estresse, sendo que estas consequências ainda não foram bem esclarecidas (WALTER *et al.*, 2013). Segundo Chinnusamy e Zhu (2009) e Skirycz e Inzé (2010), o possível efeito negativo para a impressão do estresse seria na diminuição do crescimento das plantas, por impedir que estas alcancem seu potencial máximo de crescimento. Neste sentido, este estudo demonstrou que plantas de *S. bicolor* submetidas a dois eventos de déficit hídrico (DHR) apresentaram redução na MSC, MSF, MST e AF em relação as plantas controle em vários momentos avaliados após a reidratação do segundo evento de déficit hídrico (tabela 5). Enquanto isso, as plantas que passaram pelo déficit hídrico apenas na fase adulta (DHFA) não apresentaram

diferença na MSC, MSF, MST e AF em relação as plantas controle e submetidas a dois eventos de déficit hídrico (DHR) na maioria dos dias avaliados (tabela 5). Estes resultados indicam que eventos recorrentes de seca influenciam de forma negativa o acúmulo de massa seca na espécie *S. bicolor*, estando de acordo com o que Chinnusamy e Zhu (2009) e Skirycz e Inzé (2010) propuseram para o crescimento de plantas sob recorrentes eventos de seca. Assim como observado neste estudo, Abdallah *et al.* (2017) também observaram redução na massa seca total da parte aérea de oliveira com experiência prévia ao déficit hídrico em relação as plantas controle.

Na seca, as espécies reativas de oxigênio (ERO), tal como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são consideradas as principais alterações bioquímicas observadas em plantas sob este estresse (PAN *et al.*, 2006). Tais espécies reativas, quando em concentrações elevadas, podem causar danos as membranas, proteínas e ao DNA, porém, quando em concentrações adequadas, podem atuar na sinalização em resposta a diversos fatores ambientais (ALLEN, 1995; VRANOVÁ; INZÉ; BREUSEGEM, 2002; DANON *et al.*, 2005; GRENNAN, 2008; NOCTOR; REICHHELD; FOYER, 2018). No último dia de déficit hídrico o tratamento DHFA apresentou maior conteúdo de H_2O_2 e maior ocorrência de peroxidação lipídica em relação aos demais tratamentos (figura 6 e 7). Tal fato indica que plantas de *S. bicolor* sem experiência prévia ao déficit hídrico apresentam maior produção de H_2O_2 , o que resultou em danos a membrana plasmática das células como foi demonstrado pelo aumento no conteúdo de malondialdeído (MDA) (figura 7), um subproduto da peroxidação lipídica e importante marcador de estresse oxidativo (ROMERO-PUERTAS *et al.*, 2018). Estudos realizados por Abdallah *et al.* (2017) em oliveira com e sem experiência prévia a seca também demonstraram que plantas sem experiência prévia ao déficit hídrico apresentaram maior acúmulo de H_2O_2 e MDA em comparação a plantas com impressão do estresse.

Em resposta ao dano celular causado pelo aumento do H_2O_2 no tratamento DHFA (figura 6), a atividade da POD foi maior neste mesmo tratamento no último dia de déficit hídrico (figura 8), uma vez que a POD é conhecida como uma importante enzima antioxidativa responsável pela limpeza do excesso de H_2O_2 (ALMAGRO *et al.*, 2009; ONELE *et al.*, 2018). Enquanto isso, o tratamento DHR no último dia de déficit hídrico não apresentou aumento no conteúdo de H_2O_2 e na peroxidação lipídica (figura 6 e 7), demonstrando que plantas com experiência prévia ao déficit hídrico apresentaram maior tolerância a danos oxidativos durante o segundo estresse. Durante a reidratação, os tratamentos Controle, DHFA e DHR não apresentaram diferenças para os parâmetros de conteúdo de H_2O_2 e peroxidação lipídica

avaliados após dois dias de reidratação (figura 6 e 7), indicando a ausência de danos oxidativos. Contudo, a atividade da POD do DHFA ainda foi observada após dois dias de recuperação (figura 8) possivelmente como forma de aclimação a seca.

Segundo Sofo *et al.* (2004b) a manutenção da água na célula durante a seca é essencial para a tolerância a este estresse. Tal fato pode ser alcançado por meio do ajuste osmótico realizado por meio do acúmulo de açúcares solúveis e sacarose, os quais atuam como solutos osmoticamente ativos reduzindo o potencial osmótico celular e por sua vez garantindo o turgor da célula sob déficit hídrico (MAHAJAN; TUTEJA, 2005; SKIRYCZ; INZÉ, 2010; YOUSFI *et al.*, 2010). Neste sentido, o tratamento DHFA apresentou maior conteúdo de açúcares solúveis totais e sacarose em relação aos demais tratamentos no último dia de déficit hídrico (figura 4 e 5). Contudo, apesar destes açúcares atuarem como osmólitos, o CRA_{Folha} do DHFA no último dia de déficit hídrico do segundo experimento foi menor em relação aos demais tratamentos (tabela 2), o que indica que o acúmulo de açúcares no DHFA (figura 4 e 5) não foi suficiente para manter o turgor celular ao nível do Controle. Enquanto isso, apesar do tratamento DHR ter apresentado alto CRA_{Folha} durante o último dia de seca (tabela 2), o conteúdo de açúcares solúveis totais e sacarose deste mesmo tratamento não diferiu do Controle e foi menor do que o DHFA (figura 4 e 5). Desta forma, o acúmulo de açúcares não se configurou como um osmólito na manutenção da hidratação de *S. bicolor* submetido ao déficit hídrico recorrente. Tal fato destaca a importância da redução na densidade estomática relativa à área foliar de plantas com experiência prévia ao déficit hídrico (tabela 3) como principal forma de manutenção da hidratação celular em plantas com impressão do estresse.

A estrutura da cromatina (DNA e proteínas histonas) é capaz de limitar ou facilitar o acesso da maquinaria de transcrição gênica a um determinado gene. Modificações em determinados aminoácidos das proteínas histonas podem alterar a estrutura da cromatina permitindo ou não o acesso das proteínas responsáveis pela transcrição ao gene alvo, sendo estas modificações conhecidas como alterações epigenéticas (KOUZARIDES, 2007; DING *et al.*, 2014b). A metilação de aminoácidos em proteínas histonas, tal como a H3K4me3, atuam como importantes marcas epigenéticas. A ocorrência da H3K4me3 está relacionada com o processo de ativação da transcrição genica, deixando o gene em um estado permissível para a transcrição (BERGER, 2007; BRUCE *et al.*, 2007; GARCIA *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2010; BANNISTER; KOUZARIDES, 2011; LIJSEBETTENS; GRASSER, 2014). Neste sentido, ao avaliar a ocorrência da H3K4me3 no gene Sb04g038610 (*similar to Class III peroxidase 32 precursor*), verificou-se que o tratamento DHR apresentou maior enriquecimento da H3K4me3

em relação ao DHFA no último dia de déficit hídrico (figura 9), indicando que no DHR o gene Sb04g038610 se encontrava em um estado mais permissível a transcrição do que o DHFA.

Existem duas possíveis explicações para a maior ocorrência da marca de metilação H3K4me3 no DHR em relação ao DHFA no último dia de déficit hídrico (figura 9). A primeira explicação está relacionada ao surgimento da H3K4me3 no primeiro evento de déficit hídrico no início do desenvolvimento (15 DAS) com a posterior manutenção desta marca no segundo evento de déficit na fase adulta. Tal suposição pode ser feita baseado nos resultados obtidos por Feng *et al.* (2016) em *Arabidopsis thaliana* submetida ao estresse salino. Neste estudo, o gene de tolerância *P5CS1* apresentou aumento na ocorrência da H3K4me3 no primeiro evento de estresse salino, sendo esta marca mantida durante a recuperação. Com o segundo evento de estresse salino a presença da H3K4me3 neste mesmo gene foi ainda maior, demonstrando a importância da H3K4me3 como uma marca de impressão do estresse salino.

Outra possível explicação para a maior ocorrência da H3K4me3 no DHR em relação ao DHFA no último dia de déficit hídrico (figura 9) poderia estar relacionada a maior atividade das enzimas pertencentes ao grupo das histonas metil transferases (HMT) no tratamento DHR, as quais atuam na adição de grupos metil em aminoácidos como a lisina (KIM *et al.*, 2010; PAPAETHIMIOU; TSAFTARIS, 2012). Sendo assim, é provável que a experiência prévia ao déficit hídrico no início do desenvolvimento tenha influenciado de forma positiva no aumento da atividade das HMTs durante o segundo evento de déficit, o que explicaria tanto o aumento da H3K4me3 do tratamento DHR no último dia de déficit hídrico (figura 9) como também o aumento desta marca epigenética após dois dias de reidratação (figura 9). Contudo, independente da possível causa do aumento da ocorrência da H3K4me3 no DHR, fica evidente que o primeiro evento de déficit hídrico no início do desenvolvimento influenciou o enriquecimento da marca H3K4me3 durante o segundo evento de déficit, o que demonstra a possível existência e manutenção a longo prazo para uma forma epigenética de impressão do estresse por déficit hídrico em *S. bicolor* para o gene Sb04g038610.

A impressão do estresse pode ocorrer na forma de alterações epigenéticas, tal como a adição da marca H3K4me3. A presença e manutenção desta alteração está relacionada com a capacidade da planta em armazenar informações a longo prazo sobre eventos anteriores de estresse, o que possibilita a rápida ativação de um determinado gene de tolerância deixando-o permissível a transcrição caso o evento estressante retorne (BRUCE *et al.*, 2007; WALTER *et al.*, 2013; HAN; WAGNER, 2014). Após dois dias de reidratação, o tratamento DHR apresentou alto nível de enriquecimento da marca H3K4me3 (figura 9 e 10). Tal aumento

ocorreu quando a atividade da POD e as respostas fotossintéticas deste mesmo tratamento durante a reidratação estavam semelhantes ao controle (figura 8 e tabela suplementar 4), indicando que a H3K4me3 permaneceu em *S. bicolor* mesmo após a completa recuperação do segundo evento de seca.

Após seis dias de reidratação a ocorrência da H3K4me3 no DHR foi menor em relação a avaliação ocorrida após dois dias de reidratação (figura 10). Isto demonstra que alta ocorrência da marca epigenética H3K4me3 no gene Sb04g038610 de *S. bicolor* submetido a recorrentes eventos de seca tende a ser removida rapidamente durante a recuperação hídrica. Em estudos realizados por Kim *et al.* (2012) e por Ding, Fromm e Avramova, (2012) em *Arabidopsis thaliana* sob déficit hídrico seguido de reidratação também foi verificado que a presença da H3K4me3 tende a diminuir durante o processo de recuperação. Entretanto, durante a reidratação do tratamento DHFA foi observado que o enriquecimento da H3K4me3 não diminuiu com o tempo (figura 10), além disso, ao considerar a análise realizada no último dia de déficit hídrico, é possível verificar que o tratamento DHFA apresentou aumento na ocorrência da H3K4me3 ao longo do tempo (figura 10), o que indica que esta marca epigenética permaneceu em *S. bicolor* após exposição a um único evento de déficit hídrico.

Segundo Crisp *et al.* (2016), é no período de recuperação do déficit hídrico em que a planta deve “escolher” entre a consolidação da impressão do estresse, a fim de aumentar o investimento em tolerância a futuros eventos de seca em detrimento do crescimento, ou se apaga esta impressão, a fim de evitar a redução no crescimento. Neste estudo, apesar do tratamento DHR ter apresentado redução na presença da H3K4me3 no sexto dia de recuperação hídrica (figura 10), a ocorrência desta marca epigenética no DHR se estabilizou ao nível do tratamento DHFA aos seis dias de reidratação (figura 9), o que indica que a H3K4me3 foi mantida em ambos os tratamentos. Portanto, durante a segunda recuperação hídrica de *S. bicolor* é possível dizer que esta espécie “optou” por consolidar a impressão do estresse por déficit hídrico.

5.6. Conclusão

A espécie *S. bicolor* apresenta impressão do estresse por déficit hídrico a longo prazo, uma vez que plantas com experiência prévia ao déficit hídrico desde o início do desenvolvimento apresentam maiores repostas fotossintéticas, ausência de danos de membrana e melhor condição hídrica durante o segundo evento deste estresse na “fase adulta”. Além disso, a manutenção da redução na densidade estomática relativa à área foliar total em plantas com

experiência prévia a seca contribuiu para aumentar a tolerância a perda de água foliar, atuando como uma forma morfo-anatômica de impressão do estresse.

Mesmo após 51 dias de intervalo entre o primeiro e segundo evento de déficit hídrico do tratamento DHR, a alta ocorrência da H3K4me3 no DHR no último dia de déficit hídrico e após dois dias de reidratação, bem como a manutenção desta marca epigenética após seis dias de reidratação, indica a existência e permanência a longo prazo de um mecanismo epigenético de impressão do estresse para a ativação do gene Sb04g038610 (*similar to Class III peroxidase 32 precursor*) em eventos futuros de seca.

Apesar de plantas com experiência prévia ao déficit hídrico apresentarem impressão do estresse, o que confere maior chance de sobrevivência a eventos recorrentes de seca, o crescimento destas plantas é prejudicado, o que pode ser uma desvantagem na competição por recursos.

5.7. Reconhecimento

Reconhecemos o programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), o Departamento de Botânica, o Instituto de Biociências de Botucatu, a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

5.8. Material suplementar

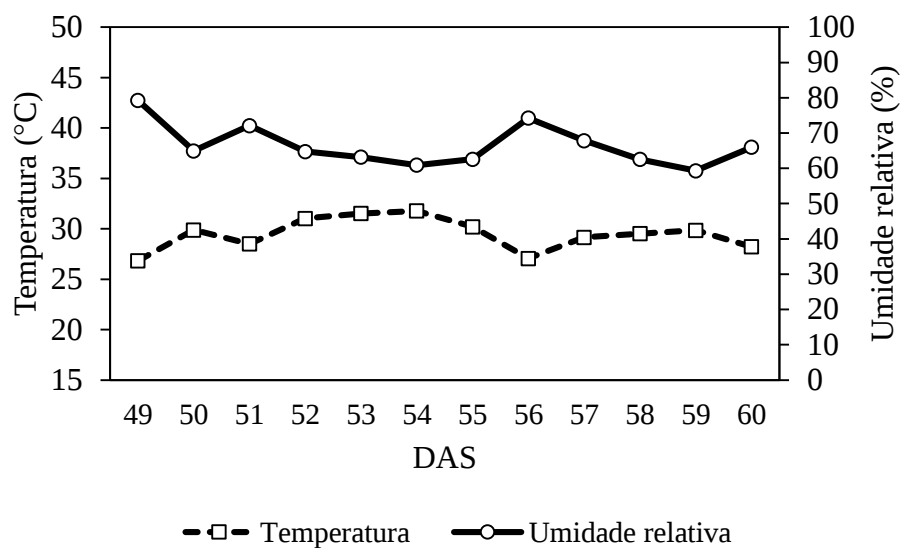


Figura suplementar 1: Média da temperatura do ar (°C) e umidade relativa do ar (%) entre 6 – 18 h durante o período de avaliação das trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* do primeiro experimento (49 – 60 dias após semeadura, DAS).

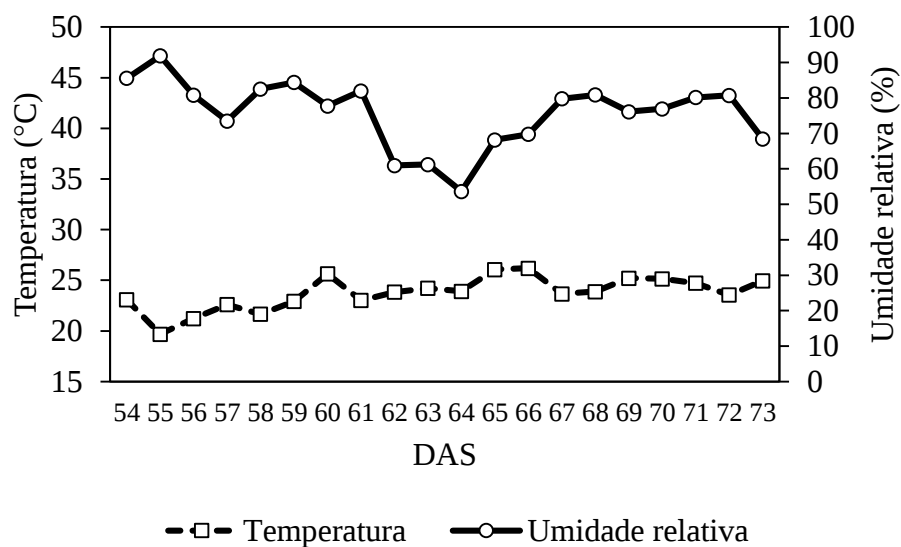


Figura suplementar 2: Média da temperatura do ar (°C) e umidade relativa do ar (%) entre 6 – 18 h durante o período de avaliação das trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* do segundo experimento (54 – 73 dias após semeadura, DAS).

Tabela suplementar 1: Sequência de primers para a quantificação da H3K4me3 na região situada entre 246 – 144 pares de base acima do sitio de início de transcrição do gene Sb04g038610 (*similar to Class III peroxidase 32 precursor*) e sequencia de primers para o gene Sb03g040880 (*Actin 1*) usado como controle positivo.

Gene	Primer foward	Primer reverse
Sb04g038610	CACCAATACAGCCCTTCCTC	AGGAGGTGTGGATACAACAAAG
Sb03g040880 Heimann et al. (2013)	GTGCTATTCCAGCCATCCTTCATTGG	GCGGTCAGCAATACCAGGGAAC

Tabela suplementar 2: Média ($n=5$) da densidade estomática (N° estômatos/ mm^2) após 27 dias de reidratação (81 DAS) do primeiro experimento na posição adaxial e abaxial de folhas que presenciaram o déficit hídrico aos 49 – 54 DAS (folhas velhas) e que surgiram após 27 dias de recuperação (folhas novas) em *S. bicolor* submetido aos tratamentos Controle, Déficit Hídrico na Fase Juvenil (DHFJ), Déficit Hídrico na Fase Adulta (DHFA) e Déficit Hídrico Recorrente (DHR).

Posição dos estômatos x Idade da folha	(N° estômatos/ mm^2)
Adaxial x Folha velha	96.5 Ba
Adaxial x Folha nova	104.0 Ba
Abaxial x Folha velha	110.0 Ab
Abaxial x Folha nova	134.3 Aa
Significância	
Tratamento	N.S.
Posição dos estômatos	$P<0.001$
Idade da folha	$P<0.001$
Tratamento x Posição dos estômatos	N.S.
Tratamento x Idade da folha	N.S.
Posição dos estômatos x Idade da folha	$P<0.05$
Tratamento x Posição dos estômatos x Idade da folha	N.S.

Letras diferentes nas colunas indicam diferença significativa pela análise de variância (ANOVA) de três fatores (4 tratamentos x 2 posições dos estômatos x 2 idades da folha) seguido do teste de Tukey ($P<0.05$). Letras maiúsculas comparam diferentes posições dos estômatos para uma determinada idade de folha e letras minúsculas comparam diferentes idades de folha para uma determinada posição do estômato na folha. N.S. indica diferença não significativa.

Tabela suplementar 3: Média ($n=5$) das trocas gasosas e da fluorescência da clorofila *a* de *S. bicolor* para os tratamentos Controle, Déficit Hídrico na Fase Juvenil (DHFJ), Déficit Hídrico na Fase Adulta (DHFA) e Déficit Hídrico Recorrente (DHR). Avaliações realizadas no primeiro dia de reidratação do primeiro experimento (Reid. (1 dia) 1º Experimento) no período das 11 h.

Reid. (1 dia) 1º Experimento				
	Controle	DHFJ	DHFA	DHR
<i>E</i>	3.34 a ± 0.73	3.52 a ± 0.81	3.05 a ± 1.05	3.47 a ± 0.61
<i>g_s</i>	135 a ± 37	136 a ± 34	113 a ± 37	132 a ± 29
<i>A_{Net}</i>	27 a ± 6	28 a ± 6	23 a ± 7	28 a ± 6
<i>EUA</i>	8 a ± 0.49	8 a ± 0.66	8 a ± 0.72	8 a ± 0.67
Φ_{PSII}	0.14 a ± 0.04	0.15 a ± 0.05	0.13 a ± 0.03	0.15 a ± 0.03
<i>qP</i>	0.25 a ± 0.08	0.27 a ± 0.10	0.29 a ± 0.06	0.28 a ± 0.07
<i>F_V'/F_M'</i>	0.55 a ± 0.09	0.56 a ± 0.04	0.45 a ± 0.06	0.56 a ± 0.06
<i>D</i>	0.44 a ± 0.09	0.44 a ± 0.04	0.55 a ± 0.06	0.44 a ± 0.06
<i>Ex</i>	0.42 a ± 0.11	0.41 a ± 0.08	0.32 a ± 0.06	0.40 a ± 0.07

Letras diferentes indicam diferença entre tratamentos pela análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($P<0.05$).

Tabela suplementar 4: Média ($n=5$) das trocas gasosas e da fluorescência da clorofila *a* de *S. bicolor* para os tratamentos Controle, Déficit Hídrico na Fase Juvenil (DHFJ), Déficit Hídrico na Fase Adulta (DHFA) e Déficit Hídrico Recorrente (DHR). Avaliações realizadas no primeiro dia de reidratação do segundo experimento (Reid. (1 dia) 2º Experimento) no período das 11 h.

Reid. (1 dia) 2º Experimento				
	Controle	DHFJ	DHFA	DHR
<i>E</i>	1.62 a ± 0.40	1.67 a ± 0.30	1.37 a ± 0.33	1.56 a ± 0.36
<i>g_s</i>	98 a ± 22	101 a ± 13	76 a ± 18	91 a ± 19
<i>A_{Net}</i>	25 ab ± 4	27 a ± 2	19 b ± 6	25 ab ± 4
<i>EUA</i>	16 a ± 3	17 a ± 2	13 a ± 3	16 a ± 1
Φ_{PSII}	0.15 a ± 0.01	0.17 a ± 0.01	0.13 a ± 0.03	0.16 a ± 0.03
<i>qP</i>	0.27 a ± 0.03	0.31 a ± 0.05	0.22 a ± 0.09	0.29 a ± 0.06
<i>F_V'/F_M'</i>	0.58 a ± 0.04	0.55 a ± 0.07	0.59 a ± 0.08	0.56 a ± 0.07
<i>D</i>	0.42 a ± 0.04	0.45 a ± 0.07	0.40 a ± 0.08	0.44 a ± 0.07
<i>Ex</i>	0.42 a ± 0.05	0.38 a ± 0.08	0.47 a ± 0.12	0.40 a ± 0.07

Letras diferentes indicam diferença entre tratamentos pela análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($P<0.05$).

Tabela suplementar 5: Média ($n=5$) da eficiência do uso da água (*EUA*), “quenching” fotoquímico (*qP*) e fração do excesso de energia não dissipada pelas antenas e não utilizadas fotoquimicamente na condição de luz (*Ex*) de *S. bicolor* para os tratamentos Controle, Déficit Hídrico na Fase Juvenil (DHFJ), Déficit Hídrico na Fase Adulta (DHFA) e Déficit Hídrico Recorrente (DHR). Avaliações realizadas no último dia de déficit hídrico do primeiro experimento (DH 1º Experimento) e no último dia de déficit hídrico do segundo experimento (DH 2º Experimento) no período das 11 h.

DH 1º Experimento				
	Controle	DHFJ	DHFA	DHR
<i>EUA</i>	7.38 a ± 0.47	7.13 a ± 1.03	5.38 a ± 3.17	6.93 a ± 0.59
<i>qP</i>	0.31 a ± 0.10	0.35 a ± 0.09	0.25 a ± 0.09	0.27 a ± 0.07
<i>Ex</i>	0.38 a ± 0.07	0.34 a ± 0.05	0.27 a ± 0.08	0.38 a ± 0.08
DH 2º Experimento				
	Controle	DHFJ	DHFA	DHR
<i>EUA</i>	8.98 a ± 1.23	8.73 a ± 1.0	4.60 a ± 6.90	6.69 a ± 2.97
<i>qP</i>	0.37 a ± 0.08	0.38 a ± 0.07	0.26 a ± 0.07	0.26 a ± 0.06
<i>Ex</i>	0.31 a ± 0.05	0.31 a ± 0.06	0.23 a ± 0.07	0.25 a ± 0.07

Letras diferentes indicam diferença entre tratamentos pela análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($P<0.05$).

Tabela suplementar 6: Média ($n=5$) da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD, atividade específica) e da atividade da enzima catalase (CAT, $\text{mmol s}^{-1} \mu\text{g proteína}^{-1}$). Avaliações realizadas no último dia de déficit hídrico do segundo experimento (DH 2º Experimento) e no segundo dia de reidratação do segundo experimento (Reid. (2º dia) 2º Experimento).

DH 2º Experimento				
	Controle	DHFJ	DHFA	DHR
SOD	60 a ± 14	64 a ± 14	65 a ± 12	50 a ± 13
CAT	0.34 a ± 0.10	0.34 a ± 0.17	0.42 a ± 0.19	0.30 a ± 0.13
Reid. (2 dias) 2º Experimento				
	Controle	DHFJ	DHFA	DHR
SOD	48 a ± 5	56 a ± 18	64 a ± 13	50 a ± 10
CAT	0.27 a ± 0.12	0.25 a ± 0.07	0.31 a ± 0.07	0.35 a ± 0.15

Letras diferentes indicam diferença entre tratamentos pela análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($P<0.05$).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo a combinação de avaliações fisiológicas, bioquímicas, morfo-anatômicas e epigenéticas possibilitaram a ampla compreensão dos padrões de respostas das plantas aos eventos recorrentes de seca, bem como dos mecanismos envolvidos na formação da impressão do estresse. Além disso, é importante ressaltar que tais resultados foram obtidos na espécie *S. bicolor*, a qual apresenta comprovada habilidade de tolerância a seca, o que permitiu avaliar a real capacidade e duração do efeito de impressão do estresse, uma vez que a maioria dos estudos sobre a impressão do estresse tem utilizado como modelo plantas sem capacidade de tolerância a seca.

Embora este experimento tenha ocorrido em condições de casa de vegetação, os resultados poderão servir de base em futuros experimentos sobre a impressão do estresse em condições de campo. Além disso, o delineamento experimental utilizado neste estudo abre a possibilidade para um novo tipo de manejo de mudas de espécies agrícolas e nativas. A indução do déficit hídrico em plântulas por algumas horas, tal como foi realizado em *S. bicolor*, poderia resultar na produção de mudas comerciais de espécies olerícolas, florestais e nativas com a impressão do estresse, o que por sua vez resultaria na redução das perdas agrícolas e na redução da mortalidade de mudas nativas em áreas de restauração em situações de seca recorrente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLAH, M. BEN; METHENNI, K.; NOUAIRI, I.; ZARROUK, M.; YOUSSEF, N. BEN. Drought priming improves subsequent more severe drought in a drought-sensitive cultivar of olive cv. Chétoui. **Scientia Horticulturae**, v. 221, n. September 2016, p. 43–52, 2017.
- ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, v. 24, n. 12, p. 1337–1344, 2001.
- ALLEN, R. D. Dissection of Oxidative Stress Tolerance Using Transgenic Plants. **Plant physiology**, v. 107, n. 4, p. 1049–1054, 1995.
- ALMAGRO, L.; GÓMEZ ROS, L. V.; BELCHI-NAVARRO, S.; BRU, R.; ROS BARCELÓ, A.; PEDREÑO, M. A. Class III peroxidases in plant defence reactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 2, p. 377–390, 2009.

AMZALLAG, G. N.; LERNER, H. R.; POLJAKOFF-MAYBER, A. Induction of Increased Salt Tolerance in *Sorghum bicolor* by NaCl Pretreatment. **Journal of Experimental Botany**, v. 41, n. 222, p. 29–34, 1990.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 373–399, 2004.

ARAÚJO, S. A. DO C.; DEMINICIS, B. B. Fotoinibição da Fotossíntese. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 4, 2009.

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.

BAKER, N. R.; ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of experimental botany**, v. 55, n. 403, p. 1607–1621, 2004.

BALUŠKA, F.; GAGLIANO, M.; WITZANY, G. **Memory and Learning in Plants**. Cham: Springer International Publishing, 2018.

BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell research**, v. 21, n. 3, p. 381–395, 2011.

BAROUX, C.; RAISSIG, M. T.; GROSSNIKLAUS, U. Epigenetic regulation and reprogramming during gamete formation in plants. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 21, n. 2, p. 124–133, 2011.

BECKERS, G. J. M.; JASKIEWICZ, M.; LIU, Y.; UNDERWOOD, W. R.; HE, S. Y.; ZHANG, S.; CONRATH, U. Mitogen-Activated Protein Kinases 3 and 6 Are Required for Full Priming of Stress Responses in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell Online**, v. 21, n. 3, p. 944–953, 2009.

BERGER, S. L. The complex language of chromatin regulation during transcription. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 407–412, 2007.

BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 396–398, 2007.

BLUM, A. **Plant Breeding for Water-Limited Environments**. New York, NY: Springer New York, 2011.

- BOWLER, C.; MONTAGU, M. V; INZE, D. Superoxide Dismutase and Stress Tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 43, n. 1, p. 83–116, 1992.
- BOYER, J. S. Plant productivity and environment. **Science**, v. 218, n. 4571, p. 443–448, 1982.
- BOYKO, A.; KOVALCHUK, I. Genome instability and epigenetic modification--heritable responses to environmental stress? **Current opinion in plant biology**, v. 14, n. 3, p. 260–266, 2011.
- 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.
- BRAY, E. A. Plant responses to water deficit. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 2, p. 48–54, 1997.
- BRUCE, T. J. A.; MATTHES, M. C.; NAPIER, J. A.; PICKETT, J. A. Stressful “memories” of plants: Evidence and possible mechanisms. **Plant Science**, v. 173, n. 6, p. 603–608, 2007.
- BUCHANAN, C. D.; LIM, S.; SALZMAN, R. A.; KAGIAMPAKIS, I.; MORISHIGE, D. T.; WEERS, B. D.; KLEIN, R. R.; PRATT, L. H.; CORDONNIER-PRATT, M.-M.; KLEIN, P. E.; MULLET, J. E. *Sorghum bicolor*’s Transcriptome Response to Dehydration, High Salinity and ABA. **Plant Molecular Biology**, v. 58, n. 5, p. 699–720, 2005.
- CALATAYUD, A.; BARRENO, E. Chlorophyll a fluorescence, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in tomato in response to ozone and benomyl. **Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)**, v. 115, n. 2, p. 283–289, 2001.
- CENTRITTO, M.; WAHBI, S.; SERRAJ, R.; CHAVES, M. Effects of partial rootzone drying (PRD) on adult olive tree (*Olea europaea*) in field conditions under arid climateII. Photosynthetic responses. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 106, p. 303–311, 2005.
- CHANDRA, A.; BHATT, R. K.; MISRA, L. P. Effect of Water Stress on Biochemical and Physiological Characteristics of Oat Genotypes. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 181, n. 1, p. 45–48, 1998.

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.

CHEN, H.-X.; GAO, H.-Y.; AN, S.-Z.; LI, W.-J. Dissipation of Excess Energy in Mehler-Peroxidase Reaction in Rumex Leaves During Salt Shock. **Photosynthetica**, v. 42, n. 1, p. 117–122, 2004.

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.

CHINNUSAMY, V.; GONG, Z.; ZHU, J.-K. Absciscic acid-mediated epigenetic processes in plant development and stress responses. **Journal of integrative plant biology**, v. 50, n. 10, p. 1187–1195, 2008.

CONRATH, U.; BECKERS, G. J. M.; FLORS, V.; GARCÍA-AGUSTÍN, P.; JAKAB, G.; MAUCH, F.; NEWMAN, M.-A.; PIETERSE, C. M. J.; POINSSOT, B.; POZO, M. J.; PUGIN, A.; SCHAFFRATH, U.; TON, J.; WENDEHENNE, D.; ZIMMERLI, L.; MAUCH-MANI, B. Priming: getting ready for battle. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 19, n. 10, p. 1062–1071, 2006.

CRISP, P. A.; GANGULY, D.; EICHTEN, S. R.; BOREVITZ, J. O.; POGSON, B. J. Reconsidering plant memory: Intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. **Science Advances**, v. 2, n. 2, p. e1501340–e1501340, 2016.

DAI, A. Drought under global warming: a review. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change**, v. 2, n. 1, p. 45–65, 2011.

DANON, A.; MIERSCH, O.; FELIX, G.; CAMP, R. G. L.; APEL, K. Concurrent activation of cell death-regulating signaling pathways by singlet oxygen in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 41, n. 1, p. 68–80, 2005.

DEVNARAIN, N.; CRAMPTON, B. G.; CHIKWAMBA, R.; BECKER, J. V. W.; O'KENNEDY, M. M. Physiological responses of selected African sorghum landraces to progressive water stress and re-watering. **South African Journal of Botany**, v. 103, p. 61–69, 2016.

DING, Y.; VIRLOUVET, L.; LIU, N.; RIETHOVEN, J.-J.; FROMM, M.; AVRAMOVA, Z. Dehydration stress memory genes of *Zea mays*; comparison with *Arabidopsis thaliana*. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 141, 2014a.

DING, Y.; LAPKO, H.; NDAMUKONG, I.; XIA, Y.; AL-ABDALLAT, A.; LALITHAMBIKA, S.; SADDER, M.; SALEH, A.; FROMM, M.; RIETHOVEN, J.-J.; LU, G.; AVRAMOVA, Z. The Arabidopsis Chromatin Modifier ATX1, the Myotubularin-like AtMTM, and the response to Drought; a view from the other end of the pathway. **Plant Signaling & Behavior**, v. 4, n. 11, p. 1049–1058, 2014b.

DING, Y.; FROMM, M.; AVRAMOVA, Z. Multiple exposures to drought “train” transcriptional responses in Arabidopsis. **Nature Communications**, v. 3, p. 740, 2012.

DING, Y.; NDAMUKONG, I.; XU, Z.; LAPKO, H.; FROMM, M.; AVRAMOVA, Z. ATX1-Generated H3K4me3 Is Required for Efficient Elongation of Transcription, Not Initiation, at ATX1-Regulated Genes. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 12, p. e1003111, 2012.

DING, Y.; AVRAMOVA, Z.; FROMM, M. The Arabidopsis trithorax-like factor ATX1 functions in dehydration stress responses via ABA-dependent and ABA-independent pathways. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 66, n. 5, p. 735–744, 2011.

DITMAROVÁ, L.; KURJAK, D.; PALMROTH, S.; KMET, J.; STRELCOVÁ, K. Physiological responses of Norway spruce (*Picea abies*) seedlings to drought stress. **Tree Physiology**, v. 30, p. 205–213, 2010.

DUBEY, A.; CHANDRA, A. Differential changes in enzyme activities caused by water stress in *Cenchrus* species. **Indian Journal Plant Physiology**, v. 8, p. 339–345, 2003.

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.

EVANS, J. R. Improving photosynthesis. **Plant physiology**, v. 162, n. 4, p. 1780–1793, 2013.
FAROOQ, M.; HUSSAIN, M.; WAHID, A.; SIDDIQUE, K. H. M. Drought Stress in Plants: An Overview. In: **Plant Responses to Drought Stress**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012. p. 1–33.

FEDDES, R.; DAM, J. Plant-Soil-Water Relations. In: **Encyclopedia of Soils in the Environment**. [s.l.] Elsevier, 2005. v. null p. 222–230.

- FENG, X. J.; LI, J. R.; QI, S. L.; LIN, Q. F.; JIN, J. B.; HUA, X. J. Light affects salt stress-induced transcriptional memory of P5CS1 in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 51, p. E8335–E8343, 2016.
- FLEXAS, J.; BOTA, J.; CIFRE, J.; MARIANO ESCALONA, J.; GALMES, J.; GULIAS, J.; LEFI, K.; FLORINDA MARTINEZ-CANELLAS, S.; TERESA MORENO, M.; RIBAS-CARBO, M.; RIERA, D.; SAMPOL, B.; MEDRANO, H. Understanding down-regulation of photosynthesis under water stress: future prospects and searching for physiological tools for irrigation management. **Annals of Applied Biology**, v. 144, n. 3, p. 273–283, 2004.
- 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.
- FOYER, C. H.; LELANDAIS, M.; KUNERT, K. J. Photooxidative stress in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 92, n. 4, p. 696–717, 1994.
- FRANKS, S. J.; WEBER, J. J.; AITKEN, S. N. Evolutionary and plastic responses to climate change in terrestrial plant populations. **Evolutionary Applications**, v. 7, n. 1, p. 123–139, 2014.
- GALMÉS, J.; MEDRANO, H.; FLEXAS, J. Photosynthetic limitations in response to water stress and recovery in Mediterranean plants with different growth forms. **The New phytologist**, v. 175, n. 1, p. 81–93, 2007.
- GARCIA, B. A.; HAKE, S. B.; DIAZ, R. L.; KAUER, M.; MORRIS, S. A.; RECHT, J.; SHABANOWITZ, J.; MISHRA, N.; STRAHL, B. D.; ALLIS, C. D.; HUNT, D. F. Organismal Differences in Post-translational Modifications in Histones H3 and H4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 10, p. 7641–7655, 2007.
- GARCIA, I. S.; SOUZA, A.; BARBEDO, C. J.; DIETRICH, S. M. C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Changes in soluble carbohydrates during storage of *Caesalpinia echinata* LAM. (Brazilwood) seeds, an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 2b, p. 739–745, 2006.
- GASPAR, T.; FRANCK, T.; BISBIS, B.; KEVERS, C.; JOUVE, L.; HAUSMAN, J. F.; DOMMES, J. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. **Plant Growth Regulation**, v. 37, n. 3, p. 263–285, 2002.
- GEORGE-JAEGGLI, B.; MORTLOCK, M. Y.; BORRELL, A. K. Bigger is not always better: Reducing leaf area helps stay-green sorghum use soil water more slowly. **Environmental and Experimental Botany**, v. 138, p. 119–129, 2017.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant physiology**, v. 59, n. 2, p. 309–314, 1977.

GILBERT, M. E.; MEDINA, V. Drought Adaptation Mechanisms Should Guide Experimental Design. **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 8, p. 639–647, 2016.

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.; SPARKS, D. L. (Eds.). **Encyclopedia of Soils in the Environment**. [s.l.] Elsevier, 2005. p. 231–238.

GRAYSON, M. Agriculture and drought. **Nature**, v. 501, n. 7468, p. S1–S1, 2013.

GRENNAN, A. K. A Transcriptomic Footprint of Reactive Oxygen Species. **Plant Physiology**, v. 148, n. 3, p. 1187–1188, 2008.

HAKALA, M.; TUOMINEN, I.; KERÄNEN, M.; TYYSTJÄRVI, T.; TYYSTJÄRVI, E. Evidence for the role of the oxygen-evolving manganese complex in photoinhibition of Photosystem II. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1706, n. 1-2, p. 68–80, 2005.

HAN, S.; WAGNER, D. Role of chromatin in water stress responses in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 10, p. 2785–2799, 2014.

HASANUZZAMAN, M.; NAHAR, K.; GILL, S. S.; FUJITA, M. Drought Stress Responses in Plants, Oxidative Stress, and Antioxidant Defense. *In*: **Climate Change and Plant Abiotic Stress Tolerance**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013. p. 209–250.

HE, Y.; LI, Z. Epigenetic Environmental Memories in Plants: Establishment, Maintenance, and Reprogramming. **Trends in Genetics**, v. 34, n. 11, p. 856–866, 2018.

HEGERL, G. C.; HANLON, H.; BEIERKUHNLEIN, C. Climate science: Elusive extremes. **Nature Geoscience**, v. 4, n. 3, p. 142–143, 2011.

HEIMANN, L.; HORST, I.; PERDUNS, R.; DREESEN, B.; OFFERMANN, S.; PETERHANSEL, C. A Common histone modification code on C4 genes in maize and its conservation in *Sorghum* and *Setaria italica*. **Plant physiology**, v. 162, n. 1, p. 456–69, 2013.

HETHERINGTON, A. M.; WOODWARD, F. I. The role of stomata in sensing and driving environmental change. **Nature**, v. 424, n. 6951, p. 901–908, 2003.

HIDEG, É.; SPETEA, C.; VASS, I. Superoxide radicals are not the main promoters of acceptor-side-induced photoinhibitory damage in spinach thylakoids. **Photosynthesis Research**, v. 46, n. 3, p. 399–407, 1995.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station Circular**, v. 347, n. 347, p. 1–32, 1950.

HULTEN, M. VAN; PELSER, M.; LOON, L. C. VAN; PIETERSE, C. M. J.; TON, J. Costs and benefits of priming for defense in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 14, p. 5602–5607, 2006.

ISHIKAWA, C.; HATANAKA, T.; MISOO, S.; FUKAYAMA, H. Screening of High k cat Rubisco among Poaceae for Improvement of Photosynthetic CO₂ Assimilation in Rice. **Plant Production Science**, v. 12, n. 3, p. 345–350, 2009.

JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 9, n. 6, p. 515–540, 1990.

JASKIEWICZ, M.; CONRATH, U.; PETERHÄNSEL, C. Chromatin modification acts as a memory for systemic acquired resistance in the plant stress response. **EMBO reports**, v. 12, n. 1, p. 50–55, 2011.

KIM, J.-M.; SASAKI, T.; UEDA, M.; SAKO, K.; SEKI, M. Chromatin changes in response to drought, salinity, heat, and cold stresses in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 114, 2015.

KIM, J.-M.; TO, T. K.; ISHIDA, J.; MATSUI, A.; KIMURA, H.; SEKI, M. Transition of chromatin status during the process of recovery from drought stress in *Arabidopsis thaliana*. **Plant & cell physiology**, v. 53, n. 5, p. 847–856, 2012.

KIM, J.-M.; TO, T. K.; NISHIOKA, T.; SEKI, M. Chromatin regulation functions in plant abiotic stress responses. **Plant, cell & environment**, v. 33, n. 4, p. 604–611, 2010.

KIM, J.-M.; TO, T. K.; ISHIDA, J.; MOROSAWA, T.; KAWASHIMA, M.; MATSUI, A.; TOYODA, T.; KIMURA, H.; SHINOZAKI, K.; SEKI, M. Alterations of lysine modifications on the histone H3 N-tail under drought stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. **Plant & cell physiology**, v. 49, n. 10, p. 1580–1588, 2008.

KOUZARIDES, T. Chromatin Modifications and Their Function. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 693–705, 2007.

KRANNER, I.; MINIBAYEVA, F. V.; BECKETT, R. P.; SEAL, C. E. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. **New Phytologist**, v. 188, n. 3, p. 655–673, 2010.

KREPS, J. A.; WU, Y.; CHANG, H.-S.; ZHU, T.; WANG, X.; HARPER, J. F. Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. **Plant physiology**, v. 130, n. 4, p. 2129–2141, 2002.

LÄMKE, J.; BÄURLE, I. Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants. **Genome Biology**, v. 18, n. 1, p. 124, 2017.

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

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.

LEMOES FILHO, J. P. DE. Fotoinibição em três espécies do cerrado (*Annona crassifolia*, *Eugenia dysenterica* e *Campomanesia adamantium*) na estação seca e na chuvosa. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 23, n. 1, p. 45–50, 2000.

LI, X.; CAI, J.; LIU, F.; DAI, T.; CAO, W.; JIANG, D. Cold priming drives the sub-cellular antioxidant systems to protect photosynthetic electron transport against subsequent low temperature stress in winter wheat. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 82, p. 34–43, 2014.

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.

LIJSEBETTENS, M. VAN; GRASSER, K. D. Transcript elongation factors: shaping transcriptomes after transcript initiation. **Trends in plant science**, v. 19, n. 11, p. 717–726, 2014.

LIM, T. K. **Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants**. 1. ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013.

LIU, C.; LU, F.; CUI, X.; CAO, X. Histone methylation in higher plants. **Annual review of plant biology**, v. 61, p. 395–420, 2010.

- LIU, Y.; QIN, L.; HAN, L.; XIANG, Y.; ZHAO, D. Overexpression of maize SDD1 (*ZmSDD1*) improves drought resistance in *Zea mays* L. by reducing stomatal density. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 122, n. 1, p. 147–159, 2015.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
- LOIDL, P. A plant dialect of the histone language. **Trends in plant science**, v. 9, n. 2, p. 84–90, 2004.
- LUNA, C. M.; PASTORI, G. M.; DRISCOLL, S.; GROTEN, K.; BERNARD, S.; FOYER, C. H. Drought controls on H₂O₂ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 417–423, 2005.
- MADLUNG, A.; COMAI, L. The effect of stress on genome regulation and structure. **Annals of botany**, v. 94, n. 4, p. 481–495, 2004.
- MAEJI, H.; NISHIMURA, T. Epigenetic Mechanisms in Plants. In: **Advances in Botanical Research**. Academic Press, 2018. v. 88p. 21–47.
- MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 444, n. 2, p. 139–158, 2005.
- MARTINEZ-MEDINA, A.; FLORS, V.; HEIL, M.; MAUCH-MANI, B.; PIETERSE, C. M. J.; POZO, M. J.; TON, J.; DAM, N. M. VAN; CONRATH, U. Recognizing Plant Defense Priming. **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 10, p. 818–822, 2016.
- MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence--a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 345, p. 659–668, 2000.
- MEDRANO, H.; ESCALONA, J. M.; BOTA, J.; GULIAS, J.; FLEXAS, J. Regulation of photosynthesis of C-3 plants in response to progressive drought: stomatal conductance as a reference parameter. **Annals of Botany**, v. 89, p. 895–905, 2002.
- MEI, X.; ZHONG, X.; VINCENT, V.; LIU, X. Improving Water Use Efficiency of Wheat Crop Varieties in the North China Plain: Review and Analysis. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 12, n. 7, p. 1243–1250, 2013.
- MELIS, A. Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage in vivo? **Trends in Plant Science**, v. 4, n. 4, p. 130–135, 1999.

MIN, S.-K.; ZHANG, X.; ZWIERS, F. W.; HEGERL, G. C. Human contribution to more-intense precipitation extremes. **Nature**, v. 470, n. 7334, p. 378–381, 2011.

MISHRA, A. K.; SINGH, V. P. A review of drought concepts. **Journal of Hydrology**, v. 391, n. 1–2, p. 202–216, 2010.

MORENO-SOTOMAYOR, A.; WEISS, A.; PAPAROZZI, E. T.; ARKEBAUER, T. J. Stability of leaf anatomy and light response curves of field grown maize as a function of age and nitrogen status. **Journal of Plant Physiology**, v. 159, n. 8, p. 819–826, 2002.

MORRIS, D. L. Quantitative Determination of Carbohydrates With Dreywood's Anthrone Reagent. **Science**, v. 107, n. 2775, p. 254–255, 1948.

MOSA, K. A.; ISMAIL, A.; HELMY, M. **Plant Stress Tolerance**. Cham: Springer International Publishing, 2017.

MUCHOW, R. C.; SINCLAIR, T. R. Epidermal conductance, stomatal density and stomatal size among genotypes of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Plant, Cell and Environment**, v. 12, n. 4, p. 425–431, 1989.

MYERS, S. S.; SMITH, M. R.; GUTH, S.; GOLDEN, C. D.; VAITLA, B.; MUELLER, N. D.; DANGOUR, A. D.; HUYBERS, P. Climate Change and Global Food Systems: Potential Impacts on Food Security and Undernutrition. **Annual Review of Public Health**, v. 38, n. 1, p. 259–277, 2017.

NADEAU, J.; SACK, F. D. Stomatal development: cross talk puts mouths in place. **Trends in Plant Science**, v. 8, n. 6, p. 294–299, 2003.

NADEAU, J. A.; SACK, F. D. Control of Stomatal Distribution on the Arabidopsis Leaf Surface. **Science**, v. 296, n. 5573, p. 1697–1700, 2002.

NEVES, D. M.; ALMEIDA, L. A. DA H.; SANTANA-VIEIRA, D. D. S.; FRESCHI, L.; FERREIRA, C. F.; SOARES FILHO, W. DOS S.; COSTA, M. G. C.; MICHELI, F.; COELHO FILHO, M. A.; GESTEIRA, A. DA S. Recurrent water deficit causes epigenetic and hormonal changes in citrus plants. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 13684, 2017.

NG, H. H.; ROBERT, F.; YOUNG, R. A.; STRUHL, K. Targeted Recruitment of Set1 Histone Methylase by Elongating Pol II Provides a Localized Mark and Memory of Recent Transcriptional Activity. **Molecular Cell**, v. 11, n. 3, p. 709–719, 2003.

- NGARA, R.; NDIMBA, B. K. Model plant systems in salinity and drought stress proteomics studies: a perspective on Arabidopsis and Sorghum. **Plant biology (Stuttgart, Germany)**, v. 16, n. 6, p. 1029–1032, 2014.
- NISHIYAMA, Y.; ALLAKHVERDIEV, S. I.; MURATA, N. A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1757, n. 7, p. 742–749, 2006.
- NOCTOR, G.; REICHHELD, J.-P.; FOYER, C. H. ROS-related redox regulation and signaling in plants. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 80, p. 3–12, 2018.
- NOROUZITALLAB, P.; BARUAH, K.; VANROMPAY, D.; BOSSIER, P. Can epigenetics translate environmental cues into phenotypes? **Science of The Total Environment**, v. 647, p. 1281–1293, 2019.
- OHNISHI, N.; ALLAKHVERDIEV, S. I.; TAKAHASHI, S.; HIGASHI, S.; WATANABE, M.; NISHIYAMA, Y.; MURATA, N. Two-step mechanism of photodamage to photosystem II: step 1 occurs at the oxygen-evolving complex and step 2 occurs at the photochemical reaction center. **Biochemistry**, v. 44, n. 23, p. 8494–8499, 2005.
- ONELE, A. O.; CHASOV, A.; VIKTOROVA, L.; BECKETT, R. P.; TRIFONOVA, T.; MINIBAYEVA, F. Biochemical characterization of peroxidases from the moss *Dicranum scoparium*. **South African Journal of Botany**, v. 119, p. 132–141, 2018.
- PAN, X.; GENG, Y.; ZHANG, W.; LI, B.; CHEN, J. The influence of abiotic stress and phenotypic plasticity on the distribution of invasive *Alternanthera philoxeroides* along a riparian zone. **Acta Oecologica**, v. 30, n. 3, p. 333–341, 2006.
- PAPAEFTHIMIOU, D.; TSAFTARIS, A. S. Characterization of a drought inducible trithorax-like H3K4 methyltransferase from barley. **Biologia Plantarum**, v. 56, n. 4, p. 683–692, 2012.
- PASSOS, L. P. **Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal**. Coronel Pacheco: Embrapa – CNPGL, 1996.
- PATERSON, A. H.; BOWERS, J. E.; BRUGGMANN, R.; DUBCHAK, I.; GRIMWOOD, J.; GUNDLACH, H.; HABERER, G.; HELLSTEN, U.; MITROS, T.; POLIAKOV, A.; SCHMUTZ, J.; SPANNAGL, M.; TANG, H.; WANG, X.; WICKER, T.; BHARTI, A. K.; CHAPMAN, J.; FELTUS, F. A.; GOWIK, U.; GRIGORIEV, I. V.; LYONS, E.; MAHER, C. A.; MARTIS, M.; NARECHANIA, A.; OTILLAR, R. P.; PENNING, B. W.; SALAMOV, A. A.; WANG, Y.; ZHANG, L.; CARPITA, N. C.; FREELING, M.; GINGLE, A. R.; HASH, C. T.; KELLER, B.; KLEIN, P.; KRESOVICH, S.; MCCANN, M. C.; MING, R.; PETERSON, D. G.; MEHBOOB-UR-RAHMAN; WARE, D.; WESTHOFF, P.; MAYER, K. F. X.; MESSING, J.; ROKHSAR, D. S. The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. **Nature**, v. 457, n. 7229, p. 551–556, 2009.

- PEIXOTO, P. H. P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA, R.; MOSQUIM, P. R.; MOREIRA, M. A. Aluminum Effects on Lipid Peroxidation and on the Activities of Enzymes of Oxidative Metabolism in Sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, n. 3, p. 137–143, 1999.
- QIN, F.; XU, H.; CI, D. Drought stimulation by hypocotyl exposure altered physiological responses to subsequent drought stress in peanut seedlings. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 7, p. 152, 2017.
- REA, S.; EISENHABER, F.; O'CARROLL, D.; STRAHL, B. D.; SUN, Z. W.; SCHMID, M.; OPRAVIL, S.; MECHTLER, K.; PONTING, C. P.; ALLIS, C. D.; JENUWEIN, T. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. **Nature**, v. 406, n. 6796, p. 593–599, 2000.
- ROMERO-PUERTAS, M. C.; TERRÓN-CAMERO, L. C.; PELÁEZ-VICO, M. Á.; OLMEDILLA, A.; SANDALIO, L. M. Reactive oxygen and nitrogen species as key indicators of plant responses to Cd stress. **Environmental and Experimental Botany**, 2018. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2018.10.012.
- SANDA, S.; YOSHIDA, K.; KUWANO, M.; KAWAMURA, T.; MUNEKAGE, Y. N.; AKASHI, K.; YOKOTA, A. Responses of the photosynthetic electron transport system to excess light energy caused by water deficit in wild watermelon. **Physiologia plantarum**, v. 142, n. 3, p. 247–264, 2011.
- SANI, E.; HERZYK, P.; PERRELLA, G.; COLOT, V.; AMTMANN, A. Hyperosmotic priming of Arabidopsis seedlings establishes a long-term somatic memory accompanied by specific changes of the epigenome. **Genome Biology**, v. 14, n. 6, p. R59, 2013.
- SANTOS, M. G.; RIBEIRO, R. V.; OLIVEIRA, R. F. DE; MACHADO, E. C.; PIMENTEL, C. 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.
- SASAKI, T.; ANTONIO, B. A. Sorghum in sequence. **Nature**, v. 457, n. 7229, p. 547–548, 2009.
- SEGATTO, F. B.; BISOGNIN, D. A.; BENEDETTI, M.; COSTA, L. C. DA; RAMPELOTTO, M. V.; NICOLOSO, F. T. Técnica para o estudo da anatomia da epiderme foliar de batata. **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1597–1601, 2004.
- SHEFFIELD, J.; WOOD, E. F.; RODERICK, M. L. Little change in global drought over the past 60 years. **Nature**, v. 491, n. 7424, p. 435–438, 2012.

SHEFFIELD, J.; WOOD, E. F. Projected changes in drought occurrence under future global warming from multi-model, multi-scenario, IPCC AR4 simulations. **Climate Dynamics**, v. 31, n. 1, p. 79–105, 2008.

SILVA, J. M. DA; ARRABACA, M. C. Photosynthesis in the water-stressed C4 grass *Setaria sphacelata* is mainly limited by stomata with both rapidly and slowly imposed water deficits. **Physiologia Plantarum**, v. 121, n. 3, p. 409–420, 2004.

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

SLAMA, I.; GHNAYA, T.; MESSEDI, D.; HESSINI, K.; LABIDI, N.; SAVOURE, A.; ABDELLEY, C. Effect of sodium chloride on the response of the halophyte species *Sesuvium portulacastrum* grown in mannitol-induced water stress. **Journal of Plant Research**, v. 120, n. 2, p. 291–299, 2007.

SOFO, A.; DICHIO, B.; XILOYANNIS, C.; MASIA, A. Effects of different irradiance levels on some antioxidant enzymes and on malondialdehyde content during rewatering in olive tree. **Plant Science**, v. 166, n. 2, p. 293–302, 2004a.

SOFO, A.; DICHIO, B.; XILOYANNIS, C.; MASIA, A. Lipoxygenase activity and proline accumulation in leaves and roots of olive trees in response to drought stress. **Physiologia Plantarum**, v. 121, n. 1, p. 58–65, 2004b.

SOUZA, R. P.; MACHADO, E. C.; SILVA, J. A. B.; LAGÔA, A. M. M. A.; SILVEIRA, J. A. G. 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.

SPEROTTO, R. A. **Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana**. 1. ed. Lajeado - RS: Editora Univates, 2014.

STIEF, A.; ALTMANN, S.; HOFFMANN, K.; PANT, B. D.; SCHEIBLE, W.-R.; BAURLE, I. Arabidopsis miR156 Regulates Tolerance to Recurring Environmental Stress through SPL Transcription Factors. **The Plant Cell**, v. 26, n. 4, p. 1792–1807, 2014.

SUDAN, J.; RAINA, M.; SINGH, R. Plant epigenetic mechanisms: role in abiotic stress and their generational heritability. **3 Biotech**, v. 8, n. 3, p. 172, 2018.

SUTKA, M. R.; MANZUR, M. E.; VITALI, V. A.; MICHELETTO, S.; AMODEO, G. Evidence for the involvement of hydraulic root or shoot adjustments as mechanisms underlying

water deficit tolerance in two *Sorghum bicolor* genotypes. **Journal of Plant Physiology**, v. 192, p. 13–20, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Plant physiology and development**. 6. ed. [s.l.] Sinauer, 2014.

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.

TARI, I.; LASKAY, G.; TAKÁCS, Z.; POÓR, P. Response of Sorghum to Abiotic Stresses: A Review. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 199, n. 4, p. 264–274, 2013.

TAO, Z.; SHEN, L.; GU, X.; WANG, Y.; YU, H.; HE, Y. Embryonic epigenetic reprogramming by a pioneer transcription factor in plants. **Nature**, v. 551, n. 7678, p. 124–128, 2017.

TOMBESI, S.; FRIONI, T.; PONI, S.; PALLIOTTI, A. Effect of water stress “memory” on plant behavior during subsequent drought stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 150, p. 106–114, 2018.

TRENBERTH, K. E.; DAI, A.; SCHRIER, G. VAN DER; JONES, P. D.; BARICHIVICH, J.; BRIFFA, K. R.; SHEFFIELD, J. Global warming and changes in drought. **Nature Climate Change**, v. 4, n. 1, p. 17–22, 2014.

TREWAVAS, A. Aspects of Plant Intelligence. **Annals of Botany**, v. 92, n. 1, p. 1–20, 2003.

URAO, T.; YAKUBOV, B.; SATOH, R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SEKI, M.; HIRAYAMA, T.; SHINOZAKI, K. A Transmembrane Hybrid-Type Histidine Kinase in Arabidopsis Functions as an Osmosensor. **The plant cell online**, v. 11, n. 9, p. 1743–1754, 1999.

VRANOVÁ, E.; INZÉ, D.; BREUSEGEM, F. VAN. Signal transduction during oxidative stress. **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 372, p. 1227–1236, 2002.

VRIET, C.; HENNIG, L.; LALOI, C. Stress-induced chromatin changes in plants: of memories, metabolites and crop improvement. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 7, p. 1261–1273, 2015.

WALTER, J.; JENTSCH, A.; BEIERKUHNLEIN, C.; KREYLING, J. 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.

WALTER, J.; NAGY, L.; HEIN, R.; RASCHER, U.; BEIERKUHNLEIN, C.; WILLNER, E.; JENTSCH, A. Do plants remember drought? Hints towards a drought-memory in grasses. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, n. 1, p. 34–40, 2011.

WAN, J.; GRIFFITHS, R.; YING, J.; MCCOURT, P.; HUANG, Y. Development of Drought-Tolerant Canola (*L.*) through Genetic Modulation of ABA-mediated Stomatal Responses. **Crop Science**, v. 49, n. 5, p. 1539–1554, 2009.

WANG, S.; JIA, S.; SUN, D.; FAN, H.; CHANG, X.; JING, R. Mapping QTLs for stomatal density and size under drought stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Integrative Agriculture**, v. 15, n. 9, p. 1955–1967, 2016.

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.

WANG, B.; LÜTTGE, U.; RATAJCZAK, R. Specific regulation of SOD isoforms by NaCl and osmotic stress in leaves of the C3 halophyte *Suaeda salsa* L. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, n. 3, p. 285–293, 2004.

WATERBORG, J. H. Plant histone acetylation: in the beginning ... **Biochimica et biophysica acta**, v. 1809, n. 8, p. 353–359, 2011.

WEATHERLEY, P. E. Studies in the water relations of the cotton plant. i. the field measurement of water deficits in leaves. **New Phytologist**, v. 49, n. 1, p. 81–97, mar. 1949.

WIETHÖLTER, S.; CERETTA, C. A.; FREIRE, C. J. S.; SCHERER, E. E.; ANGHINONI, I.; FIOREZE, I.; FIORIN, J. E.; VAHL, L. C.; ERNANI, P. R.; SCIVITTARO, W. B. **Manual de adubação e de calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 10. ed. Porto Alegre - SC: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo - Núcleo Regional Sul, 2004.

WILHITE, D. A. Drought as a Natural Hazard: Concepts and Definitions. *In: Drought: A Global Assessment*. London: Routledge, 2000. p. 3–18.

WINGLER, A.; LEA, P. J.; QUICK, W. P.; LEEGOOD, R. C. 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.

- WU, X.; BAO, W. Leaf growth, gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters in response to different water deficits in wheat cultivars. **Plant Production Science**, v. 14, n. 3, p. 254–259, 2011.
- XU, Z.; ZHOU, G.; SHIMIZU, H. Are plant growth and photosynthesis limited by pre-drought following rewatering in grass? **Journal of experimental botany**, v. 60, n. 13, p. 3737–3749, 2009.
- YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **The Biochemical journal**, v. 57, n. 3, p. 508–514, 1954.
- YIN, C.; PENG, Y.; ZANG, R.; ZHU, Y.; LI, C. Adaptive responses of *Populus kangdingensis* to drought stress. **Physiologia Plantarum**, v. 123, n. 4, p. 445–451, 2005.
- YOUSFI, N.; SLAMA, I.; GHNAYA, T.; SAVOURÉ, A.; ABDELLEY, C. Effects of water deficit stress on growth, water relations and osmolyte accumulation in *Medicago truncatula* and *M. laciniata* populations. **Comptes Rendus Biologies**, v. 333, n. 3, p. 205–213, 2010.
- ZHAO, W.; SUN, Y.; KJELGREN, R.; LIU, X. Response of stomatal density and bound gas exchange in leaves of maize to soil water deficit. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 1, p. 1704, 2015.
- 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.
- ZHU, J.-K. Epigenome sequencing comes of age. **Cell**, v. 133, n. 3, p. 395–397, 2008.
- ZHU, J.; JEONG, J. C.; ZHU, Y.; SOKOLCHIK, I.; MIYAZAKI, S.; ZHU, J.-K.; HASEGAWA, P. M.; BOHNERT, H. J.; SHI, H.; YUN, D.-J.; BRESSAN, R. A. Involvement of Arabidopsis HOS15 in histone deacetylation and cold tolerance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 12, p. 4945–4950, 2008.
- ZONG, W.; ZHONG, X.; YOU, J.; XIONG, L. Genome-wide profiling of histone H3K4-trimethylation and gene expression in rice under drought stress. **Plant Molecular Biology**, v. 81, n. 1–2, p. 175–188, 2012.