



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



MEMÓRIA FISIOLÓGICA INDUZ RESPOSTAS FOTOQUÍMICAS E BIOQUÍMICAS EM PLANTAS DE SORGO SOB DÉFICE HÍDRICO RECORRENTE

LÍVIA CARVALHO LEITE

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

BOTUCATU – SP

2020



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

MEMÓRIA FISIOLÓGICA INDUZ RESPOSTAS
FOTOQUÍMICAS E BIOQUÍMICAS EM PLANTAS DE
SORGO SOB DÉFICE HÍDRICO RECORRENTE

LÍVIA CARVALHO LEITE

PROF. DR. LUIZ FERNANDO ROLIM DE ALMEIDA

ORIENTADOR

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

BOTUCATU – SP

2020

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Leite, Livia Carvalho.

Memória fisiológica induz respostas fotoquímicas e bioquímicas em plantas de sorgo sob déficit hídrico recorrente / Livia Carvalho Leite. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Luiz Fernando Rolim de Almeida
Capes: 20303033

1. Sorgo. 2. Fotossíntese. 3. Desidratação (Hídrica).
4. Secas. 5. Aclimação (Plantas).

Palavras-chave: Aclimação; Estresse hídrico; Fotossíntese; Seca; *Sorghum bicolor*.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo alento, conforto e essência de vida.

Aos meus pais Cynthia e Maurício, pelos investimentos fraternos e materiais a mim concedidos.

Ao meu parceiro de vida Pedro, pelo amor e incansável companheirismo incondicional.

Ao meu professor Dr. Luiz Fernando Rolim de Almeida pela confiança e credibilidade a mim depositadas, permitindo-me a realização de um sonho.

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

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

Aos docentes e funcionários do Departamento de Botânica, especialmente ao funcionário Auro Pires, quem me ajudou ativamente na preparação do experimento.

Aos funcionários da UNESP que trabalham para a sustentação desta universidade.

Aos amigos e colegas de equipe do Laboratório de Ecofisiologia Thais, Felipe; Luís Paulo, Angelo, Tatiana e Jerônimo, os quais me ajudaram e me apoiaram nesta caminhada.

Ao amigo Felipe Giroto, por todo auxílio prestado para a execução deste trabalho.

À Geane e ao Kim, que me auxiliaram nas análises bioquímicas.

À Rafaela, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos professores Dr. João Domingos Rodrigues, Dra. Camila Kissman e especialmente à amiga Dra. Angélica Rodrigues que, além das contribuições na banca de qualificação, intermediou o primeiro contato com meu orientador e me auxiliou de diversas formas para a concretização desta pesquisa.

Ao professor Dr. João Pessoa que me concedeu a oportunidade de realizar parte do meu experimento no Instituto de Biotecnologia (IBTEC) e sua equipe, especialmente Camila, Leila e Jaqueline, as quais me auxiliaram e orientaram quanto às análises moleculares.

À minha amiga Larissa, quem me orientou e apoiou ativamente no planejamento e execução das análises moleculares, tanto de longe quanto de perto.

Aos colegas e amigos Carla, Jonas, Andressa, Tayeme, Diana, Fernanda, Juan e tantos outros que tive o prazer de conhecer ao longo deste processo.

À todas as pessoas que acreditaram e de alguma forma contribuíram para a conclusão desta etapa.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Delineamento experimental da condução dos tratamentos em plantas de sorgo em casa de vegetação. A: primeiro evento de déficit hídrico para o grupo DHR (14 dias sem irrigação); B: 9 dias sob irrigação; C: 8 dias sem irrigação; realização das coletas. Botucatu, 2018..... 24
- Figura 2: Diferença visual entre os tratamentos de déficit hídrico recorrente (A) e único (B); Botucatu, outubro/2019..... 30
- Figura 3: Conteúdo relativo de água (CRA; %) em *predawn* (A) e *midday* (B); potencial hídrico (Ψ_{H_2O} ; MPa) em *predawn* (C) e *midday* (D) de *Sorghum bicolor*: com disponibilidade hídrica (C); durante primeiro evento de déficit hídrico (DHU); e durante segundo evento de déficit hídrico (DHR). Valores são médias \pm erro-padrão de seis repetições. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os regimes hídricos ($p \leq 0,05$; teste Tukey)..... 31
- Figura 4: Rendimento quântico efetivo do PSII (ϕ_{II} ; A); dissipação fotoquímica (qP; B); dissipação não-fotoquímica (NPQ; C); taxa de transporte de elétrons (ETR; $\mu\text{mol.elétrons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$; D); fluorescência inicial (F_0 ; E); rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m ; F); fluorescência máxima não adaptada ao escuro (F_m' ; G); dissipação de calor pelas antenas (D; H) em *Sorghum bicolor*: com disponibilidade hídrica (C); durante primeiro evento de déficit hídrica (DHU); e durante segundo evento de déficit hídrica (DHR). Valores são médias \pm erro-padrão de seis repetições. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os regimes hídricos ($p \leq 0,05$; teste Tukey)..... 32
- Figura 5: Taxa transpiratória (E ; $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$; A); taxa de assimilação líquida de carbono (A ; $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; B); concentração interna de CO_2 (C_i ; $\mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$; C); uso eficiente da água (EUA ; $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{H}_2\text{O}$; D) em *S. bicolor*: com disponibilidade hídrica (C); durante primeiro evento de déficit hídrico (DHU); e durante segundo evento de déficit hídrico (DHR). Valores são médias \pm erro-padrão de seis repetições. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os regimes hídricos ($p \leq 0,05$; teste Tukey)..... 33

Figura 6: Concentrações foliares de açúcares solúveis totais (AST; A); amido (AMI; B); sacarose (SAC; C) em mg de açúcares solúveis totais/g de massa foliar de *Sorghum bicolor*: com disponibilidade hídrica (C); durante primeiro evento de déficit hídrico (DHU); e durante segundo evento de déficit hídrico (DHR). Valores são médias \pm erro-padrão de seis repetições. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os regimes hídricos ($p \leq 0,05$; teste Tukey)..... 34

Figura 7: Concentrações foliares de clorofila *a* (Chl *a*; A), clorofila *b* (Chl *b*; B), antocianina (ANT; C) e carotenoides (CAR; D) em $\mu\text{g/g}$ de massa foliar de *Sorghum bicolor*: com disponibilidade hídrica (C); durante primeiro evento de déficit hídrico (DHU); e durante segundo evento de déficit hídrico (DHR). Valores são médias \pm erro-padrão de seis repetições. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os regimes hídricos ($p \leq 0,05$; teste Tukey)..... 35

Figura 8: Concentrações foliares de peróxido de hidrogênio (PER; μM /massa foliar; A); peroxidação lipídica (LIP; nmol/g de massa foliar; B); atividade das enzimas peroxidase (POD; $\mu\text{mol/min/mg}$ de proteína; C) e superóxido dismutase (SOD; U/mg de proteína; D) em indivíduos de *Sorghum bicolor*: com disponibilidade hídrica (C); durante primeiro evento de déficit hídrico (DHU); e durante segundo evento de déficit hídrico (DHR). Valores são médias \pm erro-padrão de seis repetições. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os regimes hídricos ($p \leq 0,05$; teste Tukey)..... 36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela de primers contendo o codificante dos genes selecionados, a identificação e as sequências dos pares de primer nos sentidos direto (F) e reverso (R)..... 28

Tabela 2: Expressão relativa dos genes codificantes das proteínas PsbR e PsbS em indivíduos de *Sorghum bicolor*: com disponibilidade hídrica (C); durante primeiro evento de déficit hídrico (DHU); e durante segundo evento de déficit hídrico (DHR). Valores são médias \pm erro-padrão de seis repetições. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os regimes hídricos ($p \leq 0,05$; teste Tukey)..... 37

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE ABREVIACÕES	11
1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Consequência do déficit hídrico nos vegetais	
1.1.1. Proteínas fotossintéticas	13
1.1.2. Etapa fotoquímica	13
1.1.3. Metabolismo bioquímico	17
1.2. Memória fisiológica	19
1.3. Justificativa e objetivos	21
2. MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1. Material vegetal e delineamento experimental	22
2.2. Análise das variáveis	24
2.2.1. Relações hídricas	24
2.2.2. Trocas gasosas	25
2.2.3. Fluorescência da clorofila <i>a</i>	25
2.2.4. Metabolismo bioquímico	25
2.2.5. Análises moleculares	27
2.3. Análises estatísticas	29
3. RESULTADOS	30
3.1. Relações hídricas	30
3.2. Fluorescência da clorofila <i>a</i>	31
3.3. Trocas gasosas	33
3.4. Metabolismo bioquímico	34
3.4.1. Açúcares	34
3.4.2. Pigmentos	35
3.4.3. Metabolismo oxidativo	36
3.5. Expressão gênica	37
4. DISCUSSÃO	37
5. CONCLUSÃO	44
6. BIBLIOGRAFIA	45

LEITE, L. C. **MEMÓRIA FISIOLÓGICA INDUZ RESPOSTAS FOTOQUÍMICAS E BIOQUÍMICAS EM PLANTAS DE SORGO SOB DÉFICE HÍDRICO RECORRENTE.** 2020. 54 p. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

RESUMO - O desenvolvimento das plantas é controlado por vários fatores ambientais dentre os quais a água, cujo papel vital determina o sucesso no estabelecimento vegetal. Embora as intervenções abióticas as quais estão sujeitas ao longo de seu desenvolvimento possam prejudicá-las, os eventos de estresse anteriores podem induzir seu metabolismo contra posteriores, influenciando respostas. Memória de estresse envolve múltiplas modificações em níveis fisiológicos, proteômicos, transcricionais e mecanismos epigenéticos em plantas em resposta às essas mudanças no ambiente. Neste estudo, sugeriu-se a hipótese de que as plantas de sorgo previamente expostas a ciclos de déficit hídrico terão melhor desempenho fisiológico do que as que nunca enfrentaram esta condição, quando ambos grupos estão sujeitos à baixa disponibilidade de água. Este trabalho propôs identificar algumas das possíveis contribuições fisiológicas para com o desempenho fotoquímico de indivíduos da espécie *Sorghum bicolor* (L.) Moench submetidos a dois eventos de déficit hídrico, em comparação com indivíduos expostos a apenas um evento, além do grupo controle mantido sob irrigação. As respostas fisiológicas observadas em plantas submetidas a déficit hídrico recorrente indicam ajustes fisiológicos distintos das plantas do grupo submetido a esta condição apenas uma vez. Os resultados de relações hídricas, taxas fotossintéticas e conservação do aparato fotoquímico sugerem que experiência de estresse anterior pode desenvolver memória fisiológica. Os dados sugerem que as plantas foram capazes de armazenar informações do evento de restrição hídrica anterior, influenciando respostas durante o segundo evento de déficit.

Palavras-chave: fotossíntese, estresse hídrico, aclimatação, *Sorghum bicolor*, seca.

LEITE, L. C. **PHYSIOLOGICAL MEMORY INDUCES PHOTOCHEMICAL AND BIOCHEMICAL RESPONSES IN SORGHUM PLANTS UNDER RECURRENT WATER DEFICIT**. 2020. 54 p. MASTER THESIS (MASTER DEGREE) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

ABSTRACT - The development of plants is controlled by several environmental factors including water, whose vital role determines success in plant establishment. Notwithstanding the abiotic stresses that are subject throughout their development can harm them, stress events earlier tend to induce metabolism against further tensions in order to improve responses. Stress memory involves multiple changes in physiological, proteomic, transcriptional levels and epigenetic mechanisms in plants in response to these changes in the environment. In this study, the hypothesis was suggested that sorghum plants previously exposed to water deficit cycles will have a better physiological performance than those that never faced this condition, when both groups are subject to low water availability. This work proposed to identify some of the possible physiological contributions to the photochemical performance of individuals of the species *Sorghum bicolor* (L.) Moench submitted to two water deficit events, in comparison with individuals exposed to only one event, in addition to the control group kept under irrigation. The physiological responses observed in plants submitted to recurrent water deficit indicate physiological adjustments different from plants in the group submitted to this condition only once. The parameters of water relations, photosynthetic rates and conservation of the photochemical apparatus suggest that previous stress experience may develop physiological memory. The data suggest that the plants were able to store information from the previous water restriction event, as well as some changes during the acclimatization period improved responses during the second deficit event.

Keywords: photosynthesis, water stress, acclimatization, *Sorghum bicolor*, drought.

LISTA DE ABREVIACOES

A/Ci: eficiência aparente de carboxilao

A/E: eficiência do uso da gua

A: taxa de assimilao de CO₂

ABA: cido abscsico

AF: rea foliar

AFE: rea foliar específica

cDNA: DNA complementar

Chl: clorofila

Ci: concentrao interna de CO₂

CRA: conteúdo relativo de água da folha

Ct: Cycle Threshold

DPVar: défice de pressão de vapor do ar

E: taxa de transpirao

ETR: taxa de transporte de elétrons

EUA: eficiência do uso da gua

F₀: fluorescência inicial

Fm': fluorescência máxima não adaptada ao escuro

Fv/Fm: eficiência quântica máxima do PSII

Fv'/Fm': eficiência de captura de excitao pelos centros de reao

gs: condutância estomática

IRGA: Infra Red Gas Analyser

LHC: complexo antena (Light-harvesting complex)

MDA: malondialdeído

MF: massa fresca

MPa: Mega Pascal

mRNA: RNA mensageiro

MST: massa seca total

NPQ: dissipacão não – fotoquímica

PARamb: radiao fotossinteticamente ativa

PCR: reao em cadeia da polimerase

PhANG: Photosynthesis-Associated Nuclear Genes (Genes Nucleares Associados à Fotossíntese)

POD: peroxidase

PS: peso seco

PSI: fotossistema I

PSII: fotossistema II

PT: peso total

QA: quinona A

qE : quenching dependente de energia

qP: dissipação fotoquímica

qPCR: Real-Time PCR (PCR em tempo real)

RNA-seq: RNA sequenciamento

RT-qPCR: reação da transcriptase reversa, seguida de PCR

Rubisco: ribulose 1,5 bifosfato carboxilase/ oxigenase

SOD: superóxido dismutase

T: temperatura

UR: umidade relativa

Φ II: rendimento quântico efetivo do PSII

Ψ_{H_2O} : potencial químico da água

1. INTRODUÇÃO

1.1. Consequências do déficit hídrico nos vegetais

Os ambientes nos quais as plantas se desenvolvem são caracterizados por frequentes flutuações dos fatores externos, possibilitando a ocorrência de estresses sucessivos, frequentemente influenciando o desempenho da planta de forma interativa, amplificando ou melhorando as respostas da planta (Mittler, 2006). Uma das condições mais relevantes dentre estes fatores é o déficit hídrico, o qual se estabelece quando a absorção de água pelo sistema radicular não atende à demanda hídrica da planta (Fan *et al.*, 2006). A deficiência hídrica no solo afeta as trocas gasosas foliares através do decréscimo na transpiração e fotossíntese, sendo ambas reguladas pela condutância estomática, a qual diminui em plantas submetidas à seca, o que evita a perda de água por transpiração (Inman-Bamber e Smith, 2005). Apesar disso, muitos vegetais conseguem manter suas atividades fisiológicas e bioquímicas adequadas, capazes de estabilizar e proteger sua integridade celular e metabólica mesmo sob déficit hídrico (Xiong *et al.*, 2006; Levitt, 1980). Quando submetidos a esta condição, acionam mecanismos responsivos a partir da percepção de sinais, respostas moleculares e, conseqüentemente, morfofisiológicas. Durante a fase perceptiva, no início do distúrbio, ocorre instabilidade de proteínas e membranas, promovendo ativação de processos de reparo como a síntese proteica e organelas com função de proteção, possibilitando sua sobrevivência (Nathan *et al.*, 2016).

1.1.1. Proteínas fotossintéticas

A fotossíntese é um dos processos bioquímicos mais complexos da natureza, com o qual muitas proteínas estão envolvidas (Ganeteg *et al.*, 2004). Composta por duas etapas principais, o transporte de elétrons e o ciclo de Calvin-Benson, demanda diversos transcritos para seu funcionamento, os quais são codificados a partir de genes nucleares e plastidiais (Berry *et al.*, 2013), sendo os primeiros conhecidos como “PhANGs” (Ruckle *et al.*, 2007). O fotossistema II (PSII) é um complexo pigmentar-proteico encontrado nas membranas dos tilacóides de plantas, algas e cianobactérias, que catalisa, por indução luminosa, a transferência de elétrons provindos da água, resultando em oxigênio e prótons (Allahverdiyeva *et al.*, 2013). Muitas proteínas e alguns polipeptídeos fosforilados pertencentes a este complexo já foram identificadas (Hansson e Vener, 2003) e as expressões de seus respectivos genes são influenciadas por diferentes fatores metabólicos e ambientais (Foyer *et al.*, 2012).

Pesquisas demonstram que os fotossistemas são afetados pelo estresse hídrico, diminuindo a eficiência do transporte de elétrons através deles. A estabilidade das proteínas D1

e D2 e do complexo antena (LHCII) do PSII e os correspondentes níveis de seus transcritos também diminuem drasticamente sob estresse osmótico, o que pode ser atribuído à diminuição das taxas de transcrição e tradução e à degradação acelerada de proteínas e mRNAs (He *et al.*, 1995; Yuan *et al.*, 2005). Há evidências de que a ausência da proteína PsbR, importante elo do PSII que promove a estabilidade estrutural das proteínas PsbP (relacionada ao Complexo de Evolução do Oxigênio) e PsbQ, também componentes do complexo, promovida à partir do silenciamento de seu gene codificante (mutante *Arabidopsis psbR*), induziu à redução do conteúdo destas subunidades, sendo que sob condições de baixa luminosidade estes níveis quase atingiram esgotamento (Suorsa *et al.*, 2006). Allahverdiyeva *et al.* (2013), através da mesma metodologia, constataram que indivíduos nos quais a subunidade PsbR estava ausente, apresentaram maiores defeitos na atividade do PSII, possivelmente pelo prejuízo causado no transporte de elétrons através do centro de reação.

Exposta a importância do papel das proteínas do complexo do PSII para sua estabilidade estrutural, sem a qual é improvável a realização da fotossíntese e seus fenômenos dependentes, alguns estudos indicam o acervo preliminar teórico que nortearam a escolha dos alvos desta proposta de investigação. Chen *et al.* (2016) constataram que exemplares de *Arabidopsis thaliana* L. sob diferentes níveis de restrição hídrica apresentaram conteúdos relativo de água e de clorofila (Chl) e fluorescência de Chl reduzidos gradualmente e estrutura dos tilacóides danificadas. Também ocorreu desconfiguração do LHCII, no entanto, os dímeros do PSII mantiveram-se estáveis e diminuíram significativamente somente após 15 dias nesta condição. As taxas das proteínas Lhcb5, Lhcb6 e PsbQ diminuíram, porém a de PsbS aumentou significativamente após seca de longo prazo, o que é consistente com o aumento substancial da dissipação do excesso de energia em forma de calor apresentado, demonstrando a participação das proteínas do PSII e outros complexos da membrana tilacoide na resposta ao déficit hídrico de longo prazo.

Ganeteg *et al.* (2004) desenvolveram fenótipos diferentes em relação às composições de proteínas do complexo antena do aparelho fotossintético de plantas através da repressão dos respectivos genes individuais. Eles observaram que as linhagens transgênicas sem a proteína PsbS, que participa na ligação da clorofila ao PSII, foram as que mais exibiram fotoinibição da fotossíntese comparadas ao tipo selvagem correspondente. Li *et al.* (2000) demonstraram, através de ensaios com tratamentos luminosos, que a PsbS é parte essencial para a ocorrência do mecanismo de qe. Sui *et al.* (2015) analisaram perfis transcritos de duas linhagens endogâmicas de sorgo sacarino a fim de elucidar os mecanismos moleculares que acarretam em

altos níveis de açúcar durante o estresse salino. Os genes responsáveis por manter a estrutura do fotossistema e para regular o transporte de elétrons foram menos afetados pelo tratamento na linhagem tolerante. O gene codificante da proteína PsbR apresentou maior taxa de expressão no cultivar tolerante após tratamento de estresse salino.

1.1.2. Etapa fotoquímica

A conservação das proteínas estruturais do PSII é premissa para promoção da fotossíntese, pois é através destas que ocorre a etapa fotoquímica, o princípio de todo o processo. Para completá-la, é necessário que a planta apresente condições moleculares e fisiológicas que proporcionem o aproveitamento eficiente da energia solar, o qual permeia o transporte de elétrons entre os fotossistemas. O fenômeno que concorre com este mecanismo é o Quenching Dependente de Energia (q_e), componente principal do processo Quenching Não Fotoquímico (NPQ), que funciona alternando o complexo antena para um estado de dissipação térmica ao invés da propulsão do início da fotossíntese (Li *et al.*, 2000). A dissipação fotoquímica (qP) e não-fotoquímica (NPQ) são afetadas em caso de fotoinibição, fato que consiste em dano foto-oxidativo prejudicial para ambos processos, indicando sua função de fotoproteção (Horton *et. al*, 1996). Ou seja, a descompensação do processo de dissipação torna-se vantajosa pelo papel protetor que exerce sobre o mecanismo de interesse: a fotossíntese.

Estudos demonstraram que esta restrição promove danos do PSII (Sperdouli e Moustakas, 2012), especialmente aos pigmentos fotossintéticos (Brestic *et al.*, 2015) e a fosforilação de proteínas (Liu *et al.*, 2009). A energia residual capturada pelos complexos antena deve ser dissipada sem causar danos (Asada, 2006), do contrário, sob condições estressantes, acarreta na transferência dos elétrons para o O₂ molecular, formando as Espécies Reativas de Oxigênio (ERO). Essas moléculas podem afetar as propriedades da membrana celular e causar danos oxidativos aos ácidos nucleicos, lipídios e proteínas, podendo torná-los não funcionais (Gill e Tuteja, 2010; Giovagnetti e Ruban, 2018).

Os pigmentos fotossintéticos, clorofilas (a e b) e carotenoides, localizados nas membranas dos tilacoides dos cloroplastos, absorvem a energia luminosa, utilizada no processo fotossintético, alterando, assim, temporariamente suas configurações eletrônicas. Tais pigmentos passam do estado energético basal para o estado excitado e então dissipam esta energia por diferentes vias, sendo primariamente destinada à fotossíntese, mas também pode ser dissipada na forma de calor e/ou reemitida por fluorescência. Estes processos ocorrem simultaneamente e competem entre si, de forma que o aumento de um acarreta em redução do

outro. Deste modo, a fluorescência da clorofila a é usada no monitoramento do processo fotossintético, podendo expressar o nível de estresse de plantas (Maxwell e Johnson, 2000; Strasser, Srivastava e Tsimilli-Michael, 2004; Calatayud, Roca e Martínez, 2006). Nestas condições, é possível ocorrer interferência na eficiência quântica potencial do fotossistema II (PSII) e inativação da cadeia transportadora de elétrons, responsável pela formação de ATP e NADPH. A fluorescência inicial (F_0) é resultante da condição onde Q_A , quinona receptora primária de elétrons do PSII, está totalmente oxidada e o centro de reação do PSII está aberto em função da adaptação ao escuro, antes da energia ser dissipada para o centro de reação do PSII (Mathis e Paillotin, 1981). Quando a luz actínica é alta o suficiente para garantir uma taxa de redução de Q_A , que é mais rápida que a reoxidação de Q_A , o estado F_m é alcançado, representando redução total de Q_A (Krause e Weis, 1991).

A fluorescência pode também fornecer informações sobre o rendimento quântico, o fluxo de elétrons e sobre o estado de oxirredução da membrana do tilacoide (Winter e Demmig, 1987), mesmo que nenhuma fixação do CO_2 ou liberação do oxigênio ocorra. Neste caso qP está relacionado com a estimativa da disponibilidade de dissipação de energia para o metabolismo do carbono (Bolhar-Nordenkampf *et al.*, 1989). Além disso, quando a planta está com seu aparelho fotossintético intacto, a razão F_v/F_m deve variar entre 0,75 e 0,85, enquanto que a queda deste valor caracteriza condição de dano fotoinibitório nos centros de reação do PSII. Uma transformação (de tipo desconhecido) de uma fração dos centros para "*quencher*s" foi postulada (Cleland, Melis e Neale, 1986). Tais centros transformados ainda atuariam como captadores de energia, mas estariam incapazes de prosseguir com a reação fotoquímica normal e converteriam a energia de excitação em calor (Krause e Weis, 1991). A fotoinibição da fotossíntese se manifesta na folha através da perda de fixação de CO_2 e na membrana tilacóide dos cloroplastos através da diminuição da capacidade de transporte de elétrons do PSII (Cleland, Melis e Neale, 1986). Portanto, o *quenching* fotoinibitório é frequentemente expresso pela diminuição na relação F_v/F_m , registrada após um período escuro de vários minutos que precede alta exposição à luz (Krause e Weis, 1991).

O rendimento quântico potencial do PSII (F_v/F_m) e o rendimento quântico efetivo (ϕ_{II}) podem estimar a integridade do PSII de uma determinada folha, pois revela o nível energético de excitação dos pigmentos que promovem a fotossíntese (O'Neill, Shanahan e Schepers, 2006). Em um sentido geral, o termo "*quenching*" denota todos os processos que reduzem o rendimento de fluorescência abaixo de seu máximo. O *quenching* fotoquímico depende da presença de Q_A no estado oxidado. O coeficiente qP indica a proporção de elétrons capturados

sendo convertidos em energia química no centro de reação do PSII. Além deste, o rendimento de fluorescência também pode ser reduzido por mecanismos não diretamente relacionados ao estado redox de Q_A (Krause e Weis, 1991).

A dissipação não-fotoquímica (NPQ) representa o quanto de energia está sendo dispersada pelas vias não fotoquímicas. O *quenching* não-fotoquímico (NPQ) pode ser causado *in vivo* sob condições fisiológicas, por três mecanismos principais, dos quais destaca-se o *quenching* "fotoinibitório", relacionado à fotoinibição da fotossíntese, e o *quenching* não-fotoquímico dependente de energia (q_e). É sabido que este último é o principal componente do *quenching* não-fotoquímico (Briantais, *et al*, 1979; Giovagnetti e Ruban, 2018), o qual está relacionado com o gradiente de prótons através da membrana do tilacoide, que por sua vez está associado à formação de zeaxantina, carotenoide com propriedade dissipativa no sistema antena (Goss e Lepetit, 2015). A proteína PsbS está diretamente relacionada ao complexo antena e atua como um sensor de H^+ . Quando a PsbS está protonada, devido à queda no pH luminal, a zeaxantina pode se ligar a essa proteína. Graças a essa proximidade entre a zeaxantina com as clorofilas do LHC, ocorre a excisão de energia para esse carotenoide, o qual irá dissipar a energia na forma de calor (Wilhelm e Selma, 2011). Esse mecanismo é caracterizado pelo *quenching* de energia (q_e) o qual é o maior componente do *quenching* não-fotoquímico (NPQ) e tem uma importante função fotoprotetora.

1.1.3. Metabolismo bioquímico

Compostos podem se acumular nas células durante estresse hídrico, sem interferir nas reações metabólicas normais e equilibrar o ajuste osmótico celular (Barnawal, Singh e Singh, 2019). Dentre os metabólitos que comumente participam deste processo, Hoekstra, Golovina e Buitink (2001) constataram que os açúcares são extremamente significativos na preservação da estrutura e funcionalidade de proteínas e membranas. Sendo moléculas quimicamente diversas, os açúcares, especialmente durante a última década, têm sido estudados por seu papel crucial na tolerância ao estresse abiótico (Gangola e Ramadoss, 2018). O aumento do transporte de polióis, tanto no floema quanto no xilema, ocorre frequentemente como resultado do estresse salino ou da seca. Álcoois de açúcar (também chamados álcoois poliídricos, poliálcoois, alditóis ou glicitolis) são compostos orgânicos, tipicamente derivados de açúcares, compreendendo uma classe de polióis, os quais são solúveis em água, podem ocorrer naturalmente ou serem produzidos industrialmente a partir de açúcares (Awuchi, 2017). Em comparação com a sacarose, os polióis são produtos diretos da fotossíntese em folhas maduras (Noiraud,

Maurousset e Lemoine, 2001), mais frequentemente sequestrados metabolicamente, o que implica importante papel fisiológico na translocação e armazenamento de carboidratos (Chibbar *et al.*, 2015), sugerindo proporcionar acesso mais imediato à energia, especialmente em situações estressantes. Durante desidratação celular, os grupos hidroxila desta classe de substâncias efetivamente substituem a água no estabelecimento de pontes de hidrogênio e ajudam a manter as atividades enzimáticas e a proteção das estruturas de membrana (Noiraud, Maurousset e Lemoine, 2001).

Da composição dos açúcares solúveis totais por açúcares-fosfato, compostos intermediários do processo fotossintético como a trealose, sintetizada parte no citosol e parte no cloroplasto, é considerada o dissacarídeo mais eficaz na osmoproteção (Nahar, Hasanuzzaman e Fujita, 2015; Slama *et al.*, 2015). Este açúcar tem potencial de estabilização através da ligação de hidrogênio de seus grupos hidroxila aos grupos fosfatos das membranas e polares das proteínas (Kawai *et al.*, 1992). Durante a desidratação ou congelamento, através de um mecanismo especial denominado de vitrificação, a trealose pode formar uma estrutura higroscópica semelhante a vidro que possui baixa reatividade e a torna mais estável pelo seu caráter não redutor (Nahar, Hasanuzzaman e Fujita, 2015).

Como discutido, a clorofila *a* é responsável pela realização da fotoquímica, enquanto que os demais auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação, sendo assim chamados de pigmentos acessórios. A degradação de clorofila é a consequência da fotoinibição durante déficit hídrico (Silva *et al.*, 2007). Os carotenoides situam-se em íntima associação com as clorofilas, o que permite a transferência de energia para as mesmas (Taiz *et al.*, 2017). Em *X. humilis*, Beckett *et al.* (2012) observaram diminuição dos níveis de violaxantina e aumento de zeaxantina, alterações devido à conversão de violaxantina em zeaxantina (ciclo das xantofilas), a qual se liga às proteínas do sistema antena, levando a alterações na conformação e dissipação de energia na forma de calor e consequente ação antioxidante e de fotoproteção. As antocianinas fazem parte de um grupo de compostos denominado flavonóides os quais desempenham funções diversas nos vegetais, incluindo pigmentação e defesa. Durante a expansão foliar, senescência e em resposta a estresses abióticos, ocorre síntese de antocianina nas camadas epidérmicas das folhas de sorgo, sendo relacionadas à função fotoprotetora (Close e Beadle, 2003).

Organismos aeróbicos utilizam oxigênio comoceptor final de elétrons nos processos metabólicos, tais como a respiração e fotossíntese, acarretando na formação de espécies reativas de oxigênio (Pitzschke, Forzani e Hirt, 2006). Estas moléculas compõem a fisiologia do

metabolismo regular da planta, porém quando ocorre absorção de excesso de energia, resultante do aumento da fração do fluxo de fótons fotossintéticos não utilizados pela fotossíntese e nem dissipados através de calor, excede-se o limite entre os níveis citostático e citotóxico (Huang *et al.*, 2019). Estas substâncias reduzem o metabolismo habitual das plantas através de danos oxidativos nas estruturas celulares (Hasanuzzaman *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2019). As plantas desenvolveram mecanismos que limitam a formação de ERO e promovem sua remoção (Alscher, Erturk e Heath, 2002), sendo as enzimas antioxidantes potenciais defesas para esta atividade, as quais atuam conjuntamente, promovendo a proteção e mitigação de efeitos tóxicos (Rahman, Biswas e Kode, 2006).

O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é o precursor de várias ERO devido à sua instabilidade e forte oxidação/reduzibilidade (Zeng *et al.*, 2017). Pode ser produzido por cadeias de transporte de elétrons fotossintetizantes, cadeias de transporte de elétrons respiratórios mitocondriais e sistemas NADPH oxidase dependentes de membrana, que reagem com íons de hidrogênio para formar moléculas de oxigênio ou dismutação do $O_2^{\cdot-}$ pela (SOD) para formar H_2O_2 (Mittler, 2017). Apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desapareados na última camada, o H_2O_2 é uma ERO extremamente deletéria (Ngumbi e Kloepper, 2016), capaz de atravessar camadas lipídicas (Comhair e Erzurum, 2002) podendo ser transportada por aquaporinas localizadas na membrana celular, causando danos oxidativos de longa distância e inibição da fixação de carbono (Wudick *et al.*, 2015). Por outro lado, as ERO podem promover alterações nas estruturas morfológicas de plantas, aumentando a resistência a estresse (Frederickson Matika e Loake, 2013).

1.2. Memória fisiológica

Aclimação vegetal pode ser caracterizada por uma melhora na resposta mediante exposição repetida ao estresse ambiental. Esta denominação representa uma mudança não permanente na fisiologia ou morfologia do indivíduo, podendo ser revertida se as condições prevalentes se alterarem. Além disso, os mecanismos epigenéticos que alteram a expressão de genes, sem mudar o código genético de um organismo, podem estender a duração das respostas de aclimação e torná-las herdáveis. Quando as mudanças epigenéticas, em uma população vegetal inteira, são fixadas ao longo de muitas gerações por pressão ambiental seletiva, elas são denominadas como adaptação (Taiz *et al.*, 2017). Nos últimos anos, reconheceu-se que as modificações da cromatina, o posicionamento do nucleossomo e a metilação do DNA são componentes importantes nessas aclimações e adaptações. Tais modificações podem fornecer

condições para uma memória de estresse, permitindo que as plantas respondam de maneira mais eficiente ao estresse futuro (Lämke e Bäurle, 2017). A estrutura da cromatina regula a acessibilidade dos genes para a maquinaria transcricional e, portanto, parte integrante da expressão gênica regulada em respostas e desenvolvimento de estresse (Zentner e Henikoff, 2013).

Walter et al. (2011) conclui que estudos adicionais devem elucidar os processos de aclimação em nível molecular e bioquímico mais profundamente, a fim de relacioná-los aos parâmetros funcionais. Os mecanismos de aclimação a longo prazo ainda precisam ser examinados para melhor compreensão das respostas das plantas às mudanças climáticas, possibilitando conjecturar projeções para adaptação mediante estresses. Zhang et al. (2018) sugerem em pesquisa com *Panicum virgatum* L., através de parâmetros fisiológicos, análises químicas e informações transcricionais, que esta espécie melhorou sua resposta ao segundo estresse de desidratação alterando as vias de biossíntese de ABA, ácido jasmônico e transdução de sinal, aumentando a biossíntese de osmólitos (l-prolina, rafinose, estaquiose e trealose) e modificando seus sistemas de metabolismo energético (especificamente, aqueles envolvidos na fotossíntese, glicólise e ciclo do ácido tricarbóxico).

Visto que as plantas apresentam sofisticados mecanismos de defesa, foi recentemente demonstrado que são capazes de “lembrar” eventos ambientais passados, mesmo muito depois que ele tenha terminado (Kinoshita e Seki, 2014). Esse processo frequentemente é referido como “memória” ou “*plant priming*”, pois tende a responder mais rápido à recorrência do estresse, em comparação com a primeira vez que o enfrentou (Bruce *et al.*, 2007). Portanto, as respostas das plantas à seca recorrente, isto é, ciclos repetidos de seca, diferem daquelas sob incidências únicas de seca (Fleta-Soriano e Munné-Bosch, 2016). Contudo, poucos estudos têm demonstrado a comparação entre as respostas do PSII ao déficit hídrico de evento repetido, especialmente em relação ao seu complexo proteico do PSII.

Mediante estímulo ambiental, as plantas expressam diferentes tipos de reação e são capazes de produzir e emitir sinais elétricos em todas as células do seu organismo. A maior parte das moléculas responsáveis pela comunicação e pelas atividades neuronais no cérebro humano também se encontram presentes nas plantas, com um funcionamento muito semelhante. O processo é muito parecido e implica de certo modo que as plantas também possuem processos de informação, de memória, de decisões e de resolução de problemas” (Alpi *et al.*, 2007). Diferentes definições de inteligência foram postuladas e, de maneira geral, pressupõem a capacidade dos organismos de solucionar problemas experimentados durante o ciclo de vida.

Portanto, o sucesso da sobrevivência ocorre através de formas de aprendizado e memória e, conseqüentemente, são reconhecidos como inteligentes. Não apenas organismos dotados de terminações nervosas são capazes de comportamentos inteligentes, visto que as interações planta-ambiente também se baseiam por sinais elétricos e demonstram ser suficientes para seu estabelecimento. Ao se comparar a cognição das plantas com a de um ser humano, ambos são capazes de perceber e coletar diversas informações do ambiente, integrá-las ao seu organismo e conciliar respostas ao seu bem-estar (Trewavas, 2017).

1.3 Justificativa e objetivos

Dando continuidade aos trabalhos já executados por outros autores deste mesmo grupo de pesquisa, através dos quais abordaram estratégias de respostas, recuperação e memória fisiológica em plantas de sorgo (Schley, 2016; Mantoan, 2019), pretende-se investigar alguns dos mecanismos envolvidos no sucesso de uma aclimação, através da avaliação em condições de eventos de estresse repetido, incidência ocorrente em plantas expostas ao meio ambiente, sem a manipulação de fatores externos, como luz, disponibilidade de água, etc. Dadas as constatações da importância das proteínas integrantes do complexo fotossintético para sua estabilidade, propôs-se avaliar o padrão transcricional dos genes: codificante da proteína PsbR, relacionada com a viabilidade do transporte de elétrons, em tratamentos de déficit hídrico única e recorrente e; da proteína PsbS, concernente à Dissipação Não-Fotoquímica; isto é, a realização do fenômeno e a proteção para que esta ocorra.

A espécie *Sorghum bicolor* (L.) Moench, proposta para esta pesquisa, apresenta via fotossintética C4, cuja matéria-prima tem relevância econômica, utilizada na produção de fibras, biocombustíveis (Paterson et al., 2009), forragem e é base alimentar de aproximadamente meio bilhão de pessoas na África Subsaariana e Ásia (Xin, Aiken e Burke, 2009). O padrão da fisiologia de plantas C4 envolve a operação de dois ciclos fotossintéticos (C3 e C4) através de dois tipos de células fotossintéticas (mesófilo e bainha), que são organizadas em camadas concêntricas ao redor do feixe vascular (Hatch, 1987) capazes de concentrar CO₂ ao redor do sítio de carboxilação da rubisco. Desta forma, os cloroplastos da célula do mesófilo são responsáveis pela etapa fotoquímica, enquanto os da bainha do feixe pela etapa bioquímica (Caemmer e Furbank, 2003). Considerada um das espécies mais tolerantes ao déficit hídrico (Burow, Franks e Xin, 2008), *Sorghum bicolor* (L.) Moench possui genoma quase todo sequenciado por ser relativamente pequeno, um bom modelo para a identificação de regiões genômicas relacionadas à seca e genes valiosos para desvendar a alta

complexidade de características relacionadas à esta tolerância (Sanchez *et al.*, 2002). Seus genes homólogos das proteínas-alvo não apresentam informações nas categorias de dados da plataforma National Center of Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/), com exceção de apenas um trabalho (Sui *et al.*, 2015), referente ao gene codificante da proteína PsbR, o que corrobora a importância de melhor elucidação a respeito do comportamento transcricional de ambos.

A hipótese deste estudo é que as plantas submetidas a eventos recorrentes de déficit hídrico apresentarão respostas mais eficazes do que aquelas expostas a um único evento. A exposição prévia ao estresse favorecerá o desempenho fisiológico influenciando as trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, metabolismo bioquímico e expressão dos genes das proteínas PsbS e PsbR, condição esta sustentada pela “memória de estresse. Defende-se, portanto, que um diferente padrão de expressão de genes relacionados à essas proteínas contribuam para a estabilidade da estrutura e proteção da primeira fase fotossintética, possibilitando sua ocorrência. Sustenta-se também que estes alvos moleculares e suas respectivas expressões aprimoradas, devido ao primeiro estresse, são relevantes para a manutenção e conservação da etapa fotoquímica em condição adversa, a qual as plantas serão submetidas. Objetiva-se, portanto: comparar respostas fisiológicas entre condições de déficit hídrico único e recorrente, como a fluorescência da Chl *a*, trocas gasosas, relações hídricas, avaliações bioquímicas e expressões gênicas; avaliar se as expressões dos genes de proteínas PsbS e PsbR contribuem para a proteção e manutenção da etapa fotoquímica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e delineamento experimental

O experimento foi realizado no Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), *campus* de Botucatu, no período de julho a outubro de 2018, em Botucatu, São Paulo, Brasil.

Sementes de sorgo do cultivar BRS 332, cedidas pela EMBRAPA, foram manualmente plantadas em casa de vegetação sob luz natural em vermiculita, mantidas por 15 dias para enraizamento, recebendo irrigação duas vezes ao dia. Após este período, foram transferidas para 110 vasos de 12 L, organizados aleatoriamente dentro da casa de vegetação, contendo 10 kg de solo (peso seco) cada um, com adubação e calagem calculadas, a partir de análise em laboratório especializado, e aplicadas conforme recomendações de Raij *et al.*, (1997). Aplicou-se irrigação até início de escoamento pela parte inferior (Thameur *et al.* 2012),

no dia anterior ao plantio das mudas, antes do qual mediu-se a massa (peso úmido) de cada vaso.

Todas as plantas foram mantidas irrigadas até o 36º dia (à partir da sementeira), quando se iniciou o evento de déficit hídrico para 1/3 dos indivíduos, assim mantida até o 50º dia (à partir da sementeira), contabilizando 14 dias de suspensão da irrigação, quando atingiu g_s (condutância estomática) 49.0 mmol/(m²s), monitorada via porômetro Leaf Porometer (Decagon/EUA), quase 93% menos que as irrigadas. Este valor foi estabelecido como referencial para a decisão da suspensão [$g_s < 50$ mmol/(m² s)], por ser considerada uma das primeiras variáveis que responde ao estresse hídrico e determinante para o declínio da fotossíntese (Du *et al.*, 1996; Flexas e Medrano, 2002) e pode ocorrer mesmo antes de alterações no CRA (conteúdo relativo de água) (Zhang, H. Outlaw Jr e Aghoram, 2001). Nesta ocasião, a temperatura média foi de 36.0 °C, umidade relativa (UR) = 59.6 %, déficit de pressão de vapor do ar (DPV_{ar}) = 0.5958 kPa (índices das médias diárias). As plantas foram reidratadas e assim mantidas até a g_s média dos dois grupos, então formados, não apresentasse diferença significativa. Após a recuperação desta variável, contabilizando 9 dias de reidratação, iniciou-se evento de déficit hídrico no 67º dia (após sementeira) para 2/3 do n amostral (grupo de 1/3 de indivíduos anteriormente submetidos a evento de déficit hídrico + 1/3 de indivíduos irrigados), de forma que as comparações dos tratamentos ocorressem entre plantas com idades e condições ambientais semelhantes (Figura 1). Assim permaneceram por mais 8 dias, quando g_s diminuiu aproximadamente 90% do valor do grupo irrigado e, desta forma, originaram-se 3 grupos: irrigado/controle (C); evento único de déficit hídrico (DHU); e déficit hídrico recorrente (DHR). Nesta circunstância, foram feitas coletas para avaliações de fluorescência, trocas gasosas, relações hídricas, metabolismo bioquímico e expressão gênica, sendo as amostras compostas por 6 repetições biológicas. O ambiente apresentou PAR_{amb} (média entre 11-13h00) = 707.38 μmol m⁻² s⁻¹; Temperatura (média diária) = 32.1 °C; UR (média diária) = 63.71%; DPV_{ar} (média diária) = 0.6371 kPa.

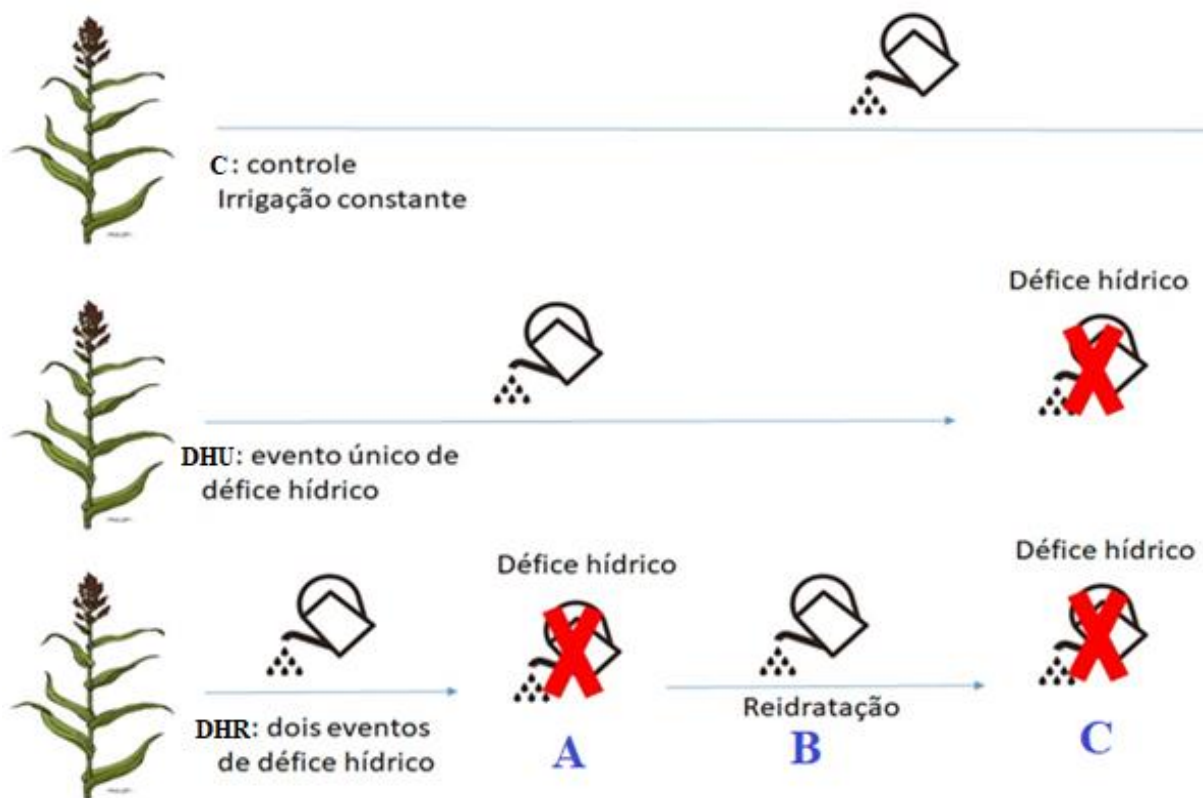


Figura 1: Delineamento experimental da condução dos tratamentos em plantas de sorgo em casa de vegetação. A: primeiro evento de déficit hídrico para o grupo DHR (14 dias sem irrigação); B: 9 dias sob irrigação; C: 8 dias sem irrigação; realização das coletas. Botucatu, 2018.

2.2. Análise das variáveis

2.2.1. Relações hídricas

O conteúdo relativo de água (CRA, %) das folhas foi estimado a partir de amostras foliares recém-coletadas, nos períodos de *predawn* e *midday*, com limbos expandidos e expostos, cortadas em quadrado (2 cm x 2 cm) e imediata obtenção da massa fresca (MF). Depois foram colocadas em placas de Petri, com papel de filtro, imersas em água deionizada e acondicionadas por 24 horas a 5°C para reidratação (Elsheery e Cao, 2008). Em seguida, as amostras foram pesadas em balança de precisão a fim de obter a massa túrgida e depois acondicionadas em estufa a 60° C, até estabilização do peso, sendo este o valor da massa seca. O CRA foi determinado de acordo com Smart e Bingham (1974), segundo a fórmula: $CRA (\%) = (MF-MS) / (MT-MS) \times 100$. O potencial hídrico da folha (Ψ_{H2O} da folha, MPa) também foi medido nos períodos de *predawn* e *midday*, através de amostras coletadas e posteriormente analisadas em Analisador de Potencial Água com Controlador de Temperatura, WP4-T (Decagon/ EUA).

2.2.2. Trocas gasosas

As trocas gasosas foram feitas entre 12 e 13h00 por equipamento com sistema aberto com analisador de CO₂ e vapor d'água por radiação infra-vermelha (Infra Red Gas Analyser – IRGA, modelo LI-6400 - LI-COR), em 6 repetições biológicas de cada tratamento, padronizando-se a 2^a ou 3^a folha que apresentou o limbo totalmente expandido, compreendendo as variáveis: taxa de assimilação de CO₂ (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), taxa de transpiração (E , $\text{mmol vapor d'água m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e concentração interna de carbono na folha (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$). A eficiência do uso da água (EUA , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) foi calculada pela relação entre assimilação de CO₂ e taxa de transpiração, descrita por Berry e Downton (1982).

2.2.3. Fluorescência da clorofila *a*

Para este fim, entre 11 e 12h00, foi utilizado um fluorômetro PAM – Junior, (Chlorophyll – Fluorometer WALZ/Alemanha) para aferir variáveis fotoquímicas: fluorescência inicial adaptada ao escuro (F_0), fluorescência máxima adaptada ao escuro (F_M), a eficiência quântica máxima do fotossistema II (PSII) (F_v/F_M), rendimento quântico efetivo do PSII ($\Phi\text{PSII} = \Delta F/F_M'$) medido de acordo com Genty, Briantais e Baker (1989), taxa de transporte de elétrons ($\text{ETR} = \Delta F/F_M' \times \text{DFFF} \times 0,5 \times 0,84$), dissipação fotoquímica [$\text{qP} = (F_M' - F_s)/(F_M' - F_0)$] e dissipação não-fotoquímica [$\text{NPQ} = (F_M - F_M')/F_M'$] (Maxwell e Johnson, 2000). Para a estimativa ETR, 0,5 foi usada como a fração de energia de excitação distribuída entre os fotossistemas e 0,84 como a fração de absorção de luz (Baker, 2008). A fração de luz para a dissipação de calor nas antenas [$D = 1 - (F_v'/F_M')$] e dissipação de calor nos centros de reação foram calculadas de acordo com Demmig-Adams e Adams (1996). As amostras das folhas foram aclimatadas no escuro durante 30 minutos. As análises foram feitas através da curva de indução, utilizando o método de aplicação da medida de F_0 , seguido pelo tempo de espera de 40 segundos e aplicação de luz actínica com PARamb de $1500 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

2.2.4. Metabolismo bioquímico

O material para estas análises foi composto por amostras destrutivas, coletadas entre 13 e 15h00 do último dia de do último evento de déficit hídrico.

A extração de enzimas ocorreu em março de 2019, realizada conforme metodologia proposta por Kar e Mishra (1976). Utilizou-se 0,200 g de amostras de folhas frescas congeladas a -20°C , as quais foram colocadas em almofariz e trituradas em nitrogênio líquido. Na

sequência, o material vegetal foi homogeneizado em 4 mL de tampão fosfato de potássio (0,1M, pH 6,8) gelado. A solução extraída foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O extrato obtido foi separado em microtubos e armazenado a -20°C para posterior determinação. Determinou-se a quantificação das proteínas solúveis no extrato de acordo com metodologia proposta por Bradford (1976). O sistema de reação foi composto por 100 µL de extrato enzimático e 5000 µL de reativo de Bradford. A reação foi conduzida à temperatura ambiente por 15 minutos e fez-se a leitura de absorbância em espectrofotômetro a 595 nm. A atividade da peroxidase (POD, EC 1.11.1.7) foi determinada de acordo com Teisseire e Guy (2000). O sistema de reação foi composto de 30 µL de extrato enzimático diluído (1:10 em tampão de extração); tampão fosfato de potássio 50 mmol L⁻¹ pH 6,5; pirogalol (1,2,3-benzenotriol) 20 mmol L⁻¹ e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 5 mmol L⁻¹; totalizando um volume de 1,0 mL. A reação foi conduzida à temperatura ambiente por 5 minutos. A formação de purpurogalina foi medida em espectrofotômetro UV-visível a 430 nm e seu coeficiente de extinção molar (2,5 mmol L⁻¹ cm⁻¹) foi usado para calcular a atividade específica da enzima, expressa em µmol de purpurogalina min⁻¹ mg⁻¹ de proteína. Quanto à superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), a determinação ocorreu pelo ensaio contendo 25 µL do extrato enzimático bruto diluído em 25 µL de tampão de extração e 2,95 mL de um meio de reação constituído de: tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, 13 mM de metionina, 75 µM de azul de p-nitro tetrazólio (NBT), 100 nM de EDTA e 2 µM de riboflavina. Após 5 minutos de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul produzida pela fotorredução do NBT foi medida a 560 nm (Giannopolitis e Ries, 1975). Uma unidade de SOD é definida como a quantidade da enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (U mg⁻¹ proteína).

A peroxidação de lipídios foi determinada pela técnica descrita por Heath e Packer (1968) citada por Rama Devi e Prasad (1998). Foram utilizadas 200 mg de amostra foliar as quais foram colocadas em almofariz e trituradas em nitrogênio líquido. Em seguida, homogeneizou-se o material vegetal em 5mL de solução contendo ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,25% e ácido tricloroacético (TCA) 10%. A solução extraída foi incubada em banho-maria a 90°C por 60 minutos. Após o resfriamento, a solução foi centrifugada a 10000 x g por 15 minutos, à temperatura ambiente (25°C). Em seguida, o sobrenadante coletado de cada amostra foi submetido à leitura de absorbância em espectrofotômetro a 560 e 600 nm. Para os cálculos, utilizou-se o coeficiente de extinção molar do malondialdeído (155 mmol L⁻¹ cm⁻¹).

Realizou-se a determinação do conteúdo de peróxido de hidrogênio, segundo método de Alexieva *et al.* (2001). Foram utilizadas 0,1 g de amostras maceradas e congeladas em

nitrogênio líquido, as quais foi adicionado 1 mL de TCA 0,1% e agitadas em vórtex, em seguida, foram centrifugadas a 12000 g por 15 minutos a 4°C. A reação iniciou-se com a adição de 0,5 mL de extrato, 0,5mL de tampão fosfato 0,1 M de pH 7,0 e 2,0 mL de iodeto de potássio a 1M. O conteúdo foi incubado no escuro por uma hora e realizou-se a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 390 nm. Calculou-se a concentração de peróxido de hidrogênio nas amostras através de curva do próprio peróxido de hidrogênio.

A quantificação de clorofilas (a e b) e carotenoides foi determinada segundo metodologia proposta por Sims e Gamon (2002). Para isso, foi utilizado 0,1 g de folhas congeladas, após serem trituradas em nitrogênio líquido. Esse material foi homogeneizado em 3 mL de solução de acetona/tampão Tris-HCl (80:20, v/v, pH 7,8, 0,2M). A suspensão resultante foi transferida para tubos Falcon e mantida em freezer a -20°C por 1 hora. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10000 x g durante 5 minutos a 4°C. Para as leituras de absorbância no espectrofotômetro, foi utilizado o sobrenadante, utilizando-se os comprimentos de onda de 663, 647, 537 e 470 nm. A concentração de clorofilas a e b e carotenoides foi calculada segundo as equações abaixo e expressos em µg de pigmento por g de matéria fresca: clorofila a = 0,01373.(A663) – 0,000897.(A537) – 0,003046.(A647); clorofila b = 0,02405.(A647) – 0,004305.(A537) – 0,005507.(A663); antocianina = 0,08173.(A537) – 0,00697.(A647) – 0,002228.(A663); carotenoides = (A470 – (17,7.(Cla – Clb) – 9,479 x (antocianina))/119,26.

A metodologia descrita por Yemm & Willis (1954) foi utilizada para determinar o teor de açúcares solúveis totais. Utilizaram-se alíquotas de 0,02mL de extrato, aos quais foram adicionados 0,98mL de água destilada e 2mL do reagente antrona (20mg de antrona, 0,5mL de água destilada e 10mL de ácido sulfúrico concentrado). Após agitação, os tubos foram aquecidos a 100°C, por 5 minutos. As amostras foram submetidas à análise em espectrofotômetro a 620nm e a quantificação dos açúcares baseou-se na curva padrão de glicose. Para quantificação do amido, também se utilizou a metodologia descrita por pelos mesmos autores. A quantificação de sacarose foi determinada pela reação com antrona fria, após adição de KOH (Passos, 1996).

2.2.5. Análise molecular

Os genes homólogos das proteínas PsbS e PsbR foram identificados em sorgo através da plataforma *Phytozome*. Para o desenho dos *primers*, foi utilizado o software *on-line Primer3* de acordo com os parâmetros: temperatura de dissociação (TM) entre 58 e 62°C, tamanho do

primer entre 18 e 22 pb, e tamanho de amplicon entre 100 e 200 pb e a seleção dos candidatos foi feita após análise pelo *software NetPrimer*, capaz de calcular possibilidades de formação de pareamento indesejável como alças (*hairpins*), dímeros etc. Para se garantir a especificidade, foram desenhados com o intuito de abrangerem as regiões 5'-UTR de cada transcrito. Para as análises de eficiência de cada par de primers dos genes alvos, foi realizada uma reação de qPCR utilizando-se um pool de cDNA das amostras de uma réplica biológica de cada tratamento em uma diluição seriada.

Codificante	Nome	Sequência (5'-3')
PsbR	Sobic.002G032700	TGCTGCTTGCTACCTCTAACC (F) TCGGATTCTTCCTTTTGCTG (R)
PsbS	Sobic.003G370000	TTCCTATCTTTCTCTGTGTTTCGC (F) GACTTGGAGTGCCTGTAGCC (R)

Tabela 1: Tabela de primers contendo o codificante dos genes selecionados, a identificação e as sequências dos pares de primer nos sentidos direto (F) e reverso (R).

Para as análises de expressão gênica, amostras foliares foram coletadas e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e estocadas em *ultrafreezer* a -80°C , para posterior extração de RNA total. Para este fim, a metodologia foi baseada de acordo com as recomendações e especificações dos fornecedores do TRIzol™ (Invitrogen), utilizado para isolamento de RNA. Alíquotas de 100 mg de material vegetal foram maceradas em nitrogênio líquido, em seguida adicionou-se 1 ml TRIzol™ e homogeneizadas em vórtex por 15 segundos. Após, permaneceram em temperatura ambiente por 5 minutos e, posteriormente, adicionou-se 200 μl de clorofórmio seguido de homogeneização. Após 3 minutos, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12000xg em centrífuga refrigerada. A fase aquosa de cada amostra foi transferida para um novo tubo Eppendorf, acrescidas de 500 μl de isopropanol refrigerado e homogeneizadas por inversão. Após 10 minutos, foram novamente centrifugadas por 10 minutos a 12000xg. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 1 ml de etanol 75% e posterior homogeneização em vórtex por 15 segundos. Depois, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 7500xg e o sobrenadante descartado. O pellet foi incubado até sua secagem e ressuscitado em 50 μl de H₂O RNase-free. As alíquotas foram devidamente purificadas, quantificadas e tratadas com DNase. A concentração do RNA foi determinada através do espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). A análise de integridade foi realizada por eletroforese capilar das amostras, através do sistema Agilent 2100 Bioanalyzer, (Agilent Technologies®, protocolo padrão para RNA e a

qualidade verificada pelo RNA Integrity Number - RIN. Na sequência, o DNA genômico co-precipitado foi removido utilizando a DNase I (Promega, Fitchburg, WI, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Para a síntese de cDNA das amostras de sorgo, foi utilizado High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), conforme recomendações do fabricante.

Após esses procedimentos, foi utilizada a técnica de reação quantitativa da amplificação em cadeia de transcritos reversos de RNA (RT-qPCR) para análise de expressão gênica dos alvos selecionados, aplicada para as amostras de cDNA, com três repetições de cada. Esta técnica detecta e transmite dados em tempo real, através da captação da fluorescência emitida pelos produtos amplificados. Para quantificação, utilizou-se o método de expressão gênica relativa, através do qual são comparadas as taxas de expressão do gene alvo com genes de referência. Estes, portanto, para sustentarem tal função, não devem apresentar variação de expressão nos diferentes tecidos, células e sob alterações ambientais. Para o cálculo da expressão relativa de acordo com Pfaffl, Horgan e Dempfle (2002), a razão de expressão relativa dos genes alvo é calculada baseada na sua eficiência e na diferença de Ct (ΔCt - threshold cycle) entre tratamento e controle. O nível de expressão representa a média de três replicatas biológicas e três réplicas técnicas do experimento.

A condução desta etapa do experimento foi delineada conforme recomendações de (Bustin *et al.*, 2009) de modo a garantir sua relevância, precisão, interpretação correta e repetibilidade. Os dois genes de referência foram escolhidos baseados no trabalho de Sudhakar *et al.* (2016), através do qual identificaram que os candidatos PP2A e EIF4 α apresentaram melhor estabilidade.

2.3. Análises estatísticas

Através do *software* estatístico *RStudio*, os dados ecofisiológicos foram submetidos a teste de normalidade Shapiro-Wilken e de homogeneidade Batlett/Laverne e posterior análise de variância e de resíduos. Quando detectada diferença significativa ($p \leq 0,05$), as médias das repetições foram comparadas entre os tratamentos (C, DHU e DHR) utilizando o teste de Tukey a 5% de probabilidade. Quanto às análises e expressão gênica relativa, foi utilizado o Relative Expression Software Tool (REST 2009 – Qiagen), baseado no modelo estatístico Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test com 2000 interações (Pfaffl, Horgan e Dempfle, 2002) a qual é indicada para análises estatísticas de dados provenientes de qPCR.

3. RESULTADOS

3.1. Relações hídricas

Os sintomas de desidratação em déficit hídrico único eram visíveis, sendo possível observar mais folhas enroladas, amareladas e secas (Figura 2B), enquanto que o grupo de déficit recorrente não apresentava tais características (Figura 2A).

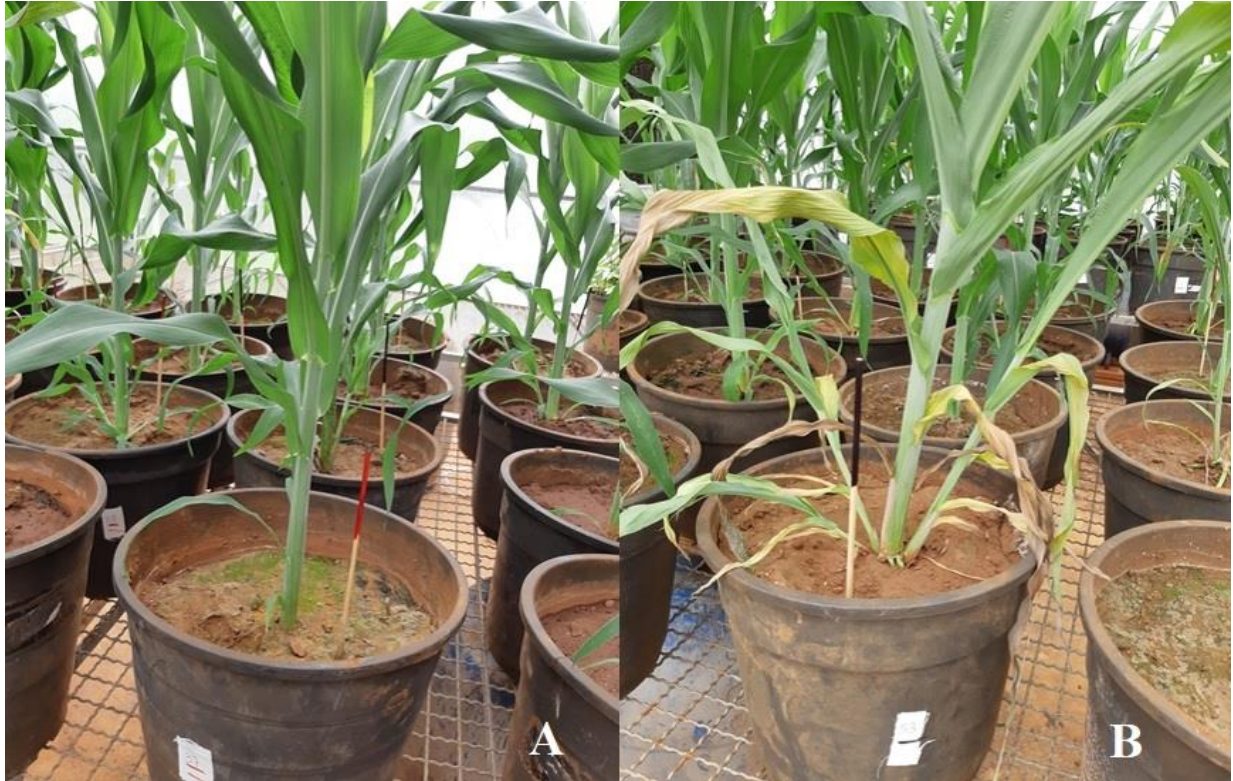


Figura 2: Diferença visual entre os tratamentos de déficit hídrico recorrente (A) e único (B); Botucatu, outubro/2019.

Para o grupo de indivíduos submetidos a apenas um evento de déficit hídrico, a interrupção da irrigação acarretou em acentuada redução do conteúdo relativo de água, tanto em *predawn* (aproximadamente 50%) quanto em *midday* (abaixo de 50%), (Figura 3A e B). Em contrapartida, os valores dos grupos irrigado e de déficit hídrico recorrente mantiveram-se mais elevados e estatisticamente iguais, ambos acima de 80%, sendo este último indicando um pequeno decréscimo de CRA no período de *midday* (Figura 3B). Também em *predawn*, as plantas de déficit hídrico recorrente apresentaram valores de potencial hídrico (Ψ_{H_2O}) estatisticamente equivalentes ao do grupo irrigado (Figura 3C), porém em *midday*, os valores observados foram intermediários entre controle e plantas de estresse único (Figura 3D).

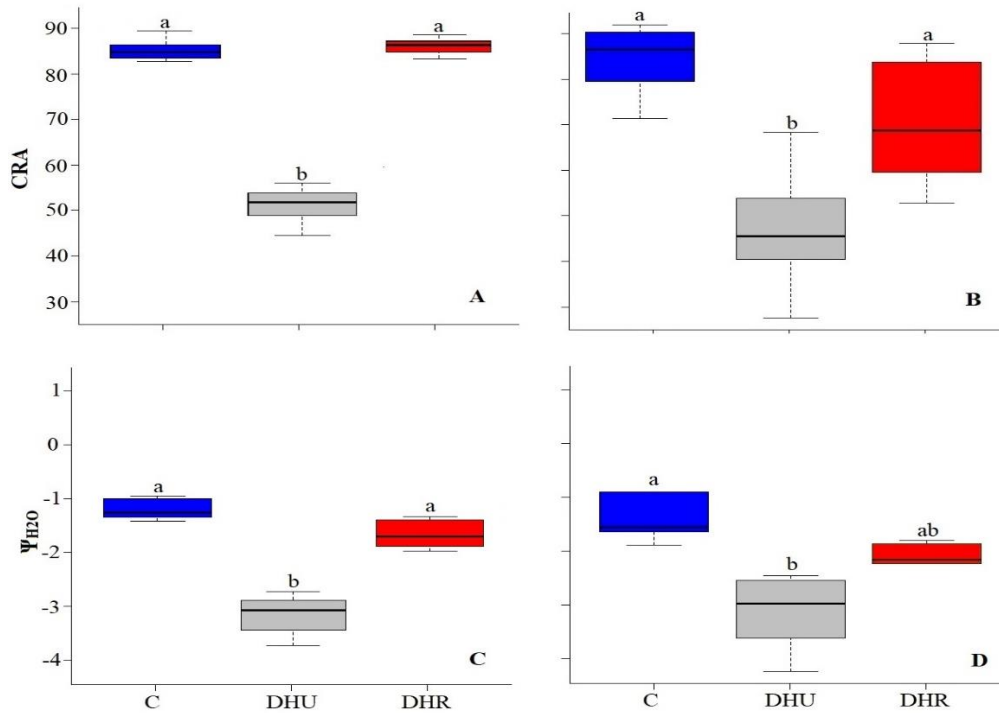


Figura 3: Conteúdo relativo de água (CRA; %) em *predawn* (A) e *midday* (B); potencial hídrico (Ψ_{H_2O} ; MPa) em *predawn* (C) e *midday* (D) de *Sorghum bicolor*: com disponibilidade hídrica (C); durante primeiro evento de déficit hídrico (DHU); e durante segundo evento de déficit hídrico (DHR). Valores são médias \pm erro-padrão de seis repetições. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os regimes hídricos ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

3.2. Fluorescência da clorofila *a*

A fluorescência inicial (F_0) apresentou-se mais elevada no o grupo de déficit hídrico único e entre os demais tratamentos não houve diferença estatística (Figura 4E). Ainda para este grupo, os valores de fluorescência máxima não adaptada ao escuro (F_m'), rendimento quântico efetivo do PSII (ϕ_{II}), taxa de transporte de elétrons (ETR), dissipação não-fotoquímica NPQ e eficiência quântica máxima (F_v/F_m) decresceram em relação aos outros tratamentos, sendo estes estatisticamente iguais (Figura 4A, C, D, F e G). Entretanto, as respostas das dissipações fotoquímica (qP) e de calor pelas antenas (D) elevaram-se significativamente em plantas sob déficit único, comparadas com as outras condições, as quais não variaram entre si (Figura 4B e H).

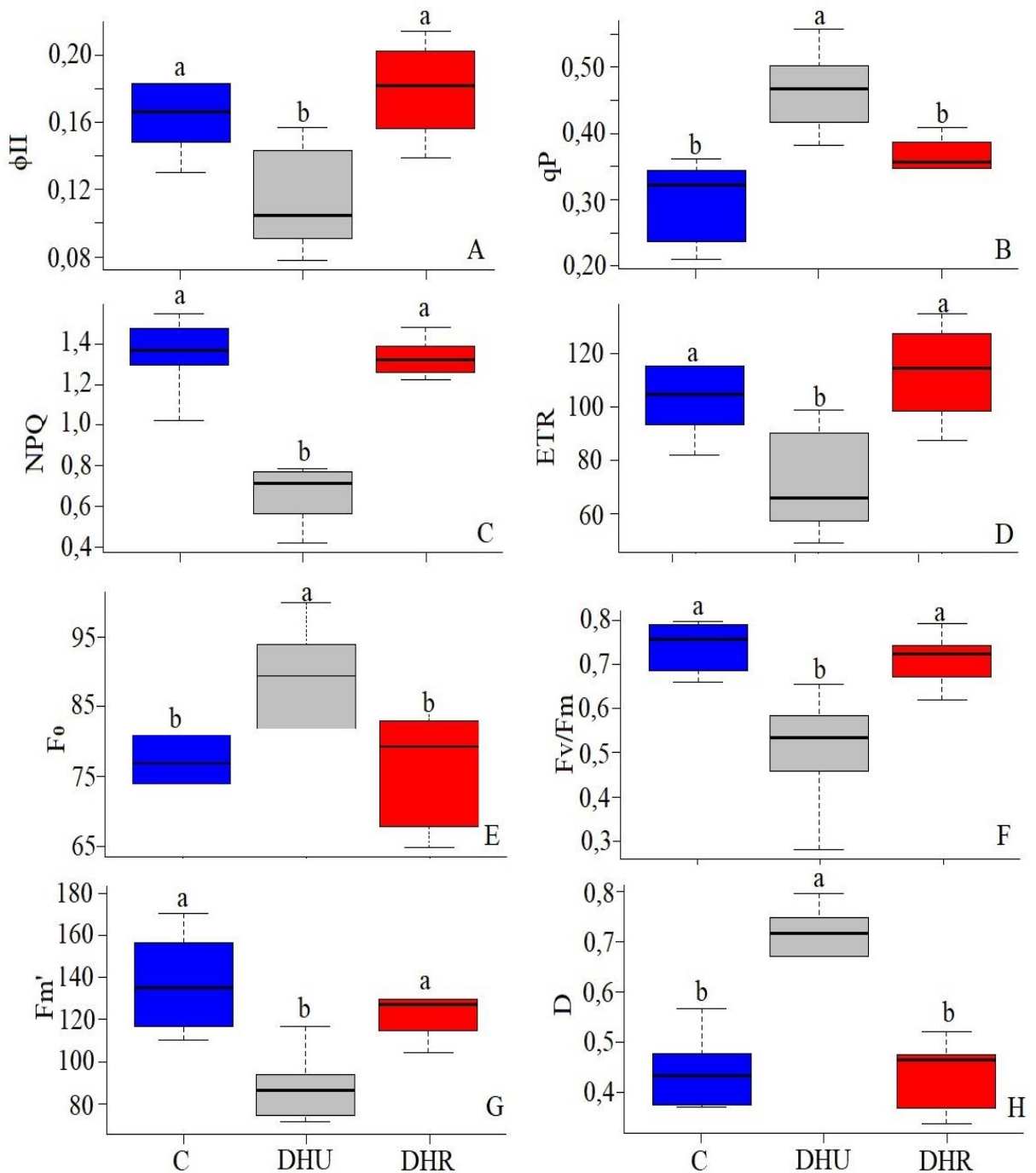


Figura 4: Rendimento quântico efetivo do PSII (ϕ_{II} ; A); dissipação fotoquímica (qP; B); dissipação não-fotoquímica (NPQ; C); taxa de transporte de elétrons (ETR; $\mu\text{mol.elétrons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$; D); fluorescência inicial (F_0 ; E); rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m ; F); fluorescência máxima não adaptada ao escuro (F_m' ; G); dissipação de calor pelas antenas (D; H) em *Sorghum bicolor*: com disponibilidade hídrica (C); durante primeiro evento de déficit hídrica (DHU); e durante segundo evento de déficit hídrica (DHR). Valores são médias \pm erro-padrão de seis repetições. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os regimes hídricos ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

3.3. Trocas gasosas

Como mencionado anteriormente, a definição da coleta fez-se à partir da detecção de g_s com valores médios abaixo de $50 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, sendo, então, os seguintes obtidos: grupo DHU com $12,60 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$; DHR com $49,02$; e constantemente irrigadas (C) com $142,04 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. A taxa de transpiração (E) dos dois grupos de plantas sob déficit hídrico foram menores que as irrigadas, quase atingindo valor nulo (Figura 5A). Quanto à estimativa de carbono interno (C_i), verificou-se maior valor em plantas sob déficit hídrico único (aproximadamente $250 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$), decréscimo nas que sofreram dois eventos de déficit hídrico ($\sim 150 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e concentrações ainda menores nas que permaneceram irrigadas ($\sim 50 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A assimilação de carbono (A) para o grupo sob um evento de déficit atingiu valores próximos de zero, enquanto que o grupo com disponibilidade hídrica superou os de déficit hídrico recorrente (Figura 5B).

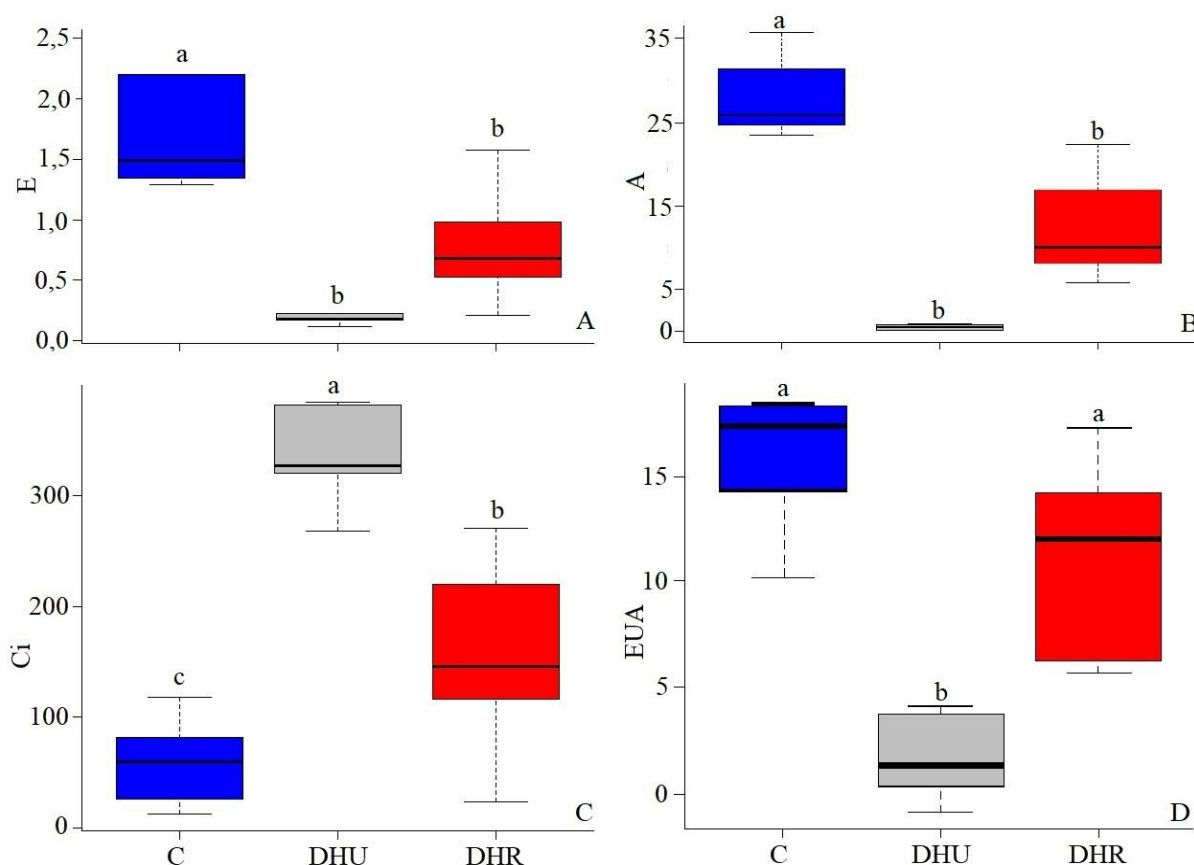


Figura 5: Taxa transpiratória (E ; $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$; A); taxa de assimilação líquida de carbono (A ; $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; B); concentração interna de CO_2 (C_i ; $\mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$; C); uso eficiente da água (EUA ; $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{H}_2\text{O}$; D) em *S. bicolor*: com disponibilidade hídrica (C); durante primeiro evento de déficit hídrico (DHU); e durante segundo evento de déficit hídrico (DHR). Valores são médias \pm erro-padrão de seis repetições. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os regimes hídricos ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

3.4. Metabolismo bioquímico

3.4.1. Açúcares

As plantas em DHU apresentaram quantificação de açúcares solúveis totais (AST) equivalente ao grupo irrigado, ao passo que os indivíduos que sofreram dois ciclos de déficit hídrico apresentaram valores expressivamente maiores (Figura 6A). Observou-se aumento nos níveis de amido e sacarose no grupo de DHU, enquanto que os outros tratamentos permaneceram equivalentes. Não foi detectada presença de açúcares redutores nas amostras de folha desta pesquisa.

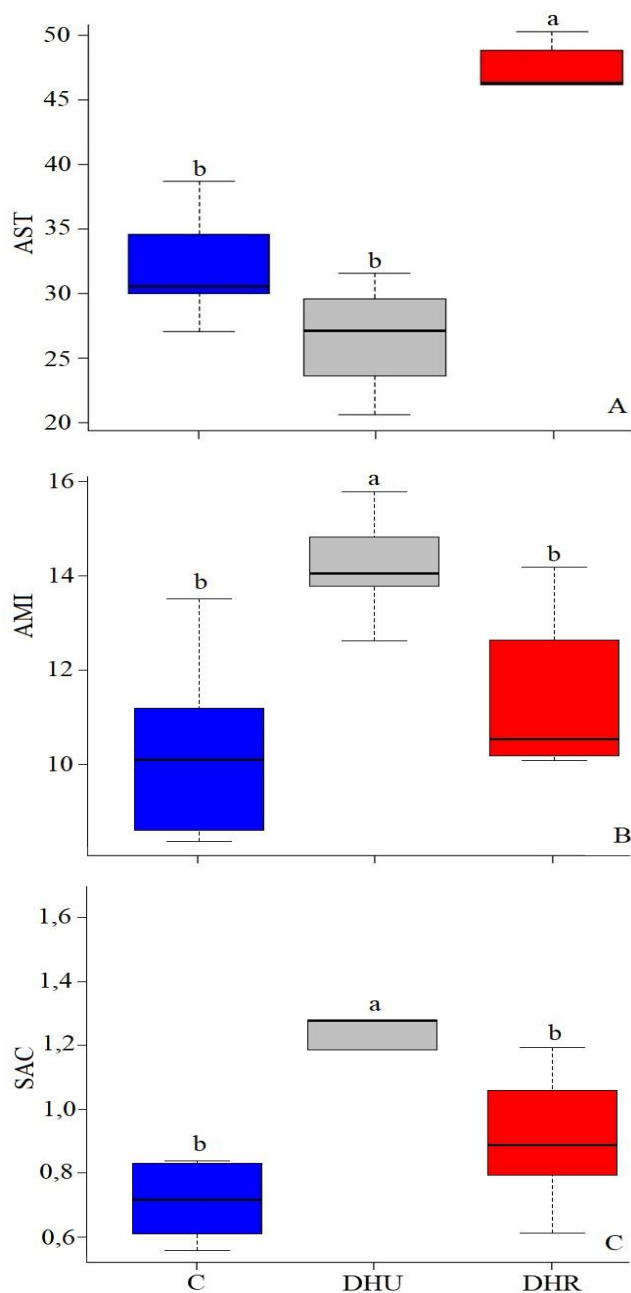


Figura 6: Concentrações foliares de açúcares solúveis totais (AST; A); amido (AMI; B); sacarose (SAC; C) em mg de açúcares solúveis totais/g de massa foliar de *Sorghum bicolor*: com disponibilidade hídrica (C); durante primeiro evento de déficit hídrico (DHU); e durante segundo evento de déficit hídrico (DHR). Valores são médias \pm erro-padrão de seis repetições. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os regimes hídricos ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

3.4.2. Pigmentos

Dos pigmentos avaliados, comparada com as plantas irrigadas, a quantificação de clorofila *a* foi menor para o grupo de DHU única e maior para o recorrente. Os níveis de clorofila *b* e carotenoides apresentaram-se estatisticamente semelhantes entre os grupos irrigado e de DHU, em contrapartida o recorrente exibiu valores mais elevados (Figura 7A, B e D). Já as antocianinas foram mais expressivas nas plantas sob um evento de DHU e em menor quantidade nas irrigadas (Figura 7C).

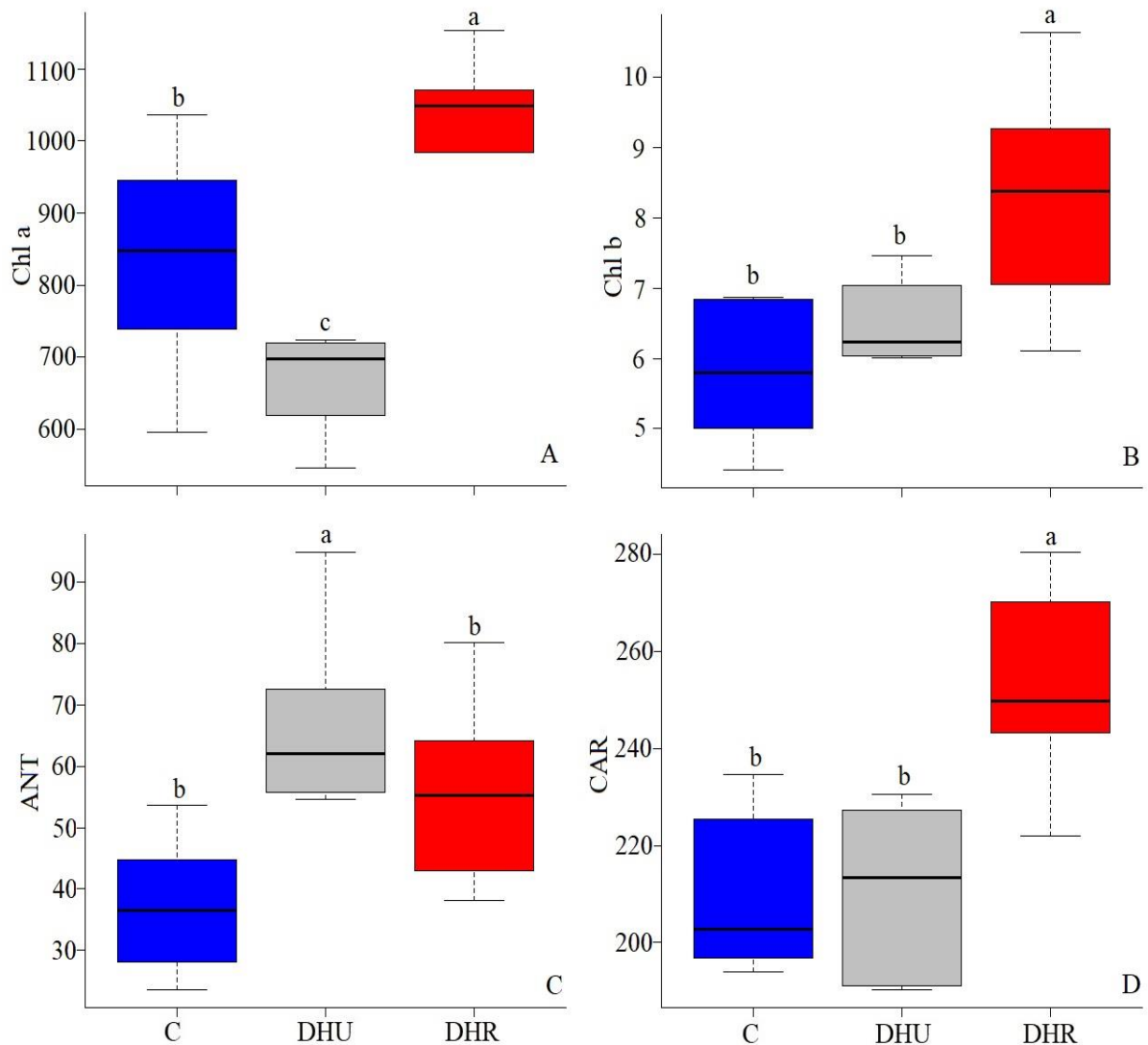


Figura 7: Concentrações foliares de clorofila *a* (Chl *a*; A), clorofila *b* (Chl *b*; B), antocianina (ANT; C) e carotenoides (CAR; D) em $\mu\text{g/g}$ de massa foliar de *Sorghum bicolor*: com disponibilidade hídrica (C); durante primeiro evento de déficit hídrico (DHU); e durante segundo evento de déficit hídrico (DHR). Valores são médias \pm erro-padrão de seis repetições. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os regimes hídricos ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

3.4.3. Metabolismo oxidativo

Um único ciclo de déficit hídrico acarretou num aumento significativo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxidação lipídica. Estas mesmas variáveis não diferiram entre si nas outras duas condições (Figura 8 A e B). A maior atividade da enzima peroxidase (POD) foi encontrada nas folhas dos indivíduos sob um evento de déficit hídrico. O grupo irrigado apresentou mais elevada concentração de superóxido dismutase (SOD), enquanto que DHR apresentou atividade bastante reduzida comparada aos demais grupos (Figura 8D).

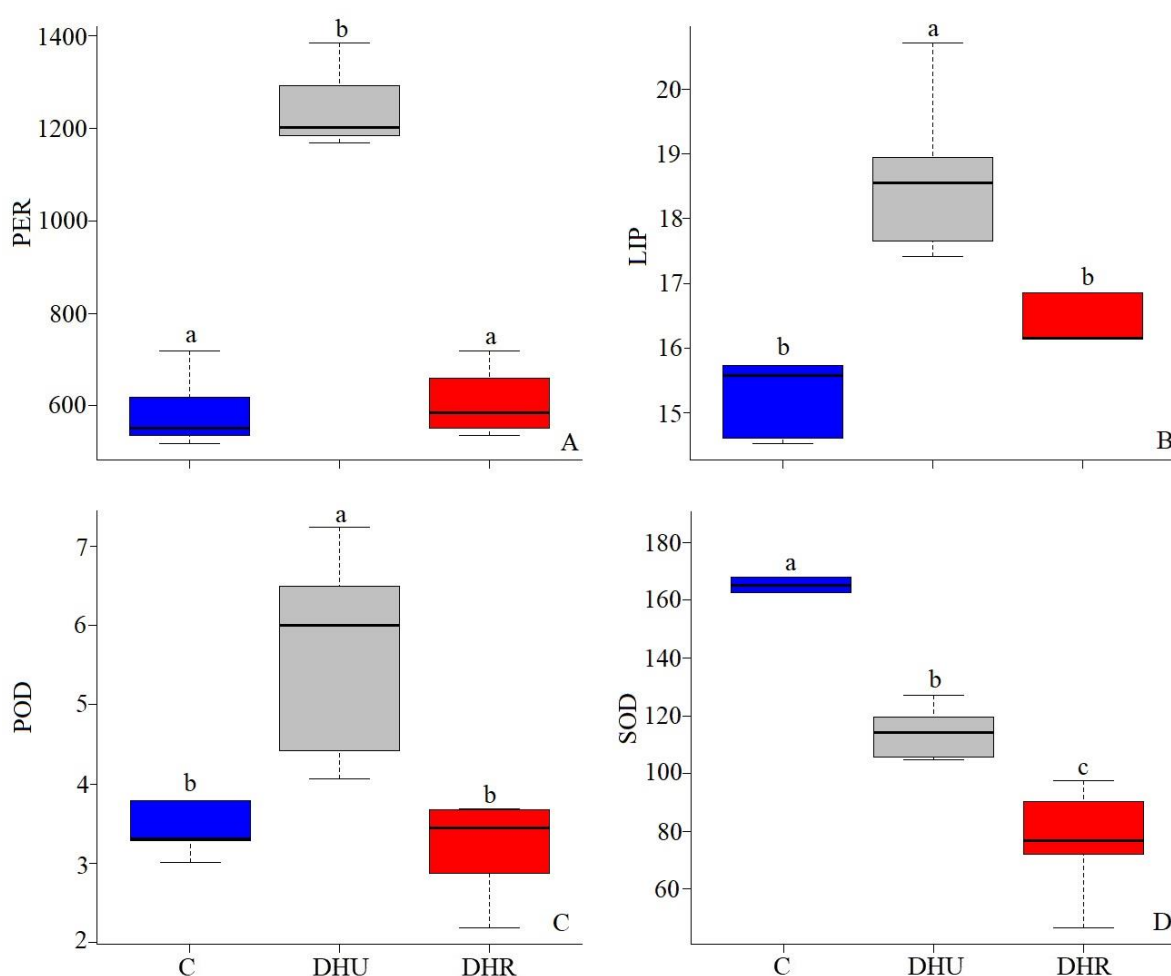


Figura 8: Concentrações foliares de peróxido de hidrogênio (PER; $\mu\text{M}/\text{massa foliar}$; A); peroxidação lipídica (LIP; nmol/g de massa foliar; B); atividade das enzimas peroxidase (POD; $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína; C) e superóxido dismutase (SOD; U/mg de proteína; D) em indivíduos de *Sorghum bicolor*: com disponibilidade hídrica (C); durante primeiro evento de déficit hídrico (DHU); e durante segundo evento de déficit hídrico (DHR). Valores são médias \pm erro-padrão de seis repetições. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os regimes hídricos ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

3.5. Expressão gênica

Ambos genes avaliados apresentaram maior expressão relativa em condições de DHU. Para o alvo codificante da proteína PsbR, nos tratamentos de DHR e controle (C), não houve diferença estatisticamente significativa. Já para o precursor da proteína PsbS, os níveis de expressão sob irrigação equipararam-se aos valores demais tratamentos

Alvos	Tratamentos		
	DHU	DHR	C
PsbR	0,34 a \pm 0,134	0,05 b \pm 0,254	0,05 b \pm 1,719
PsbS	2,34 a \pm 0,011	1,29 b \pm 0,254	1,79 ab \pm 1,319

Tabela 2: Expressão relativa dos genes codificantes das proteínas PsbR e PsbS em indivíduos de *Sorghum bicolor*: com disponibilidade hídrica (C); durante primeiro evento de déficit hídrico (DHU); e durante segundo evento de déficit hídrico (DHR). Valores são médias \pm erro-padrão de três repetições em triplicata. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os regimes hídricos ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

4. DISCUSSÃO

Diversas metodologias são atualmente utilizadas a fim de analisar variáveis responsivas a essa condição, possibilitando elucidar os possíveis caminhos que direcionam a uma bem-sucedida estratégia de sobrevivência. O conteúdo relativo de água (CRA) em folhas de plantas é um importante indicativo para mensurar o status hídrico da planta, pois expressa a turgescência dos vegetais, determinante para a realização das atividades metabólicas nos tecidos vegetais (Barnawal, Singh e Singh, 2019). A avaliação das trocas gasosas conjuntamente com a da fluorescência da clorofila a possibilitam investigar efeitos não estomáticos da fotossíntese, uma vez que alterações na dissipação de energia luminosa no aparato fotossintético interferem a atividade da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCo) na bainha do feixe vascular, e da fosfoenol-piruvato carboxilase (PEP – carboxilase) no mesófilo de plantas C4, repercutindo no rendimento quântico do fotossistema II, na inativação de enzimas do ciclo de Calvin e na redução da síntese de ATP e Ribulose 1,5- bifosfato (RuBP), comprometendo a eficiência fotossintética (Vaz *et al.*, 2010).

Ψ_{H_2O} e CRA foliares são as primeiras variáveis a sofrer alterações mediante condição de déficit hídrico (Kudoyarova, Kholodova e Veselov, 2013). Mesmo apresentando valores reduzidos de fotossíntese líquida (A) e maior concentração de carbono interno (C_i) (Figura 5B e C) em relação ao grupo controle, as plantas sob DHR apresentaram ajustes na retenção de

água, sendo um destes recursos o aumento de açúcares solúveis totais no interior das células, possibilitando a manutenção do potencial osmótico (Figura 6A). Esta resposta quanto ao controle do balanço hídrico favorece a aclimação a partir de eventos sucessivos de seca, como observado nestes resultados. A manutenção hídrica exibida pelo grupo de DHR pode ser corroborada pelas altas concentrações de açúcares solúveis (Figura 6A), os quais mantêm a turgescência das folhas e o equilíbrio do potencial osmótico durante condições de seca (Xu *et al.*, 2007; Gangola e Ramadoss, 2018).

A condição de elevada F_0 observada no grupo de DHU pode sugerir que seu aparato fotossintético provavelmente estava fotoinibido. O aumento de F_0 é indicativo da degradação do centro de reação do PSII ou da diminuição na capacidade de transferência da energia de excitação do complexo antena para o centro (Baker e Rosenqvist, 2004). Estudos em plantas C4 e C3 sugerem que a capacidade de transporte de elétrons pode ser superior à exigência de assimilação de CO_2 sob condições de déficit hídrico, o que demanda ação de dissipadores de elétrons alternativos (Tezara *et al.*, 1999). Quando os centros de reação estão fechados (QA reduzida), 95 a 97% da energia absorvida pode ser dissipada na forma de calor e 2,5 a 5,0% na forma de fluorescência (Bolh ar-Nordenkampf e  quist, 1993). Arous *et al.* (1998) sugerem que uma correla o de F_v/F_m reduzido com um aumento de F_0 , ambos observados em plantas sob DHU, pode ser interpretada como dano fotoinibitório cr nico devido   degrada o da proteína D1 nos centros de rea o.

Apesar de rendimento quântico efetivo (ϕ_{II}) depender da dissipaa o fotoquímica (q_P) (Genty, Briantais e Baker, 1989), o elevado  ndice da dissipaa o fotoquímica detectada em plantas sob DHU não garantiu o aproveitamento da energia (Figuras 4A e 5B). Plantas submetidas a déficit hídrico a ponto de apresentarem estômatos fechados, podem apresentar valores significativos de q_P devido   reciclagem interna de CO_2 . Pode-se observar menor libera o do excesso de energia luminosa através de NPQ no grupo de estresse único, o que provavelmente agravou os danos ocorridos no aparelho fotossintético, visto que esse desvio de energia   uma das principais respostas fotoquímicas ao estresse (Roh cek, 2002). Neste experimento, os níveis de carotenoides em plantas submetidas   DHU e irrigadas encontram-se equivalentes, porém significativamente inferiores ao do grupo de déficit recorrente (Figura 7D), sugerindo o investimento nesta via, possivelmente influenciado por resquícios da anterior experiência de seca. Já a ausência deste investimento em plantas sob DHU pode ter comprometido a fotoprote o necessária para condi o as quais estavam submetidas.

A mesma provável estratégia pode ser sustentada pela paridade de NPQ entre estresse recorrente e irrigadas (Figura 4C), propondo a preservação e desenvolvimento deste mecanismo de defesa. Neste estudo, a atuação do maquinário proteico relacionado a este alvo foi majoritariamente investigada em diferentes condições de luminosidade e, neste exposto, demonstramos que pode haver similaridade de padrão-resposta quando em condições de déficit hídrico. Portanto, se NPQ é capaz de regular a fotossíntese através do viés de proteção, houve desequilíbrio na captação de energia luminosa, absorvendo excesso de energia de excitação, evidenciado pelo aumento de qP (Figura 4B), devido ao comprometimento do mecanismo fotoprotetor, supersaturando a cadeia transportadora de elétrons sem a desejada condução fotoquímica (Giovagnetti e Ruban, 2018), o que ocorreu com déficit único (Figura 4A e D). Outra consideração é que, apesar das vantagens que a fisiologia C4 apresenta, apenas plantas C3 conseguem drenar a energia fotossintética através do fenômeno da fotorrespiração (Krause e Weis, 1991), a qual atua como um dissipador de elétrons alternativo quando expostas ao estresse hídrico (Ghannoum, 2008), diminuindo, assim, a fotoinibição. Desta forma, apesar da menor atividade fotossintética do grupo de DHR, comparada com a condição irrigada, visto que qP de ambos tratamentos se apresentaram equivalentes, o papel dos mecanismos alternativos de dissipação de energia potencializou a preservação das estruturas celulares, corroborados pela baixa incidência de lipoperoxidação (Figuras 4B e C; 5A; 7D; 8B).

Apesar dos visíveis prejuízos que este aparato sofreu durante primeira suspensão hídrica, todas as funções fotossintéticas foram totalmente recuperadas durante período de reidratação (Ghannoum, 2008; Zegada-Lizarazu e Monti, 2013) e também, durante segunda suspensão hídrica, otimizou-se propriedades que possibilitaram respostas aprimoradas, equivalentes aos valores das irrigadas, como a redução da perda de água para o meio ambiente, proporcionada pela atuação de osmólitos, apesar da tensão abiótica aplicada. A baixa condutância estomática, apesar de limitar a difusão dos gases, pôde contribuir para melhor eficiência do uso da água no grupo de déficit hídrico recorrente (Figura 5D), diferentemente do estresse único, devido à baixíssima assimilação de CO₂ encontrada (Figura 5B). Este fator também promove o declínio do potencial hídrico foliar (Figura 3C e D), das taxas fotossintéticas (Maroco, Pereira e Manuela Chaves, 2000) e da *EUA* (Farooq *et al.*, 2009), ocorrência observada apenas no grupo de DHU (Figura 5B e D).

Sob estresse hídrico, se o CRA foliar apresentar níveis abaixo de 70%, a atividade fotossintética se torna cada vez menos responsiva, mesmo perante altas concentrações de CO₂ (Ghannoum, 2008), o que ocorreu nos indivíduos sob DHU (3 A e B). Tezara *et al.*, (1999)

constatarem em experimento com *Helianthus annuus* L., cultivar Avanti, que C_i diminuiu à medida que ocorreu o decréscimo do Ψ_{H_2O} para cerca de -1,5 MPa, mas aumentou com o agravamento do estresse, o que condiz com resultados obtidos do grupo de estresse único (Figuras 3C e D; 5C). Apesar do ônus relacionado ao armazenamento de fotossintatos se comparado com o tratamento irrigado, o grupo de déficit recorrente ainda manteve taxas razoáveis de carboxilação, apesar de sua baixa eficiência (Figura 5B). Constatou-se que o C_i diminuiu apenas durante as fases iniciais do estresse hídrico, como relatado em milho (Becker e Fock, 1986), sorgo (Williams *et al.*, 2001) e cana-de-açúcar (Du *et al.*, 1996), porém com o agravamento da seca, frequentemente observou-se que C_i aumenta enquanto a taxa fotossintética líquida (A) continua em declínio, o que ocorreu também neste ensaio para o grupo de déficit hídrico único (Figura 5B e C). A diminuição de A é comumente uma consequência precoce da diminuição da disponibilidade de água (Carmo-Silva *et al.*, 2007) e da eficiência fotoquímica (Walter *et al.*, 2011), ambas condições verificadas no grupo de DHU (Figuras 3A, B, C e D; 4A), sendo a energia da luz incidente não utilizada para fixação de CO_2 em ambas situações de déficit hídrico (Zegada-Lizarazu e Monti, 2013), promovendo acúmulo de CO_2 . A sobrevivência e aprimoramento das estratégias fotoprotetoras, ainda que sob custo, é primordial para o bom desenvolvimento, aclimação e adaptação de um vegetal. A vulnerabilidade de uma espécie às possíveis mudanças ambientais, expressada aqui pela ausência de condição estressante anterior, pode comprometer a competitividade deste indivíduo ou comunidade ao meio em que se está inserido.

A reduzida atividade fotossintética constatada no grupo de déficit hídrico único pode ser elucidada por vários mecanismos ocorrentes neste experimento a partir dos resultados observados. Sob condições ambientais adversas, sendo neste contexto a redução da disponibilidade hídrica no solo, o excesso de energia acarreta na formação exacerbada de compostos altamente reativos derivados do O_2 (Palatnik, Carrillo e Valle, 1999), um mecanismo dissipador alternativo de elétrons que ocorre no PSI conhecido como reação de Mehler (Ghannoum, 2008). Após sucessivas reações químicas, seus produtos, espécies reativas de oxigênio, promovem diversos danos ao metabolismo, como a degradação de pigmentos fotossintéticos, observado adiante neste mesmo grupo de plantas (Figura 7A) e a inativação reversível de enzimas do ciclo de Calvin pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Dietz, 2003), o qual apresentou elevada quantificação nestes indivíduos (Figura 8A), comprometendo, assim a assimilação do carbono interno.

Visto que a qP do grupo que sofreu apenas um evento de déficit hídrico manteve-se elevado (Figura 4B), entende-se que a formação de ATP e NADPH não foi interrompida, especialmente de ATP, a qual ocorre independentemente do PSII (Ishikawa *et al.*, 2016). Contudo, de acordo com elevado C_i encontrado no mesmo grupo, a continuidade das reações bioquímicas para sua fixação e conclusão da fotossíntese foi drasticamente dificultada (Figura 5B e C). O baixo consumo destas moléculas transportadoras de elétrons aumenta suas concentrações celulares, como também não são permeáveis pela membrana do cloroplasto, o que impede sua utilização pela respiração. Visto que as plantas C4 apresentam baixas taxas de fotorrespiração, houve menor dissipação de NADPH e ATP, permanecendo desprotegidas da fotoinibição (Wu, Neimanis e Heber, 1991). Dado o papel central que o ATP desempenha em uma célula, altos níveis podem ser prejudiciais (Pontes, Sevostyanova e Groisman, 2015), intensificando a geração ERO.

O grupo de déficit hídrico recorrente apresentou teores de peroxidação lipídica equivalentes aos das irrigadas (Figura 8B), através da provável atuação dos açúcares solúveis totais (AST), quantificados em maior abundância neste mesmo tratamento (Figura 6A). É possível que a elevada síntese de sacarose nos vegetais em DHU (Figura 6C) pode ter sido estimulada no início da percepção da condição de déficit, investimento observado em diversas espécies como possível mecanismo de defesa e sobrevivência, visto que os vegetais do grupo irrigado exibiram menores valores de teor de sacarose além do tardio direcionamento da degradação do açúcar para compor o cenário de proteção. A redução nos níveis de amido e sacarose (Figura 6B e C) e aumento nas concentrações de açúcares solúveis totais (Figura 6A) no grupo de DHR, o que sugere a degradação e redirecionamento de carboidratos armazenados como relevante estratégia de respostas à seca, o que provavelmente contribuiu para prevenir a destruição foto-oxidativa permanente dos PSII (Zegada-Lizarazu e Monti, 2013). Li, Mehta e Messing (2018) detectaram em seu trabalho presença de polióis e fosfato de açúcares em amostra de colmo de *S. bicolor*. Llanes *et al.*, (2013) e Barnawal, Singh e Singh (2019) afirmam que o acúmulo de polióis em células facilita o ajuste osmótico, com possível papel na estabilização de estruturas moleculares e em sistemas de eliminação de ERO, o que corrobora com os dados de Ψ_{H_2O} , H_2O_2 e lipoperoxidação em estresse recorrente (Figuras 3; 6A; 8A e B).

A redução de clorofila *a* detectada nos indivíduos sob DHU possivelmente influenciou o decréscimo dos valores de F_v/F_m e F_m' deste mesmo grupo (Walter *et al.*, 2011). É possível observar a fundamental importância dos pigmentos avaliados na performance fotossintética e protetora que exerceram. Apesar do maior teor de antocianinas constatado nos indivíduos sob

DHU, comparado com os demais tratamentos, houve limitação de seu mecanismo de defesa provavelmente pela necessidade de outros dispositivos responsivos atuarem de forma mais integrada (Figura 7C). Porém, a prévia experiência à seca, possivelmente desencadeou o investimento de síntese destes pigmentos, especialmente das clorofilas e carotenoides, o que contribuiu para melhor desempenho fisiológico do grupo de DHR (Figura 7A, B e D).

Pelo fato de a fotossíntese ser um dos principais drenos de elétrons nos cloroplastos, as grandes reduções desse processo em condições de déficit hídrico único possivelmente acarretou em um quadro potencialmente danoso ao metabolismo celular (Asada, 2006). Deste modo, uma quantidade excessiva de energia foi absorvida pelas plantas de déficit hídrico único, gerando um desbalanço energético, ocasionando um aumento na produção de ERO (Noctor, Mhamdi e Foyer, 2014; Huang *et al.*, 2019), pois o oxigênio torna-se o principal acceptor dos elétrons.

Considerando que no primeiro evento de déficit hídrico do grupo de estresse recorrente tenha ocorrido respostas semelhantes às das plantas de estresse único, assim como constatado no trabalho de Mantoan (2019), presume-se que a incidência anterior destes também mensageiros moleculares possam ter colaborado para sua performance fisiológica sob segunda condição de déficit hídrico. Foi observado que o grupo de déficit recorrente apresentou mecanismos que minimizaram a geração dessas substâncias, especialmente devido ao aumento de pigmentos fotoprotetores e da manutenção osmótica através dos açúcares solúveis, visto que a incidência de peróxido de hidrogênio foi significativamente menor que a do grupo de DHU, equiparando-se às plantas sob irrigação (Figuras 6A; 7D; 8B). Evidências desta efetividade podem ser observadas pela ausência de variação nos níveis de peroxidação lipídica entre os tratamentos de déficit recorrente e controle, diminuindo a necessidade de atuação de enzimas antioxidativas, diferentemente do contexto de déficit único, o qual apresentou efetiva atuação da peroxidase (Figura 8B, C e D). Presumivelmente a mais adequada hidratação dos tecidos observada em déficit recorrente provocou uma menor exigência de ajustes metabólicos. Por outro lado, no grupo de déficit único, a insuficiência da manutenção hídrica das plantas demandou atuação de dispositivos bioquímicos de defesa (Figuras 3 e 8C e D). A maior atividade da enzima SOD no grupo controle pode ser sugerida pela menor quantificação de carotenoides, expressiva no grupo de DHR, e antocianinas, em maior quantidade no grupo de DHU, pigmentos relacionados às respostas defensivas, além de que a provável atuação desta enzima em DHU já havia ocorrido em algum momento antecedente ao da coleta, podendo

identificar apenas seu resultado através da alta incidência de H₂O₂ nestes mesmos indivíduos (Figura 8D).

As expressões gênicas relativas quantificadas corroboram com as condições fisiológicas as quais os grupos de déficit hídrico apresentaram, visto que sob um ciclo de déficit hídrico os mecanismos de dissipação de energia não apresentaram tanta eficácia, demandou-se a reconstituição constante de estruturas proteicas, assim como as sintetizadas pelos alvos escolhidos, PsbR e PsbS, cujas degradações podem ser sugeridas pelas altas incidências de peroxidação lípida e peróxido de hidrogênio neste mesmo grupo (Figura 8A e B). Além disso, os níveis reduzidos de ETR e NPQ (Figura 4C e D) destas plantas sugerem, também, a desestruturação destas organelas, estimulando, portanto, a síntese das proteínas relacionadas para a recomposição destas estruturas. A eficácia dos mecanismos de proteção e manutenção hídrica do grupo de déficit hídrico recorrente dispensou a necessidade da reposição dessas proteínas na ocorrência desta condição, conseqüentemente de suas respectivas expressões gênicas, visto que este grupo sofreu o primeiro evento de déficit hídrico anteriormente, durante o qual possivelmente as estruturas celulares foram reconstruídas. Por conseguinte, a recuperação da eficiência fotossintética foi obtida após a reidratação, sem nenhum dano permanente, demonstrando que as limitações fotossintéticas são reversíveis (Beckett *et al.*, 2012).

Apesar das coletas realizadas se limitarem a uma análise pontual, os dados permitem pressupor uma dinâmica fisiológica expressivamente diferente entre as duas condições de déficit hídrico deste ensaio. A reduzida quantificação de SOD constatada no grupo de DHR pode ser respondida pela compensação de pigmentos, especialmente os carotenoides, apresentada por este mesmo grupo. Conhecida a importância protetora que estas moléculas exercem, este investimento verificado pode ter dispensado a necessidade da atuação desta enzima, visto que os valores dos pigmentos, com exceção das antocianinas, foram mais elevados que o do grupo irrigado (Figuras 7A, B e D; 8D).

Analogicamente ao efeito que um antígeno é capaz de provocar em um sistema imunológico, aprimorando, assim, a eficiência de uma próxima resposta a partir de um semelhante estímulo, um princípio de aplicação em vacinas, os resquícios provindos de experiência de estresse anterior proporcionam a intensidade de reações de um organismo vegetal, contribuindo para a preservação de maquinarias de organelas e, conseqüentemente, a sobrevivência e adaptação da espécie (Avramova, 2015), requisito primordial em um processo evolutivo.

A partir dos dados, pôde-se observar distintos padrões de respostas fisiológicas entre os tratamentos de déficit hídrico e que, apesar dos mecanismos fotoprotetores e bioquímicos exercerem papel fundamental nos processos de proteção celular, não garantem o equilíbrio do organismo sem prévia experiência, a qual pode ter papel fundamental no ajuste de todo aparato fisiológico em direção ao equilíbrio e eficiência de uma resposta para tolerar um estresse. Presume-se que resquícios das reações anteriores são percebidos no metabolismo do vegetal de forma que influencie no aprimoramento das respostas futuras (Fleta-Soriano e Munné-Bosch, 2016). O que, afinal, parece restar de alguma experiência de estresse anterior, contribui para algum detectável prenúncio para ativação de respostas diferenciadas. Através deste experimento pôde-se sustentar a hipótese de que numa segunda condição de estresse hídrico, os indivíduos apresentam respostas mais aprimoradas, cuja orientação dos mecanismos desenvolve-se conforme a moldagem adaptativa estimulada pelo ambiente.

Como esta proposta não se constitui a partir da perspectiva da produtividade da espécie, conclui-se que é uma expressiva vantagem o desvio de reservas energéticas para o equilíbrio do metabolismo vegetal frente às variações ambientais que desafiam sua sobrevivência. A percepção do segundo evento de déficit hídrico ocorreu de forma que a plasticidade fenotípica acarretou em “memória fisiológica”, proporcionando uma resposta mais rápida e protetora (Walter *et al.*, 2011) através de alterações epigenéticas e acúmulo de proteínas sinalizadoras ou fatores de transcrição (Bruce *et al.*, 2007). Cogita-se que única forma de sustentar o sucesso de uma estratégia adaptativa é expô-la fenotipicamente. Sem esta premissa, qualquer propensão genética que o organismo possa portar torna-se improdutivo, pois sem sua expressão é improvável que a(s) promissora(s) característica(s) seja(m) selecionada(s) e perpetuada(s).

5. CONCLUSÃO

As evidências deste trabalho sustentam a suposição de que a memória desenvolvida a partir de experiência prévia influenciou ajustes que minimizaram impactos, tais como: manutenção hídrica; conservação de estruturas celulares; diminuição da atuação de mecanismos de defesa (sistema antioxidante, expressões gênicas, recomposição de organelas; pigmentos). As respostas ao déficit hídrico são influenciadas pela memória, visto que os padrões responsivos durante os eventos, entre os tratamentos de déficit, não são os mesmos, sendo, portanto, um dos sucessos da sobrevivência ocorra a partir do aprendizado e memória.

6. BIBLIOGRAFIA

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, p.1337–1344, 2001.

ALLAHVERDIYEVA, Y.; SUORSA, M.; ROSSI, F.; PAVESI, A.; KATER, M. M.; ANTONACCI, A.; TADINI, L.; PRIBIL, M.; SCHNEIDER, A.; WANNER, G.; LEISTER, D.; ARO, E. M.; BARBATO, R.; PESARESI, P. ALLAHVERDIYEVA, Y. *et al.* Arabidopsis plants lacking PsbQ and PsbR subunits of the oxygen-evolving complex show altered PSII super-complex organization and short-term adaptive mechanisms. **Plant Journal**, v. 75, n. 4, p. 671–684, 2013.

ALPI, A. *et al.* Plant neurobiology: no brain, no gain? **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 4, p. 135–136, 2007.

ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1331–1341, 2002.

ARAUS, J. L.; AMARO, T.; VOLTAS, J.; NAKKOUL, H.; NACHIT, M. M. Chlorophyll fluorescence as a selection criterion for grain yield in durum wheat under Mediterranean conditions. **Field Crops Research**, v. 55, n. 3, p. 209–223, 1998.

ASADA, K. Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 391–396, 2006.

AVRAMOVA, Z. Transcriptional “memory” of a stress: Transient chromatin and memory (epigenetic) marks at stress-response genes. **Plant Journal**, v. 83, n. 1, p. 149–159, 2015.

AWUCHI, C. G. Sugar Alcohols: Chemistry, Production, Health Concerns and Nutritional Importance. n. April, 2017.

BAKER, N. R. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, n. 1, p. 89–113, 2008.

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.

BARNAWAL, D.; SINGH, R.; SINGH, R. P. **Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Plant Drought Tolerance: Regulating Growth Hormones and Osmolytes.** [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

BECKETT, M.; LORETO, F.; VELIKOVA, V.; BRUNETTI, C.; FERDINANDO, M. DI; TATTINI, M.; CALFAPIETRA, C.; FARRANT, J. M. Photosynthetic limitations and volatile and non-volatile isoprenoids in the poikilochlorophyllous resurrection plant *Xerophyta humilis* during dehydration and rehydration. **Plant, Cell and Environment**, v. 35, n. 12, p. 2061–2074, 2012.

BERRY, J. O.; YERRAMSETTY, P.; ZIELINSKI, A. M.; MURE, C. M. Photosynthetic gene expression in higher plants. **Photosynthesis Research**, v. 117, n. 1–3, p. 91–120, 2013.

BOLHAR-NORDENKAMPF, H. R.; LONG, S. P.; BAKER, N. R.; OQUIST, G.; SCHREIBER, U.; LECHNER, E. G. Chlorophyll Fluorescence as a Probe of the Photosynthetic Competence of Leaves in the Field: A Review of Current Instrumentation. **Functional Ecology**, v. 3, n. 4, p. 497, 1989.

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.

BRESTIC, M.; ZIVCAK, M.; KUNDERLIKOVA, K.; SYTAR, O.; SHAO, H.; KALAJI, H. M.; ALLAKHVERDIEV, S. I. Low PSI content limits the photoprotection of PSI and PSII in early growth stages of chlorophyll b-deficient wheat mutant lines. **Photosynthesis Research**, v. 125, n. 1–2, p. 151–166, 2015.

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.

BUSTIN, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

CALATAYUD, A.; ROCA, D.; MARTÍNEZ, P. F. Spatial-temporal variations in rose leaves under water stress conditions studied by chlorophyll fluorescence imaging. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. 564–573, 2006.

CARMO-SILVA, A. E.; SOARES, A. S.; MARQUES DA SILVA, J.; BERNARDES DA SILVA, A.; KEYS, A. J.; ARRABAÇA, M. C. Photosynthetic responses of three C4 grasses of different metabolic subtypes to water deficit. **Functional Plant Biology**, v. 34, n. 3, p. 204–213, 2007.

CHEN, Y.-E.; LIU, W.-J.; SU, Y.-Q.; CUI, J.-M.; ZHANG, Z.-W.; YUAN, M.; ZHANG, H.-Y.; YUAN, S. Different response of photosystem II to short and long-term drought

stress in *Arabidopsis thaliana*. **Physiologia Plantarum**, v. 158, n. 2, p. 225–235, 2016.

CHIBBAR, R. N.; JAISWAL, S.; GANGOLA, M.; BÅGA, M. Carbohydrate Metabolism. **Encyclopedia of Food Grains: Second Edition**, v. 2–4, p. 161–173, 2015.

CLELAND, R. E.; MELIS, A.; NEALE, P. J. Mechanism of photoinhibition: photochemical reaction center inactivation in system II of chloroplasts. **Photosynthesis Research**, v. 9, n. 1–2, p. 79–88, 1986.

CLOSE, D. C.; BEADLE, C. L. The ecophysiology of foliar anthocyanin. **The Botanical Review**, v. 69, n. 2, p. 149–161, 2003.

COMHAIR, S. A. A.; ERZURUM, S. C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 283, n. 2, p. L246–L255, 2002.

DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS, W. W. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. **Trends in Plant Science**, v. 1, n. 1, p. 21–26, 1996.

DIETZ, K.-J. P Lant P Eroxioredoxins . **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, n. 1, p. 93–107, 2003.

DU, Y. C.; KAWAMITSU, Y.; NOSE, A.; HIYANE, S.; MURAYAMA, S.; WASANO, K.; UCHIDA, Y. Effects of water stress on carbon exchange rate and activities of photosynthetic enzymes in leaves of sugarcane (*Saccharum* sp.). **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 23, n. 6, p. 719–726, 1996.

ELSHEERY, N. I.; CAO, K. F. Gas exchange, chlorophyll fluorescence, and osmotic adjustment in two mango cultivars under drought stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 6, p. 769–777, 2008.

FAN, L.; LINKER, R.; GEPSTEIN, S.; TANIMOTO, E.; YAMAMOTO, R.; NEUMANN, P. M. Progressive inhibition by water deficit of cell wall extensibility and growth along the elongation zone of maize roots is related to increased lignin metabolism and progressive stelar accumulation of wall phenolics. **Plant Physiology**, v. 140, n. 2, p. 603–612, 2006.

FAROOQ, M.; WAHID, A.; KOBAYASHI, N.; FUJITA, D.; BASRA, S. M. A. Plant drought stress: Effects, mechanisms and management. **Sustainable Agriculture**, v. 29, p. 153–188, 2009.

FLETA-SORIANO, E.; MUNNÉ-BOSCH, S. Stress Memory and the Inevitable Effects of Drought: A Physiological Perspective. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. February, p. 1–6, 2016.

FOYER, C. H.; NEUKERMANS, J.; QUEVAL, G.; NOCTOR, G.; HARBINSON, J. Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 4, p. 1637–1661, 2012.

FREDERICKSON MATIKA, D. E.; LOAKE, G. J. Redox Regulation in Plant Immune Function. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 21, n. 9, p. 1373–1388, 2013.

GANETEG, U.; KU, C.; ANDERSSON, J.; JANSSON, S. Is Each Light-Harvesting Complex Protein Important for Plant Fitness ? 1 [w]. **Society**, v. 134, n. January, p. 502–509, 2004.

GANGOLA, M. P.; RAMADOSS, B. R. **Sugars Play a Critical Role in Abiotic Stress Tolerance in Plants**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

GENTY, B.; BRIANTAIS, J. M.; BAKER, N. R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 990, n. 1, p. 87–92, 1989.

GHANNOUM, O. C4 photosynthesis and water stress. **Annals of Botany**, v. 103, n. 4, p. 635–644, 2008.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases. **Annual review of biochemistry**, v. 44, p. 147–159, 1975.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909–930, 2010.

GIOVAGNETTI, V.; RUBAN, A. V. The evolution of the photoprotective antenna proteins in oxygenic photosynthetic eukaryotes. **Biochemical Society Transactions**, v. 46, n. 5, p. 1263–1277, 2018.

GOSS, R.; LEPETIT, B. Biodiversity of NPQ. **Journal of Plant Physiology**, v. 172, p. 13–32, 2015.

HANSSON, M.; VENER, A. V. Identification of Three Previously Unknown *in Vivo* Protein Phosphorylation Sites in Thylakoid Membranes of *Arabidopsis thaliana*. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 2, n. 8, p. 550–559, 2003.

HE, J. M.; WANG, J.; LIANG, H. G. Effects of water stress on photochemical function and protein metabolism of photosystem II in wheat leaves. **Physiologia Plantarum**, v. 93, n. 4, p. 771–777, 1995.

HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; BUITINK, J. Mechanism of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 9, p. 431–438, 2001.

HORTON, P.; RUBAN, A. V.; WALTERS, R. G. Regulation of Light Harvesting in Green Plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 47, n. 1, p. 655–684, 1996.

HUANG, H.; ULLAH, F.; ZHOU, D.-X.; YI, M.; ZHAO, Y. Mechanisms of ROS Regulation of Plant Development and Stress Responses. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. June, p. 1–10, 2019.

ISHIKAWA, N.; TAKABAYASHI, A.; SATO, F.; ENDO, T. Accumulation of the components of cyclic electron flow around photosystem I in C4 plants, with respect to the requirements for ATP. **Photosynthesis Research**, v. 129, n. 3, p. 261–277, 2016.

KAWAI, H.; SAKURAI, M.; INOUE, Y.; CHÛJÔ, R.; KOBAYASHI, S. Hydration of oligosaccharides: Anomalous hydration ability of trehalose. **Cryobiology**, v. 29, n. 5, p. 599–606, 1992.

KINOSHITA, T.; SEKI, M. Epigenetic memory for stress response and adaptation in plants. **Plant and Cell Physiology**, v. 55, n. 11, p. 1859–1863, 2014.

KRAUSE, G.; WEIS, E. Chlorophyll Fluorescence And Photosynthesis: The Basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, n. 1, p. 313–349, 1991.

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

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. 1–11, 2017.

LI, X. P.; BJÖRKMAN, O.; SHIH, C.; GROSSMAN, A. R.; ROSENQUIST, M.; JANSSON, S.; NIYOGI, K. K. A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. **Nature**, v. 403, n. 6768, p. 391–5, 2000.

LI, Y.; MEHTA, R.; MESSING, J. A new high-throughput assay for determining soluble sugar in sorghum internode-extracted juice. **Planta**, v. 248, n. 4, p. 785–793, 2018.

LIU, W. J.; CHEN, Y. E.; TIAN, W. J.; DU, J. B.; ZHANG, Z. W.; XU, F.; ZHANG, F.; YUAN, S.; LIN, H. H. Dephosphorylation of photosystem II proteins and phosphorylation of CP29 in barley photosynthetic membranes as a response to water stress. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1787, n. 10, p. 1238–1245, 2009.

LLANES, A.; BERTAZZA, G.; PALACIO, G.; LUNA, V. Different sodium salts cause

different solute accumulation in the halophyte *Prosopis strombulifera*. **Plant Biology**, v. 15, n. SUPPL.1, p. 118–125, 2013.

MAROCO, J. P.; PEREIRA, J. S.; MANUELA CHAVES, M. Growth, photosynthesis and water-use efficiency of two C₄ Sahelian grasses subjected to water deficits. **Journal of Arid Environments**, v. 45, n. 2, p. 119–137, 2000.

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

MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 1, p. 15–19, 2006.

MITTLER, R. ROS Are Good. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 1, p. 11–19, 2017.

NAHAR, K.; HASANUZZAMAN, M.; FUJITA, M. **Osmolytes and plants acclimation to changing environment: Emerging omics technologies**. [s.l: s.n.].

NATHAN, J.; OSEM, Y.; SHACHAK, M.; MERON, E. Linking functional diversity to resource availability and disturbance: A mechanistic approach for water-limited plant communities. **Journal of Ecology**, v. 104, n. 2, p. 419–429, 2016.

NGUMBI, E.; KLOEPPER, J. Bacterial-mediated drought tolerance: Current and future prospects. **Applied Soil Ecology**, v. 105, p. 109–125, 2016.

NOCTOR, G.; MHAMDI, A.; FOYER, C. H. The Roles of Reactive Oxygen Metabolism in Drought: Not So Cut and Dried. **Plant Physiology**, v. 164, n. 4, p. 1636–1648, 2014.

NOIRAUD, N.; MAUROUSSET, L.; LEMOINE, R. Transport of polyols in higher plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 9, p. 717–728, 2001.

O'NEILL, P. M.; SHANAHAN, J. F.; SCHEPERS, J. S. Use of chlorophyll fluorescence assessments to differentiate corn hybrid response to variable water conditions. **Crop Science**, v. 46, n. 2, p. 681–687, 2006.

PALATNIK, J. F.; CARRILLO, N.; VALLE, E. M. The role of photosynthetic electron transport in the oxidative degradation of chloroplastic glutamine synthetase. **Plant Physiology**, v. 121, n. 2, p. 471–478, 1999.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 9, p. e36, 2002.

PITZSCHKE, A.; FORZANI, C.; HIRT, H. Pitzschke (2006) ROS signaling in plants. v. 8, n. 10, 2006.

PONTES, M. H.; SEVOSTYANOVA, A.; GROISMAN, E. A. When Too Much ATP Is Bad for Protein Synthesis. **Journal of Molecular Biology**, v. 427, n. 16, p. 2586–2594, 2015.

RAHMAN, I.; BISWAS, S. K.; KODE, A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **European Journal of Pharmacology**, v. 533, n. 1–3, p. 222–239, 2006.

RUCKLE, M. E.; DEMARCO, S. M.; LARKIN, R. M. Plastid Signals Remodel Light Signaling Networks and Are Essential for Efficient Chloroplast Biogenesis in Arabidopsis. **the Plant Cell Online**, v. 19, n. 12, p. 3944–3960, 2007.

SANCHEZ, A. C.; SUBUDHI, P. K.; ROSENOW, D. T.; NGUYEN, H. T. Mapping QTLs associated with drought resistance in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). **Plant Molecular Biology**, v. 48, n. 5–6, p. 713–726, 2002.

SILVA, M. D. A.; JIFON, J. L.; SILVA, J. A. G. DA; SHARMA, V. Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 3, p. 193–201, 2007.

SLAMA, I.; ABDELLY, C.; BOUCHEREAU, A.; FLOWERS, T.; SAVOURÉ, A. Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress. **Annals of Botany**, v. 115, n. 3, p. 433–447, 2015.

SMART, R. E.; BINGHAM, G. E. Rapid Estimates of Relative Water Content. **Plant Physiology**, v. 53, n. 2, p. 258–260, 1974.

SPERDOULI, I.; MOUSTAKAS, M. Differential response of photosystem II photochemistry in young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* to the onset of drought stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, n. 4, p. 1267–1276, 2012.

STRASSER, R. J.; SRIVASTAVA, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M. Analysis of the Fluorescence Transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. **Photosynthesis Research**, n. 1, p. 445–483, 2004.

SUDHAKAR REDDY, P.; SRINIVAS REDDY, D.; SIVASAKTHI, K.; BHATNAGAR-MATHUR, P.; VADEZ, V.; SHARMA, K. K. Evaluation of Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.)] Reference Genes in Various Tissues and under Abiotic Stress Conditions for Quantitative Real-Time PCR Data Normalization. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. April, p. 1–14, 2016.

SUI, N.; YANG, Z.; LIU, M.; WANG, B. Identification and transcriptomic profiling of genes involved in increasing sugar content during salt stress in sweet sorghum leaves. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1–18, 2015.

SUORSA, M.; SIRPIÖ, S.; ALLAHVERDIYEVA, Y.; PAAKKARINEN, V.; MAMEDOV, F.; STYRING, S.; ARO, E. M. PsbR, a missing link in the assembly of the oxygen-evolving complex of plant photosystem II. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 1, p. 145–150, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A.; MASTROBERBI, A. (TRADUÇÃO); OLIVEIRA, P. L. (TRADUÇÃO) DE. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. [s.l: s.n.].

TEZARA, W.; MITCHELL, V. J.; DRISCOLL, S. D.; LAWLOR, D. W. Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. **Nature**, v. 401, n. 6756, p. 914–917, 1999.

TREWAVAS, A. The foundations of plant intelligence. **Interface Focus**, v. 7, n. 3, 2017.

VAZ, M.; PEREIRA, J. S.; GAZARINI, L. C.; DAVID, T. S.; DAVID, J. S.; RODRIGUES, A.; MAROCO, J.; CHAVES, M. M. Drought-induced photosynthetic inhibition and autumn recovery in two Mediterranean oak species (*Quercus ilex* and *Quercus suber*). **Tree Physiology**, v. 30, n. 8, p. 946–956, 2010.

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.

WILLIAMS, D. G.; GEMPKO, V.; FRAVOLINI, A.; LEAVITT, S. W.; WALL, G. W.; KIMBALL, B. A.; PINTER, P. J.; LAMORTE, R.; OTTMAN, M. Carbon isotope discrimination by *Sorghum bicolor* under CO₂ enrichment and drought. **New Phytologist**, v. 150, n. 2, p. 285–293, 2001.

WINTER, K.; DEMMIG, B. Reduction State of Q and Nonradiative Energy Dissipation during Photosynthesis in Leaves of a Crassulacean Acid Metabolism Plant, *Kalanchoë daigremontiana* Hamet et Perr. **Plant Physiology**, v. 85, n. 4, p. 1000–1007, 1987.

WU, J.; NEIMANIS, S.; HEBER, U. Photorespiration is More Effective than the Mehler Reaction in Protecting the Photosynthetic Apparatus against Photoinhibition. **Botanica Acta**, v. 104, n. 4, p. 283–291, 1991.

WUDICK, M. M.; LI, X.; VALENTINI, V.; GELDNER, N.; CHORY, J.; LIN, J.; MAUREL, C.; LUU, D. T. Subcellular Redistribution of Root Aquaporins Induced by Hydrogen Peroxide. **Molecular Plant**, v. 8, n. 7, p. 1103–1114, 2015.

XIN, Z.; AIKEN, R.; BURKE, J. Genetic diversity of transpiration efficiency in

sorghum. **Field Crops Research**, v. 111, n. 1–2, p. 74–80, 2009.

XIONG, L.; WANG, R.-G.; MAO, G.; KOCZAN, J. M. Identification of Drought Tolerance Determinants by Genetic Analysis of Root Response to Drought Stress and Abscisic Acid. **Plant Physiology**, v. 142, n. 3, p. 1065–1074, 2006.

YUAN, S.; LIU, W.; ZHANG, N.; WANG, M.; LIANG, H.; LIN, H. Effects of water stress on major photosystem II gene expression and protein metabolism in barley leaves. **Physiologia Plantarum**, p. 464–473, 2005.

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

ZENG, J.; DONG, Z.; WU, H.; TIAN, Z.; ZHAO, Z. Redox regulation of plant stem cell fate. **The EMBO Journal**, v. 36, n. 19, p. 2844–2855, 2017.

ZENTNER, G. E.; HENIKOFF, S. Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 20, n. 3, p. 259–266, 2013.

ZHANG, C.; PENG, X.; GUO, X.; TANG, G.; SUN, F.; LIU, S.; XI, Y. Transcriptional and physiological data reveal the dehydration memory behavior in switchgrass (*Panicum virgatum* L.). **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–22, 2018.