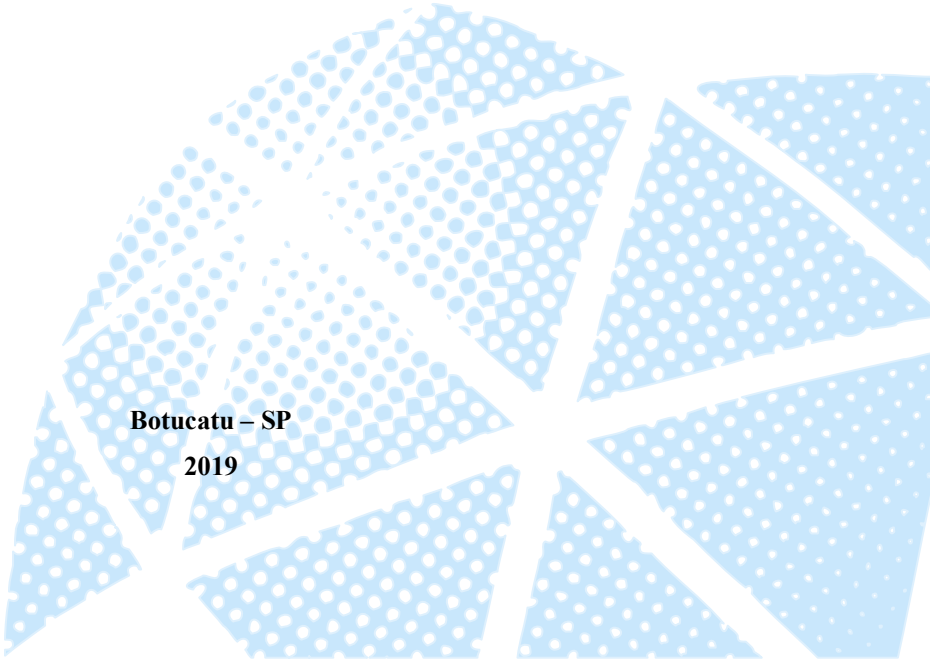


MEMÓRIA FISIOLÓGICA E COMUNICAÇÃO RADICULAR INDUZIDA POR METIL JASMONATO

FELIPE YAMASHITA DE OLIVEIRA

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), AC: Fisiologia e Bioquímica Vegetal.



Botucatu – SP
2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

MEMÓRIA FISIOLÓGICA E COMUNICAÇÃO RADICULAR
INDUZIDA POR METIL JASMONATO

FELIPE YAMASHITA DE OLIVEIRA
ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ FERNANDO ROLIM DE ALMEIDA

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), AC: Fisiologia e Bioquímica Vegetal.

Botucatu – SP
2019

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

Oliveira, Felipe Yamashita de.

Memória fisiológica e comunicação radicular induzida
por metil jasmonato / Felipe Yamashita de Oliveira. -
Botucatu, 2019

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

Orientador: Luiz Fernando Rolim de Almeida
Capes: 20303009

1. Raízes de Plantas. 2. Epigenética. 3. Expressão
gênica. 4. Fisiologia vegetal.

Palavras-chave: Comunicação entre plantas; Desenvolvimento
de raiz; Epigenética; Expressão gênica; Short-root.

“Intelligence is based on how efficient a species became at doing the things they need to survive.”

Charles Darwin

Dedico,

Aos meus avós Kaname e Namie.

Aos meus pais Benedito e Yukie.

Aos meus irmãos Marcos, Robson, Viviane, Tais e Simone.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À FAPESP pelo financiamento de recursos para a pesquisa. Processo FAPESP 2017/01476-0.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Fernando Rolim de Almeida, pela confiança, incentivo, paciência e participação no meu processo de formação profissional e pessoal.

Ao Instituto de Biociências de Botucatu – Universidade Estadual Paulista – “Júlio de Mesquita Filho” e aos funcionários da seção de pós-graduação.

Ao meus avós, meus pais, irmãos e sobrinhos, e minha prima/irmã Rafaela por me apoiarem e me darem força para continuar, sempre que precisei.

À minha namorada Mariana, pelo apoio, pelo conforto sempre que foi preciso, por me ouvir e me dar conselhos, sempre que necessário.

Aos professores Profa. Dra. Cláudia Rainho, Prof. Dr. João Pessoa de Araújo Júnior e Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia pelo auxílio teórico e metodológico.

À Profa. Dra. Tatiane Maria Rodrigues, Profa. Dra. Camila Kissmann e Profa. Dra. Carmen Silvia Fernandes Boaro pela grande parceria, ajuda metodológica e disponibilidade com os equipamentos nos laboratórios.

Aos amigos do Laboratório de Ecofisiologia, Angélica Rodrigues, Luís Paulo Mantoan, Danilo Miralha, Ângelo Bertholdi, Thayssa Scheley, Thais Arruda, Tatiana Tintino, Jerônimo Schultz e Livia Leite, pelo apoio, amizade, conversas do dia-a-dia, e pelas discussões para elaboração desse trabalho.

Aos docentes e profissionais do Departamento de Botânica, em especial, Inara, Maria Helena, Kleber e Zé Du, por toda ajuda burocrática e metodológica.

Aos amigos do Departamento de Botânica, em especial, Felipe Giroto, Carla Corrêa, Luiz Ricardo Tozin, Fernanda Palermo e Juan Nicolai por sempre contribuir espontaneamente a este trabalho.

Aos amigos do IBTEC, Leila Ullmann, Fabio Possebon, Camila Malossi, Jaqueline Diniz, Jessica Biondo e Marianna Araújo, por contribuírem ativamente durante às análises moleculares.

Às amigas Bruna Helena, Nina Camargo e Lidiane Coffacci por serem meu ponto de apoio e incentivo durante esses nove anos de faculdade.

À família Tipo Rei e agregados, André Sartori (Busto), Danilo Hohne (Bla), Gabriel Ferreira (Plai), Felipe Mattez (Kimi), Lucas Argenton (Mino), Henrique Silva (Mc), Jonas Vieira (Caiça), Juliana Carvalho (Tarra), Tamires Frazon (Sexta), Pedro (Kejo), Sérgio Alexandre (Pei), pelos momentos de alegria, descontração, amizade e companheirismo.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. MATERIAL E METODOS.....	6
2.1. ESPÉCIE EM ESTUDO.....	6
2.2. ÁREA DO EXPERIMENTO E CULTIVO	7
2.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	7
2.4. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	9
2.4.1. <i>Isolamento e quantificação do RNA total</i>	9
2.4.2. <i>Síntese de cDNA</i>	10
2.4.3. <i>RT-qPCR</i>	10
2.4.4. <i>Análise de dados da expressão gênica</i>	11
2.5. IMUNOPRECIPITAÇÃO DA CROMATINA	11
2.6. ANÁLISES MORFOLÓGICAS	13
2.7. ANÁLISES DAS VARIÁVEIS FISIOLÓGICAS	13
2.7.1. <i>Trocas gasosas</i>	13
2.7.2. <i>Fluorescência da clorofila a</i>	13
2.8. OBTENÇÃO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	14
3. RESULTADOS.....	14
3.1. TROCAS GASOSAS.....	14
3.2. ETAPA FOTOQUÍMICA.....	16
3.3. ANÁLISES ANATÔMICAS.....	18
3.4. EXPRESSÃO DOS GENES DO DESENVOLVIMENTO RADICULAR	19
3.5. ANÁLISE EPIGENÉTICA	20
4. DISCUSSÃO.....	23
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
6. TABELAS.....	28
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
APÊNDICE	42

LISTA DE ABREVIÇÕES

SHR: SHORT-ROOT

GRAS: GIBBERELLIN NSENSITIVE (GAI), REPRESSOR OF GA1–3 (RGA), SCR

SCR: SCARECROW

EROs: espécies reativas de oxigênio

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

GST: Glutathione S-Transferase TAU8

DNA: ácido desoxirribonucleico

H3K4Me₃: trimetilação da lisina da posição 4 da histona H3

C: tratamento controle

CV: tratamento controle vizinho

MeJa: metil jasmonato

M: tratamento com metil jasmonato

MV: tratamento vizinho ao metil jasmonato

HAA: horas após aplicação

RNA: ácido ribonucleico

cDNA: DNA complementar

RIN: RNA integrity number

RT-qPCR: reação em cadeia da polimerase quantitativo da transcrição reversa em tempo real

qPCR: reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real

T_m: temperatura de fusão

Ct: Threshold Cycle

PP2A: Serine/threonine-Protein Phosphatase

EIF4 α : Eukaryotic Initiation Factor 4 α

FAA: formaldeído, ácido acético e álcool etílico 50%

CO₂: dióxido de carbono

H₂O: água

IRGA: analisador de gás CO₂ e vapor d'água por radiação infravermelha

E: taxa de transpiração

gs: condutância estomática

A: taxa de assimilação de CO₂

EUA: eficiência do uso da água

ETR: taxa de transporte de elétrons

qP: dissipação fotoquímica

F_M : fluorescência máxima adaptada à luz

F_0 : fluorescência basal de folhas adaptadas à luz

Φ_{PSII} : rendimento quântico efetivo do fotossistema II

PSII: fotossistema II

JA: jasmonato

Rubisco: ribulose 1,5 bifosfato carboxilase/oxigenasse

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - CARACTERIZAÇÃO DA TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA DO AR NA CASA DE VEGETAÇÃO DURANTE O PERÍODO DE EXPERIMENTO..... 7
- FIGURA 2** - MODELO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO DE COMUNICAÇÃO ENTRE RAÍZES. GRUPO CONTROLE (C) TIVERAM SUAS RAÍZES DIVIDIDAS E ALOCADAS NOS VASOS 1 E 2; GRUPO CONTROLE VIZINHO (CV) TIVERAM SUAS RAÍZES DIVIDIDAS E ALOCADAS NOS VASOS 2 E 3; GRUPO MEJA (M) TIVERAM SUAS RAÍZES DIVIDIDAS E ALOCADAS NOS VASOS 1 E 2; GRUPO MEJA VIZINHO (MV) TIVERAM SUAS RAÍZES DIVIDIDAS E ALOCADAS NOS VASOS 2 E 3..... 8
- FIGURA 3** - ESQUEMA DO DESENHO EXPERIMENTAL PARA APLICAÇÃO DE METIL JASMONATO E COLETAS A SEREM REALIZADAS 8
- FIGURA 4** - CONDIÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE SORGO NO 18º DIA DE EXPERIMENTO EM MEIO HIDROPÔNICO COM AERAÇÃO CONSTANTE EM SOLUÇÃO NUTRITIVA Nº2 DE HOAGLAND; ARNON, 1950, 50% DE FORÇA IÔNICA, CONDUTIVIDADE ELÉTRICA EM 1.2MS E PH EM 6.0. 9
- FIGURA 5** - TAXA DE ASSIMILAÇÃO DE CO₂ (A, MMOL CO₂ M⁻²S⁻¹) REFERENTE AO PRIMEIRO E SEGUNDO CONTATO COM METIL JASMONATO. A APLICAÇÃO DO METIL JASMONATO OCORREU ÀS 6H DA MANHÃ (0 HAA). OS RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA ONE WAY), SEGUIDO PELO TESTE TUKEY COM NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA DE 5% (P<0,05). LETRAS MINÚSCULAS INDICAM DIFERENÇA ENTRE MEJA E CONTROLE NO RESPECTIVO CONTATO, LETRAS MAIÚSCULAS INDICAM DIFERENÇA ENTRE O PRIMEIRO E SEGUNDO CONTATO..... 14
- FIGURA 6** - CONDUTÂNCIA ESTOMÁTICA (G_s, MMOL.M⁻²S⁻¹) REFERENTE AO PRIMEIRO E SEGUNDO CONTATO COM METIL JASMONATO. A APLICAÇÃO DO METIL JASMONATO OCORREU ÀS 6H DA MANHÃ (0 HAA). OS RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA ONE WAY), SEGUIDO PELO TESTE TUKEY COM NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA DE 5% (P<0,05). LETRAS MINÚSCULAS INDICAM DIFERENÇA ENTRE MEJA E CONTROLE NO RESPECTIVO CONTATO, LETRAS MAIÚSCULAS INDICAM DIFERENÇA ENTRE O PRIMEIRO E SEGUNDO CONTATO..... 15
- FIGURA 7** - EFICIÊNCIA DO USO DA ÁGUA (EUA, MMOL CO₂ MMOL⁻¹H₂O) REFERENTE AO PRIMEIRO E SEGUNDO CONTATO COM METIL JASMONATO. A APLICAÇÃO DO METIL JASMONATO OCORREU ÀS 6H DA MANHÃ (0 HAA). OS RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA ONE WAY), SEGUIDO PELO TESTE TUKEY COM NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA DE 5% (P<0,05). LETRAS MINÚSCULAS INDICAM DIFERENÇA ENTRE MEJA E

CONTROLE NO RESPECTIVO CONTATO, LETRAS MAIÚSCULAS INDICAM DIFERENÇA ENTRE O PRIMEIRO E SEGUNDO CONTATO.....	16
FIGURA 8 - A) TAXA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS (ETR, MMOL.ELÉTRONS.M ⁻² S ⁻¹) REFERENTE AO PRIMEIRO E SEGUNDO CONTATO COM METIL JASMONATO DOS GRUPOS CONTROLE (C) E MEJA (M). B) FLUORESCÊNCIA MÁXIMA (F _M) REFERENTE AO PRIMEIRO E SEGUNDO CONTATO COM METIL JASMONATO DOS GRUPO CONTROLE VIZINHO (CV) E MEJA VIZINHO (MV). C) F _M REFERENTE AO SEGUNDO CONTATO COM METIL JASMONATO DOS GRUPOS DOS GRUPO CONTROLE VIZINHO (CV) E MEJA VIZINHO (MV). D) F _M REFERENTE AO SEGUNDO CONTATO COM METIL JASMONATO DOS GRUPOS DOS GRUPO MEJA (M) E MEJA VIZINHO (MV). LETRAS MINÚSCULAS INDICAM DIFERENÇA ENTRE OS GRUPOS NO RESPECTIVO CONTATO, LETRAS MAIÚSCULAS INDICAM DIFERENÇA ENTRE O PRIMEIRO E SEGUNDO CONTATO NO MESMO GRUPO. OS RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA ONE WAY), SEGUIDO PELO TESTE TUKEY COM NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA DE 5% (P<0,05).	17
FIGURA 9 - ASPECTOS ANATÔMICOS DE RAÍZES DE SORGHUM BICOLOR NO 18º DIA DE EXPERIMENTO. A, ÁREA DO ESPAÇO INTERCELULAR (µM ²). B, DIÂMETRO DA RAIZ (µM). C, ÁREA OCUPADA PELO ESTELO (µM ²). OS RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA ONE WAY), SEGUIDO PELO TESTE TUKEY COM NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA DE 5% (P<0,05). DADOS REFERENTES ÀS MÉDIAS (N=4). LETRAS MAIÚSCULAS INDICAM DIFERENÇAS ENTRE GRUPO DE PLANTAS COM APLICAÇÃO E PLANTAS VIZINHAS (MEJA X MEJA VIZINHO E CONTROLE X CONTROLE VIZINHO). LETRAS MINÚSCULAS INDICAM DIFERENÇAS ENTRE MESMO GRUPO COM APLICAÇÃO OU VIZINHAS (CONTROLE X MEJA E CONTROLE VIZINHO X MEJA VIZINHO).....	19
FIGURA 10 - LOG DA EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE SHR. A APLICAÇÃO DO METIL JASMONATO OCORREU ÀS 6H DA MANHÃ (0 HAA). OS RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA ONE WAY), SEGUIDO PELO TESTE TUKEY COM NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA DE 5% (P<0,05). LETRAS MAIÚSCULAS INDICAM DIFERENÇA ENTRE O PRIMEIRO E SEGUNDO CONTATO.....	20
FIGURA 11 - CURVA DE AMPLIFICAÇÃO. A) AMOSTRAS DE DNA IMUNOPRECIPITADO COM PRIMER DO GENE SHR. B) AMOSTRAS DE DNA NÃO IMUNOPRECIPITADO COM PRIMER DO GENE SHR. C) AMOSTRAS DE DNA IMUNOPRECIPITADO COM PRIMER DO GENE GST. D) AMOSTRAS DE DNA NÃO IMUNOPRECIPITADO COM PRIMER DO GENE GST. SETAS INDICAM CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA. PONTAS DE SETAS INDICAM PRODUTO INESPECÍFICO, OU SEJA, DNA NÃO AMPLIFICADO OU DÍMEROS DE PRIMER.	21
FIGURA 12 - CURVA DE MELTING. A) CURVA DE MELTING DO DNA IMUNOPRECIPITADO E AMPLIFICADO DO GENE SHR. B) CURVA DE MELTING DO DNA NÃO IMUNOPRECIPITADO E	

AMPLIFICADO DO GENE SHR. **C)** CURVA DE MELTING DO DNA IMUNOPRECIPITADO E
AMPLIFICADO DO GENE GST. **D)** CURVA DE MELTING DO DNA NÃO IMUNOPRECIPITADO E
AMPLIFICADO DO GENE GST. SETAS INDICAM CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA. PONTAS
DE SETA INDICA PRODUTO INESPECÍFICO, OU SEJA, DNA NÃO AMPLIFICADO..... 22

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - RIN (RNA INTERGRITY NUMBER) OBTIDOS A PARTIR DE ELETROFEROGRAMA.	28
TABELA 2 - INICIADORES ESPECÍFICOS UTILIZADOS NA AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA VIA RT- QPCR E NA AVALIAÇÃO DA METILAÇÃO DE HISTONAS VIA QPCR.	29
TABELA 3 - MÉDIA (N=4) DOS DADOS DE ASSIMILAÇÃO DE CO₂ (A, MMOL CO₂ M⁻²S⁻¹), CONDUTÂNCIA ESTOMÁTICA (G_s, MMOL.M⁻²S⁻¹), TAXA DE TRANSPIRAÇÃO (E, MMOL VAPOR D'ÁGUA M⁻²S⁻¹), EFICIÊNCIA DO USO DA ÁGUA (EUA, MMOL CO₂ MMOL⁻¹H₂O), TAXA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS (ETR, μMOL.ELÉTRONS.M⁻²S⁻¹), FLUORESCÊNCIA MÁXIMA (F_M), FLUORESCÊNCIA BASAL (F₀), DISSIPACÃO FOTOQUÍMICA (QP) E RENDIMENTO QUÂNTICO EFETIVO DO PSII (Φ_{psii}), REFERENTE À PRIMEIRA AVALIAÇÃO ÀS 9 HORAS DA MANHÃ, ANTES DA APLICAÇÃO DO ALELOQUÍMICO (0H). CV: CONTROLE VIZINHA; MV: MEJA VIZINHO. OS RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA <i>ONE WAY</i>). SEGUIDO PELO TESTE TUKEY COM NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA DE 5% (P<0,05). LETRAS MINÚSCULAS INDICAM DIFERENÇA ENTRE MEJA E CONTROLE NO RESPECTIVO CONTATO, LETRAS MAIÚSCULAS INDICAM DIFERENÇA ENTRE O PRIMEIRO E SEGUNDO CONTATO.....	30
TABELA 4 - MÉDIA (N=4) DOS DADOS DE ASSIMILAÇÃO DE CO₂ (A, MMOL CO₂ M⁻²S⁻¹), CONDUTÂNCIA ESTOMÁTICA (G_s, MMOL.M⁻²S⁻¹), TAXA DE TRANSPIRAÇÃO (E, MMOL VAPOR D'ÁGUA M⁻²S⁻¹), EFICIÊNCIA DO USO DA ÁGUA (EUA, MMOL CO₂ MMOL⁻¹H₂O), TAXA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS (ETR, μMOL.ELÉTRONS.M⁻²S⁻¹), FLUORESCÊNCIA MÁXIMA (F_M), FLUORESCÊNCIA BASAL (F₀), DISSIPACÃO FOTOQUÍMICA (QP) E RENDIMENTO QUÂNTICO EFETIVO DO PSII (Φ_{psii}), REFERENTE À PRIMEIRA AVALIAÇÃO ÀS 9 HORAS DA MANHÃ, ANTES DA APLICAÇÃO DO ALELOQUÍMICO (0H). CV: CONTROLE VIZINHA; MV: MEJA VIZINHO. OS RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA <i>ONE WAY</i>). SEGUIDO PELO TESTE TUKEY COM NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA DE 5% (P<0,05). LETRAS MINÚSCULAS INDICAM DIFERENÇA ENTRE MEJA E CONTROLE NO RESPECTIVO CONTATO.....	32
TABELA 5 - MÉDIA (N=4) DOS DADOS DE ASSIMILAÇÃO DE CO₂ (A, MMOL CO₂ M⁻²S⁻¹), CONDUTÂNCIA ESTOMÁTICA (G_s, MMOL.M⁻²S⁻¹), TAXA DE TRANSPIRAÇÃO (E, MMOL VAPOR D'ÁGUA M⁻²S⁻¹), EFICIÊNCIA DO USO DA ÁGUA (EUA, MMOL CO₂ MMOL⁻¹H₂O), TAXA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS (ETR, μMOL.ELÉTRONS.M⁻²S⁻¹), FLUORESCÊNCIA MÁXIMA (F_M), FLUORESCÊNCIA BASAL (F₀), DISSIPACÃO FOTOQUÍMICA (QP) E RENDIMENTO QUÂNTICO EFETIVO DO PSII (Φ_{psii}), REFERENTE À PRIMEIRA AVALIAÇÃO ÀS 9 HORAS DA MANHÃ, ANTES DA APLICAÇÃO DO ALELOQUÍMICO (0H). M: MEJA; MV: MEJA VIZINHO. OS RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA <i>ONE WAY</i>). SEGUIDO PELO TESTE	

TUKEY COM NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA DE 5% ($P<0,05$). LETRAS MINÚSCULAS INDICAM DIFERENÇA ENTRE MEJA E MEJA VIZINHO DO RESPECTIVO CONTATO..... 34

TABELA 6 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE SHR EM RAÍZES DE SORGO. A EXPRESSÃO GÊNICA É REPRESENTADA PELO PRODUTO (EXPRESSÃO RELATIVA) DO VALOR DA EXPRESSÃO DO GENE SHR COM O VALOR DE EXPRESSÃO DOS GENES NORMALIZADORES, PP2A E EIF4A. M₁: TRATAMENTO MEJA NO PRIMEIRO CONTATO COM METIL JASMONATO; M₂: TRATAMENTO MEJA NO SEGUNDO CONTATO COM METIL JASMONATO; MV₁: TRATAMENTO MEJA VIZINHO NO PRIMEIRO CONTATO DO GRUPO M COM METIL JASMONATO; MV₂: TRATAMENTO MEJA VIZINHO NO SEGUNDO CONTATO COM METIL JASMONATO, C₁: TRATAMENTO CONTROLE NO PRIMEIRO CONTATO DO GRUPO M COM METIL JASMONATO; C₂: TRATAMENTO CONTROLE NO SEGUNDO CONTATO DO GRUPO M COM METIL JASMONATO; CV₁: TRATAMENTO CONTROLE VIZINHO NO PRIMEIRO CONTATO DO GRUPO M COM METIL JASMONATO; CV₂: TRATAMENTO CONTROLE VIZINHO NO SEGUNDO CONTATO DO GRUPO M COM METIL JASMONATO. OS RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA ONE WAY), SEGUIDO PELO TESTE TUKEY COM NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA DE 5% ($P<0,05$). LETRAS MAIÚSCULAS INDICAM DIFERENÇA ENTRE O PRIMEIRO E SEGUNDO CONTATO..... 36

RESUMO

Apesar de serem organismos sésseis, as plantas movimentam ativamente estruturas vegetativas e reprodutivas, levando a interação com o ambiente ao redor. As plantas mantêm comunicação com plantas vizinhas, herbívoros e predadores através da emissão de compostos químicos exsudados pela raiz e esses eventos modificam o ambiente ocupado pelos vegetais. Esses exsudatos podem induzir a alteração de padrões morfológicos e fisiológicos além da expressão gênica de plantas vizinhas. Utilizamos o metil jasmonato, um regulador vegetal, para desencadear dois ciclos indutivos em plantas e comunicação com plantas vizinhas. Durante o estímulo, analisamos assimilação líquida de CO_2 (A), condutância estomática (g_s), taxa de transpiração (E), eficiência do uso da água (EUA), taxa de transporte de elétrons (ETR), fluorescência máxima (F_M) e basal (F_0), dissipação fotoquímica (qP) e rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}), além da expressão do gene *SHR*, padrão de metilação de histonas e parâmetros anatômicos em plantas com aplicação e plantas vizinhas. Plantas com aplicação de metil jasmonato apresentaram queda nos parâmetros fisiológicos horas após o contato com o elicitor, porém em segundo contato, tais parâmetros não diferiram do controle, indicando possível efeito de memória (*imprint*). Plantas induzidas pelo metil jasmonato podem ter emitido sinais às plantas vizinhas, proporcionando maiores taxas de A , g_s , F_M e F_0 das plantas vizinhas em relação às induzidas. Portanto a comunicação entre plantas podem levar a manutenção de processos fisiológicos em resposta a alterações ambientais, antecipando respostas e elevando as chances de tolerar um evento de estresse futuro.

Palavras-chave: comunicação entre plantas, desenvolvimento de raiz, epigenética, expressão gênica, *Short-Root*.

ABSTRACT

Although they are sessile organisms, plants actively move their vegetative and reproductive structures, leading to interaction with the surrounding environment. Plants maintain communication with neighboring plants, herbivores and predators through emission of chemical compounds by root and these events modify the environment occupied by plants. These exudates may induce changes in morphological and physiological patterns beyond the gene expression of neighboring plants. We used methyl jasmonate, a plant regulator, to trigger two inductive cycles in plants and communication with neighboring plants. During the stimulus, we analyzed CO₂ net assimilation (A), stomatal conductance (g_s), transpiration rate (E), water use efficiency (WUE), electron transport rate (ETR), maximum fluorescence (F_M), basal fluorescence (F_0), photochemical dissipation (qP) and quantum yield of PSII (Φ_{PSII}), as well as SHR gene expression, histone methylation pattern and anatomical parameters in plants with application and neighboring plants. Plants with methyl jasmonate application showed minor physiological parameters hours after the elicitor contact, but in the second contact, these parameters did not differ from the control group, indicating a possible memory effect (imprint). Plants induced by methyl jasmonate may have emitted signals to neighboring plants, providing higher rates of A , g_s , F_M and F_0 of the neighboring plants in relation to the induced ones. Therefore the communication between plants can lead to the maintenance of physiological processes in response to environmental changes, anticipating responses and increasing the chances of tolerating a future stress event.

Keywords: epigenetic, gene expression, plant signaling, root development, *Short-Root*.

1. INTRODUÇÃO

As principais funções cognitivas do organismo como fala, memória, capacidade de aprendizagem, cognição, entre outros, são estritamente atribuídos aos seres humanos e animais superiores. Toda e qualquer tentativa de comparação de tais atribuições cognitivas a insetos, vegetais e outros organismos, foram e ainda são rotuladas como antropomorfismo, uma tentativa de humanizar o que não é humano (LYON, 2006). Algo contrário que Charles Darwin e seu filho, Francis Darwin, escreveram na última frase de um de seus últimos livros publicados: “Não é exagero dizer que a ponta da radícula dotada de sensibilidade, e tendo o poder de dirigir os movimentos das partes adjacentes, atua como o cérebro de um dos animais inferiores; o cérebro situado na extremidade anterior do corpo, recebendo impressões dos órgãos dos sentidos e direcionando a vários movimentos.” (DARWIN; DARWIN, 1880). Obviamente, plantas não possuem nenhum tipo de sistema nervoso sofisticado, nem cérebro, portanto seus mecanismos para percepção e coordenação devem ser diferentes dos encontrados nos animais (BALUŠKA; GAGLIANO; WITZANY, 2018).

À exemplo de Darwin, recentemente diversos pesquisadores começaram a estudar os movimentos e sinalizações realizadas pelas plantas afirmando que apesar de serem organismos sésseis, são capazes de movimentarem ativamente órgãos e utilizam esses movimentos para manipular o ambiente biótico e abiótico ao seu redor (BALUŠKA; MANCUSO, 2018). Corroborando a mesma ideia de que as plantas podem manipular o ambiente ao seu redor, Karban (2008) admite que as plantas podem se comunicar com plantas vizinhas, com herbívoros e até com predadores e parasitas de seus herbívoros, com o intuito de ajustar suas defesas ao ambiente no qual estão inseridas.

Segundo Dicke (2003), uma dessas formas de comunicação ocorre pela emissão de diversos compostos químicos. Porém, para que ocorra a comunicação, é necessário que exista emissor de sinal ou estímulo e respectivo receptor que capte e traduza rapidamente esse sinal (KARBAN, 2008). Por exemplo, após contato com agente agressor, a planta ativa mecanismos de resposta, desencadeando cascata de sinalização interna, indicando situação de ataque. Também pode ocorrer a sinalização para o ambiente, liberando compostos químicos produzidos por diferentes órgãos, ocorrendo geralmente por volatilização na parte aérea e/ou pela exsudação radicular (VENTURI; KEEL, 2016).

Alguns cientistas demonstraram que plantas vizinhas captam informações emitidas por plantas estressadas, detectando seu estado fisiológico alterado através da composição de exsudatos radiculares (ELHAKEEM et al., 2018; JACOB; TOZZI; WILLENBORG, 2017), acarretando na indução de alteração nos padrões morfológicos, fisiológicos e alteração da

expressão gênica (CHEN; DURING; ANTEN, 2012). Jacob et al., (2017) concluiu que uma das possibilidades é que algumas espécies podem exsudar substâncias químicas, sendo que tais substâncias podem ser tóxicas para o desenvolvimento de plantas vizinhas.

Uma substância química com elevado potencial de causar distúrbio nas plantas é o metil jasmonato. Esse composto foi identificado pela primeira vez em óleo essencial de jasmim e alecrim (CREELMAN; MULLET, 1997), atuando como regulador vegetal de ocorrência natural que, mesmo em baixas concentrações, pode causar importantes alterações fisiológicas, no crescimento e desenvolvimento da planta (FAGAN et al., 2015). Em resposta a estímulos ambientais, como herbivoria, algumas plantas podem emitir metil jasmonato (ENGELBERTH et al., 2004), sinalizando esse ataque às plantas vizinhas. Essas plantas vizinhas podem captar esse sinal e, em resposta ao metil jasmonato podem ajustar mecanismos de defesa, desencadeando internamente uma cadeia de ação contra a herbivoria (CHEONG; CHOI, 2003). Segundo Fagan et al. (2015), após a aplicação exógena de metil jasmonato, ocorre a regulação do crescimento e desenvolvimento do vegetal, especialmente do tecido radicular.

Um dos primeiros órgãos vegetais afetados pela ação de substâncias químicas é a raiz, sofrendo inibição do crescimento e consequentemente afetando o desenvolvimento da planta como um todo, podendo ocasionar a sua morte (FERREIRA; AQUILA, 2000). Semelhante à resposta a outros tipos de estresse (frio, calor, seca, alagamento ou salinidade), a planta pode apresentar alterações moleculares e bioquímicas durante a ação do metil jasmonato, limitando seu desenvolvimento. Portanto, ferramentas moleculares associadas ao mecanismo de ação do metil jasmonato podem auxiliar no monitoramento e consequentemente fornecer melhor compreensão sobre o crescimento radicular.

Uma ferramenta molecular essencial no monitoramento do crescimento radicular é a expressão do gene *SHR*. Esse gene codifica a proteína *SHORT-ROOT (SHR)* e juntamente com o gene *SCR (SCARECROW)* são fatores de transcrição da família GRAS que regulam a divisão celular durante a embriogênese (HELARIUTTA et al., 2000). Tais genes são fundamentais para a formação e desenvolvimento das camadas da endoderme e córtex do tecido radicular (BENFEY et al., 1993; KOIZUMI et al., 2012). Conforme descrito por Helariutta et al. (2000), o gene *SCR* influencia somente na divisão celular, ao contrário do *SHR*, essencial na divisão e especificação celular (BENFEY et al., 1993).

O gene *SHR* é de fundamental importância na divisão celular assimétrica, dando origem do córtex e endoderme, resultando também na especificação endodérmica (HELARIUTTA et al., 2000). Em experimento realizado em *Arabidopsis thaliana*, Levesque et al. (2006) observaram que plantas mutantes, sem expressão do gene *SHR*, possuíam desorganização das células do centro quiescente, acarretando a perda da atividade das células meristemáticas, além

de apresentarem raízes primárias reduzidas em comprimento, induzindo a formação de uma camada única de tecido fundamental no córtex radicular (BENFEY et al., 1993; SCHERES et al., 1995). Por outro lado, altos níveis de *SHR* também pode inibir divisões celulares, ocasionando menor crescimento radicular e desenvolvimento lateral das células do tecido vascular (HAO et al., 2011; KOIZUMI et al., 2012).

Outro efeito de intensos estímulos ambientais é a produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), geralmente acompanhada da ativação de sistemas celulares de defesa, como produção de enzimas antioxidantes (BAIS et al., 2003). Entre os EROs podemos encontrar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que atua como o primeiro sinalizador para estimular a transcrição da enzima glutathione S-transferase (*GST*) (MARRS, 1996). Essa enzima está relacionada a defesa celular, catalisando a conjugação do tripeptídeo glutathione, e assim, desintoxicando a peroxidação lipídica (BHATTACHARJEE, 2012). A enzima *GST* também indica capacidade de repostas a diferentes estresses como, desintoxicação contra herbicidas, ataque de patógenos e estresse oxidativo (MARRS, 1996).

Segundo Gagliano et al. (2016), plantas são capazes de se adaptar a mudanças ambientais, formando um processo de aprendizagem. Esse processo baseia-se em desenvolver comportamento de antecipação, sem a necessidade de aprender “do zero” a cada situação de distúrbio ambiental. Walter et al. (2013) denominaram esse processo de aprendizagem como “memória” do estresse. Logo no início de um evento estressante, a planta capta a informação (fase de alarme) e durante todo esse período altera os ajustes fisiológicos que podem promover o efeito de memória (KOSOVÁ et al., 2011). Assim, esses ajustes podem gerar uma memória, que pode aperfeiçoar respostas fisiológicas para o próximo evento de estresse (CRISP et al., 2016). Esse processo de memória nas plantas dificilmente se assemelha com as redes neuronais e cérebros encontrada nos animais, contudo, neurônios podem não ser a única maneira essencial para o aprendizado (GAGLIANO et al., 2014). O processo de memória pode estar relacionado com mudanças da conformação da cromatina (MADLUNG; COMAI, 2004), denominadas mudanças epigenéticas.

Alterações epigenéticas são modificações na estrutura da cromatina, sem que haja alterações na sequência de nucleotídeos (mutação), para registrar, sinalizar, ativar ou silenciar a transcrição gênica (BIRD, 2007; MADLUNG; COMAI, 2004). Em outras palavras, a expressão do genoma é influenciada pela estrutura da cromatina (ZHU et al., 2008). A cromatina é formada por nucleossomos, que por sua vez são formados por pares de bases de DNA que se enrolam em proteínas chamadas histonas, as quais contém duas moléculas de cada histona H2A, H2B, H3 e H4 (VRIET; HENNIG; LALOI, 2015). A acessibilidade da cromatina à transcrição está relacionada a modificações pós-transducionais dessas histonas, como por

exemplo, a metilação do aminoácido lisina na cauda terminal N destas histonas (LIU et al., 2010; WATERBORG, 2011). Ao afetar a conformação da cromatina, essas modificações nas histonas podem alterar a interação histona-DNA, permitindo ou não o acesso de proteínas de transcrição ao DNA, assim ativando ou silenciando um gene (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011; LIU et al., 2010; REA et al., 2000).

O padrão da metilação da histona está diretamente relacionado a estímulos ambientais (CONRATH et al., 2006). Um exemplo é a trimetilação da lisina da posição 4 da histona H3 (H3K4me3). Em resposta ao estímulo ambiental, ocorre a H3K4me3, permitindo o acesso de proteínas de transcrição ao DNA e a rápida ativação de genes, permitindo respostas fisiológicas mais rápidas, assim como o aumento da tolerância durante evento de estímulos recorrentes (BRUCE et al., 2007; NG et al., 2003; WALTER et al., 2011). Portanto, a metilação de histonas pode estar relacionada a respostas de estímulos ambientais, podendo alterar a estabilidade da comunidade vegetal, diminuindo a mortalidade e aumentando a resiliência das plantas. Contudo, existem poucas pesquisas que abordam alterações epigenéticas induzidas por estímulos ambientais (VRIET; HENNIG; LALOI, 2015).

Nesse contexto, considerando que a comunicação vegetal pode ocorrer através da sinalização pelo tecido radicular e que a ocorrência da metilação de histonas auxilia na possível memória do estresse, temos como hipótese que o metil jasmonato induz a comunicação radicular entre plantas, assim como altera padrões morfo-fisiológicos, expressão gênica e metilação de histona nos genes *GST* e *SHR*, favorecendo a tolerância em eventos de estresse futuros. Portanto temos como objetivo: i) investigar se o metil jasmonato induz a comunicação entre plantas; ii) testar se a sinalização recebida pelas plantas vizinhas acarreta alterações morfo-fisiológicas, padrão de metilação de histonas e da expressão gênica do gene *SHR*, o que favoreceria a tolerância a eventos de estresse recorrente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Espécie em estudo

Foram utilizadas plantas de sorgo granífero [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] variedade BRS 332, pertencente à família Poaceae. Essa espécie apresenta elevada densidade genética e genoma relativamente pequeno (~730 Mb) totalmente sequenciado (PATERSON et al., 2009), permitindo a utilização de técnicas moleculares, além de serem plantas de ciclo curto e fácil manipulação de raiz.

2.2. Área do experimento e cultivo

O experimento foi realizado em casa de vegetação no Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da UNESP (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”) de Botucatu/SP. A casa de vegetação é um ambiente onde as condições são semi-controladas, com temperatura média de 27 °C, intensidade luminosa média de 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e umidade relativa média de 70% (Figura 1).

Sementes de *S. bicolor* foram esterilizadas por 10 minutos em hipoclorito de sódio a 5% e posteriormente lavadas com água destilada. A seguir foram colocadas em bandejas com substrato para germinação e enraizamento. Duzentas plântulas de tamanho semelhante com 20 dias após a sementeira foram selecionadas para transplante para meio hidropônico com aeração constante em solução nutritiva nº 2 de Hoagland & Arnon (1950), 50% da força iônica, condutividade elétrica em 1,2 mS e pH em 6,0.

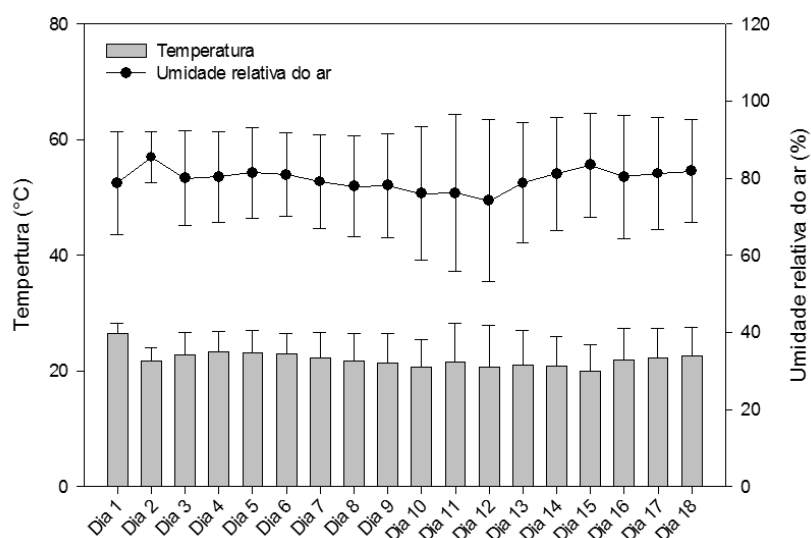


Figura 1 - Caracterização da temperatura e umidade relativa do ar na casa de vegetação durante o período de experimento.

2.3. Delineamento experimental

As plantas foram aclimatadas em vasos distintos com capacidade de 500mL, preenchidos com solução nutritiva pelo período de sete dias. Em seguida, foi adicionado um terceiro vaso e utilizamos a técnica de *Split-root*, mantendo metade da raiz da primeira planta no vaso 1 e a segunda metade de sua raiz no vaso 2. A segunda planta, denominada planta vizinha, também teve sua raiz separada em duas partes, uma parte permaneceu no vaso 2 e o restante no vaso 3 (figura 2). Portanto, separamos as plantas em 4 grupos: Controle (C), plantas sem contato com metil jasmonato, com raízes nos vasos 1 e 2; controle vizinho (CV), plantas sem contato com metil jasmonato, com raízes nos vasos 2 e 3; MeJa (M), plantas em contato com metil

jasmonato, com raízes nos vasos 1 e 2; MeJa vizinho (MV), plantas sem contato com metil jasmonato, com raízes nos vasos 2 e 3. Também denominamos Grupo com aplicação, sendo as plantas C e M, e Grupo vizinho, plantas CV e MV. Após três dias de aclimação, a solução foi substituída por uma nova para aplicação do tratamento e início do experimento.

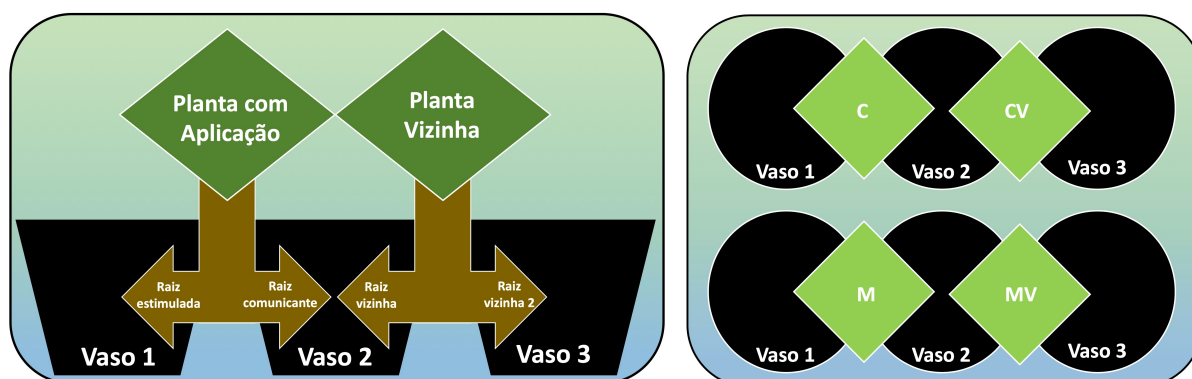


Figura 2 - Modelo experimental para o estudo de comunicação entre raízes. Grupo controle (C) tiveram suas raízes divididas e alocadas nos vasos 1 e 2; grupo controle vizinho (CV) tiveram suas raízes divididas e alocadas nos vasos 2 e 3; grupo MeJa (M) tiveram suas raízes divididas e alocadas nos vasos 1 e 2; grupo MeJa vizinho (MV) tiveram suas raízes divididas e alocadas nos vasos 2 e 3.

Plantas de sorgo com 30 dias após a semeadura foram submetidas a diferentes tratamentos, realizados em blocos casualizados. Para a investigação da atividade biológica, testamos o efeito do metil jasmonato (padrão Sigma Aldrich). O metil jasmonato foi pincelado na primeira folha totalmente expandida da planta tratada à concentração de 0,75 mM, previamente diluído em etanol absoluto e surfatante (agrex'oil®, Microquímica). Escolhemos essa concentração de metil jasmonato para induzir o estímulo pois essa concentração foi semelhante ou maior encontrada na literatura (HUDGINS; CHRISTIANSEN; FRANCESCHI, 2003; LIU et al., 2017; STOJAKOWSKA; MALARZ; KISIEL, 2002).

Para o tratamento controle, foi aplicada água deionizada juntamente com etanol e surfatante. A solução foi aplicada nas plantas em dois momentos, com o intuito de verificar o possível efeito de memória do primeiro sobre o segundo contato conforme figura 3.

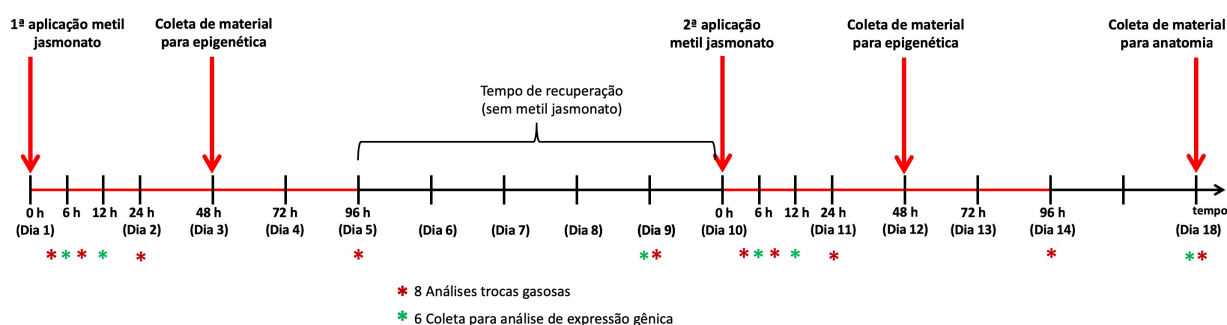


Figura 3 - Esquema do desenho experimental para aplicação de metil jasmonato e coletas a serem realizadas

O tempo de recuperação entre o primeiro e o segundo contato com metil jasmonato foi de cinco dias. Após o 5º e 14º dia, as raízes foram lavadas cuidadosamente com água deionizada, para a retirada total dos exsudatos provenientes do primeiro e segundo contato, respectivamente. Após o processo de lavagem, nova solução nutritiva foi adicionada. O final do experimento foi no 18º dia, com a coleta de material biológico de raiz para estudos anatômicos.

Devido à necessidade de amostragens destrutivas, para análise da expressão gênica as plantas foram separadas em dois grupos: aquelas que foram analisadas após o primeiro contato com os aleloquímicos (dia 5) e aquelas que foram analisadas após o segundo contato (dia 14).

Foi coletado material biológico de raiz às 6, 12, 24 e 200 horas após aplicação (HAA) de metil jasmonato, tanto no primeiro como no segundo contato com metil jasmonato, para análise da expressão gênica, totalizando oito coletas. Para a quantificação da trimetilação da histona H3K4, coletamos raízes das plantas após 48h da aplicação do regulador vegetal, também nos dois ciclos de contato, totalizando duas coletas para análise epigenética. Para as análises anatômicas, foram coletadas raízes no último dia de experimento (18º dia) (figura 4).

Por fim, para cada período de coleta de dados, cada tratamento possuiu um n amostral igual a cinco, totalizando cinco plantas por tratamento e cinco plantas vizinhas.



Figura 4 - Condição de crescimento de plantas de sorgo no 18º dia de experimento em meio hidropônico com aeração constante em solução nutritiva nº2 de HOAGLAND; ARNON, 1950, 50% de força iônica, condutividade elétrica em 1.2mS e pH em 6.0.

2.4. Análise da expressão gênica

2.4.1. Isolamento e quantificação do RNA total

Ao final de cada uma das oito coletas do material radicular para análise da expressão gênica, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente transferidas para

ultrafreezer a -80 °C até a extração. Para a extração do RNA total, as amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e extraídas com TRIzol® Reagent (Life Technologies), seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, o RNA total presente nas amostras foi quantificado por espectrofotometria de absorção (Nanodrop, ND-1000), e todas as amostras apresentaram no mínimo 40 ng de RNA/μL, quantidade mínima necessária para síntese de cDNA. Posteriormente, o RNA total obtido foi tratado com TURBO DNA-free™ Kit (Invitrogen) para a eliminação total de DNA genômico, seguindo as instruções do fabricante.

Além disso, verificamos a integridade das amostras pelo RIN (*RNA integrity number*) através do equipamento BioAnalyzer Agilent 2100 e kit Agilent RNA 6000 Nano Chips (Agilent Technologies). O princípio do BioAnalyzer consiste no mesmo de eletroforese em gel de agarose, porém a corrida é realizada em capilar contendo polímero e gerado um eletroferograma, analisado automaticamente pelo aparelho, sendo detectado qualquer traço de degradação da amostra. O resultado obtido baseia-se na razão dos picos das bandas ribossomais 18S e 25S, gerando dessa forma o RIN. Os valores de RIN variam em uma escala de 1 a 10, sendo que, quanto maior essa pontuação, maior é a qualidade e/ou integridade do RNA. Somente foram utilizadas amostras que obtiveram um RIN igual ou superior a 6,0 (média geral RIN = 7,92) (Tabela 1). A ausência do DNA genômico nas amostras de RNA foi confirmada por meio da realização de PCR convencional utilizando iniciadores específicos para os genes endógenos PP2A (XM_002453490.2) e EIF4α (XM_002451491.2).

2.4.2. Síntese de cDNA

Para síntese da primeira fita de cDNA, foi utilizado o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems®). Utilizamos 500 ng de RNA total para cada amostra, diluídos em água nuclease-free, com volume final de 20 μL. Posteriormente, adicionamos 12,4 μL de água nuclease-free, 4 μL de 10x *RT buffer*, 1,6 μL de 25x dNTP mix (100 mM), 4 μL de 10x *RT random primers*, 2 μL *MustiScribe™ Reverse Transcriptase*, exatamente nessa ordem. O volume final da reação foi de 40 μL. Incubamos as reações a 25 °C por 20 minutos, em seguida a 37 °C por 120 minutos e finalizamos aquecendo a 85°C por cinco minutos. Após essas etapas, as amostras foram armazenadas a -20 °C.

2.4.3. RT-qPCR

Desenhamos os iniciadores específicos necessários (Tabela 2) para as reações de amplificação. Para o desenho dos *primers*, levamos em consideração características como temperatura de fusão (temperatura de *melting*), a formação de dímeros (*self-dimers* e *cross-*

dimers) e a formação de estruturas secundárias, analisando-os no software *PrimerQuest Tool* (<https://www.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>).

As reações de amplificação qPCR tiveram o volume final de 20 μ L. Utilizamos 2 μ L de cDNA puro, 0,4 μ L de cada iniciador (10 pmol) 10 μ L *GoTaq[®] qPCR Master Mix* (Promega), 0,18 μ L *CXR Reference Dye* e completamos com 7,02 μ L de água nuclease-free ao volume final. A amplificação ocorreu em termociclador *7300 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems[®]). Programamos a amplificação com 50 °C por dois minutos, 95 °C por dez minutos e 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e um minuto a 60 °C. Todas as reações foram realizadas em triplicatas técnicas e triplicatas biológicas, com controle sem amostra e sem transcriptase reversa para cada gene analisado, utilizando os iniciadores desenhados.

2.4.4. Análise de dados da expressão gênica

Os dados obtidos foram analisados pelo método da quantificação relativa, caracterizada pela quantificação do gene de interesse em relação aos transcritos de outro gene denominado gene normalizador, com expressão constante (igual a 1). Escolhemos os genes PP2A e EIF4 α como normalizador (REDDY et al., 2016). O cálculo da expressão relativa do gene normalizador seguiu as recomendações segundo Pfaffl & Hageleit (2001) em que a razão da expressão relativa dos genes alvo é calculada baseada na sua eficiência e na diferença de *Ct* (ΔC_t - *threshold cycle*) entre tratamento e controle. A eficiência é calculada baseada no *slope* dado pela curva padrão de diluições de cada gene (v:v) (1, 1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵), tanto para o gene alvo como para os genes normalizadores na PCR tempo real. As análises da expressão gênica foram realizadas junto ao Instituto de Biotecnologia, Unesp (IBTEC).

2.5. Imunoprecipitação da cromatina

As amostras radiculares foram cortadas em pequenos pedaços, os quais foram lavados duas vezes com água deionizada e o excesso de água foi removido com auxílio de papel toalha autoclavado. Em seguida as amostras foram transferidas para tubos de 50 mL para a etapa de “*crosslinking*” do processo de imunoprecipitação da cromatina. Esta etapa foi realizada conforme descrito por Gendrel et al., (2005) onde os tubos foram preenchidos com 37 mL de formaldeído a 1%, com a adição de pedaços de gaze na superfície do líquido para evitar que as amostras flutuassem.

As amostras foram submetidas à infiltração em formaldeído a vácuo por dez minutos. Posteriormente, adicionamos 2,5 mL de glicina a 2 M, misturando o conteúdo com cuidado, seguido por mais cinco minutos de infiltração à vácuo. No final, as amostras foram lavadas

duas vezes com água deionizada e o excesso de água foi removido com papel toalha para então serem armazenadas a -80 °C.

Para realizar a imunoprecipitação da cromatina utilizamos o kit ChIP Kit - Plants (ABCAM) seguindo a recomendação do fabricante com algumas modificações, como a redução da quantidade de amostra de 1 g para 500 mg e a redução do volume dos reagentes em duas vezes até a etapa de sonicação. Na etapa de sonicação, utilizamos o sonicador Branson 250 utilizando dois ciclos de cinco segundos com intervalos de um minuto com as amostras permanecendo no gelo para evitar aquecimento. Avaliamos a eficiência da sonicação por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, onde foi verificado fragmentos de DNA entre 200 – 1000 pares de bases, conforme descrito no protocolo do fabricante.

Para quantificar a ocorrência trimetilação na lisina localizada na posição 4 da porção amino-terminal da histona H3 (H3K4me3), utilizamos o anticorpo *Anti-Histone H3 (tri methyl K4) - ChIP Grade* (ab8580) (ABCAM), conforme descrito por Heimann et al. (2013). Ao final do processo de imunoprecipitação, o DNA foi quantificado por espectrofotometria de absorção (Nanodrop, ND-1000).

O DNA imunoprecipitado e quantificado foi amplificado por *real-time* qPCR no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System® (Applied Biosystems™) nas condições de 95 °C por dez minutos para a desnaturação do DNA, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C para desnaturação e um minuto a 60 °C para o anelamento do DNA (gene *GST*) e um minuto a 65 °C para o anelamento do DNA (gene *SHR*). Para a reação foi utilizado o kit *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega) seguindo as recomendações do fabricante, com volume final de 10 µL. Todas as reações foram realizadas em triplicatas técnicas e triplicatas biológicas, com controle sem DNA para cada gene analisado, utilizando os *primers* desenhados (Tabela 2). Escolhemos os genes *Actin 1* como normalizador segundo descrito em Heimann et al. (2013), como controle positivo para a presença da H3K4me3 em sorgo.

Para o desenho dos *primers*, também levamos em consideração todas as características necessárias, assim como foi feito para expressão gênica, apenas com uma alteração: a região onde esses *primers* foram desenhados. Utilizamos uma região situada 500 pares de bases acima e 500 pares de bases abaixo do sítio de início de transcrição, sendo esta sequência acessada pela base de dados *Phytozome* (phytozome.jgi.doe.gov). Para confirmar a especificidade, tamanho de amplicon e presença de *primer dimers* nos *primers* desenhados, realizamos uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%.

2.6. Análises morfológicas

Foram coletadas amostras a 0,5 cm do ápice radicular de raízes de segunda ordem ($n=4$), seccionadas transversalmente, posteriormente fixadas em FAA 50 (formaldeído, ácido acético, álcool etílico 50%) (JOHANSEN, 1940) por 48 horas e em seguida estocados em álcool 70%. Após isso, foram desidratadas em série etílica e embebidas em resina metacrilato (Leica HistoResin) (GERRITS; HOROBIN, 1991). A seguir, as amostras foram seccionadas em micrótomo rotativo semiautomático e os cortes transversais (4 μm de espessura) corados com Azul de Toluidina 0,05% pH 4,7 (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964). O laminário foi analisado no fotomicroscópio Leica® DMR com câmera acoplada Leica® DFC 425. As análises anatômicas foram realizadas com auxílio do software *LAS V3.8 (Leica Application Suite)* no Laboratório de Pesquisas em Anatomia Vegetal (LaPAV) do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP.

Foram mensurados os seguintes itens: área dos espaços intercelulares, diâmetro da raiz, espessura do córtex, número de camadas celulares do córtex, área ocupada pelo estelo, número de elementos de vaso diferenciados do metaxilema e área do metaxilema.

2.7. Análises das variáveis fisiológicas

2.7.1. Trocas gasosas

As medidas de trocas gasosas foram realizadas utilizando um analisador de gás CO_2 e vapor d'água por radiação infravermelha (*Infra Red Gas Analyser – IRGA and Fluorescence System*, GFS 3000, Walz). As avaliações ocorreram às 3, 5, 7, 9, 30 e 100 horas após aplicação (HAA) (9:00, 11:00, 13:00, 15:00 e 11:00 horas, respectivamente, em dias ensolarados) durante os dois ciclos de contato com metil jasmonato, totalizando 11 coletas. As medições foram realizadas na primeira ou segunda folha completamente expandida (quando a primeira não estava completamente expandida) em quatro repetições por tratamento.

Foram medidas a taxa de transpiração (E , $\text{mmol vapor d'água m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), taxa de assimilação de CO_2 (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), e calculada a eficiência do uso da água (EUA , $\mu\text{molCO}_2 \text{ mmol}^{-1}\text{H}_2\text{O}$).

2.7.2. Fluorescência da clorofila *a*

Para as medidas da fluorescência da clorofila *a*, também foi utilizado fluorômetro (intensidade luminosa de 1500 DFFF) acoplado ao medidor de trocas gasosas, portanto os horários e quantidade de avaliações foram as mesmas das trocas gasosas. Analisamos taxa de transporte de elétrons [$\text{ETR} = \Delta F/F_m \times \text{DFFF} \times 0,5 \times 0,84$], *quenching* fotoquímico [$qP = (F_M - F_s)/(F_M - F_0)$], F_M (fluorescência máxima de folha adaptada à luz), F_0 (fluorescência basal de

folhas adaptadas à luz) e rendimento quântico efetivo do PSII [$\Phi_{PSII} = F_M - F_s / F_M$] (MAXWELL; JOHNSON, 2000).

2.8. Obtenção dos dados e análise estatística

Os dados foram obtidos a partir de quatro repetições biológicas e após serem submetidos aos testes de normalidade e igualdade de variância, foram analisados estatisticamente por meio da análise de variância (ANOVA *one way*). Foram comparadas as médias das plantas que receberam o tratamento, plantas vizinhas e os controles. Quando as médias apresentavam diferença estatística, foram comparadas através do teste de Tukey, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1. Trocas gasosas

Observamos menor taxa de assimilação líquida de CO_2 (A) nas plantas do grupo MeJa (M) em relação ao controle (C). Essa redução foi observada 5, 7 e 100 horas após aplicação (HAA) no primeiro contato com metil jasmonato. No segundo contato, não houve diferença entre M e C (tabela 3). Também observamos aumento da assimilação de CO_2 das plantas do grupo M no segundo contato em relação ao primeiro contato às 5 e 7 HAA (figura 5). No grupo MeJa vizinho (MV), a taxa de assimilação de CO_2 diferiu do controle vizinho (CV) às 7 e 100 HAA no primeiro contato e às 9 HAA no segundo contato com metil jasmonato (tabela 4). Às 5 e 7 HAA no primeiro contato e 5 HAA no segundo contato, também observamos diferença do tratamento MeJa vizinho (MV) em relação ao MeJa (M) (tabela 5).

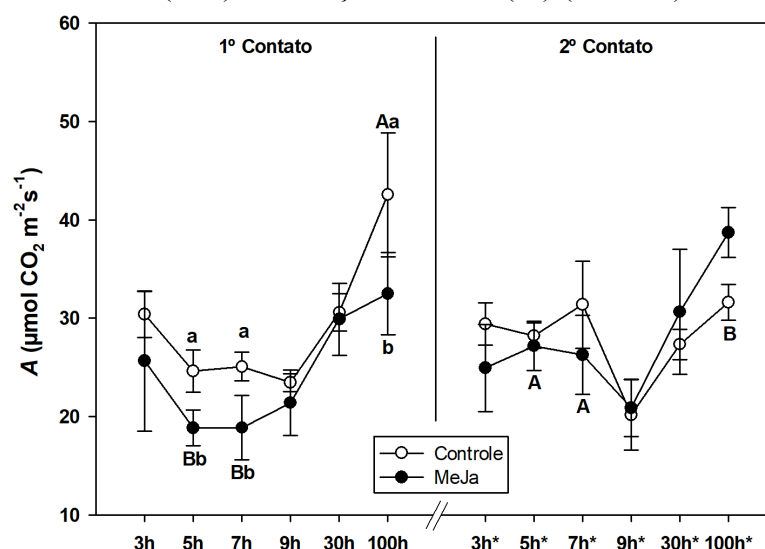


Figura 5 - Taxa de assimilação de CO_2 (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) referente ao primeiro e segundo contato com metil jasmonato. A aplicação do metil jasmonato ocorreu às 6h da manhã (0 HAA). Os resultados da análise de variância (ANOVA *one way*), seguido pelo teste Tukey com nível de significância de 5% ($P < 0,05$). Letras minúsculas indicam diferença entre MeJa e controle no respectivo contato, letras maiúsculas indicam diferença entre o primeiro e segundo contato.

A condutância estomática (g_s) foi reduzida pela contato com metil jasmonato, apresentando diferenças nas plantas do grupo MeJa (M) em relação ao controle (C) às 3, 5 e 7 HAA no primeiro contato (tabela 3). Após o segundo contato com metil jasmonato, não observamos diferença na condutância estomática logo nas primeiras horas, contudo às 30 HAA, foi observada maior condutância das plantas do grupo MeJa (M) em relação ao controle (C) (tabela 3). Pudemos observar maior condutância do grupo M às 5 e 30 HAA no segundo contato em relação ao mesmo período no primeiro contato com metil jasmonato (figura 6). As plantas do grupo MeJa vizinho (MV) apresentaram aumento desse parâmetro às 7 e 30 HAA no primeiro contato e 7 HAA no segundo contato com metil jasmonato, em relação ao controle vizinho (CV) e redução de MV em relação à CV às 3 e 9 HAA no segundo contato (tabela 4). Às 5 e 30 HAA no primeiro e 5 e 7 HAA no segundo contato, observamos maior condutância estomática das plantas do grupo MeJa vizinho (MV) em relação ao grupo MeJa (M). A condutância do M só foi maior em relação ao MV às 100 HAA no primeiro contato (tabela 5).

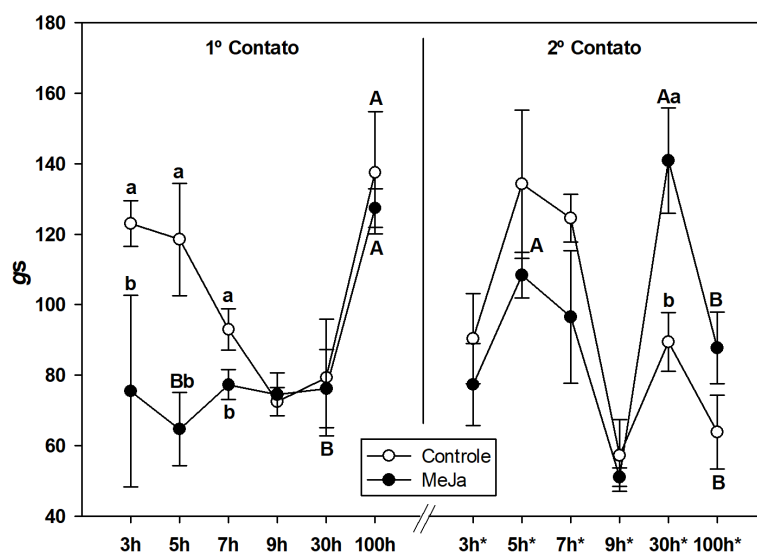


Figura 6 - Condutância estomática (g_s , $\text{mmol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) referente ao primeiro e segundo contato com metil jasmonato. A aplicação do metil jasmonato ocorreu às 6h da manhã (0 HAA). Os resultados da análise de variância (ANOVA *one way*), seguido pelo teste Tukey com nível de significância de 5% ($P < 0,05$). Letras minúsculas indicam diferença entre MeJa e controle no respectivo contato, letras maiúsculas indicam diferença entre o primeiro e segundo contato.

A taxa de transpiração (E) das plantas do grupo MeJa (M) diferiu do controle após 3 e 100 HAA no primeiro contato com metil jasmonato (tabela 3). No segundo contato, a taxa de transpiração foi menor nas plantas do grupo MeJa (M) após 3 e 5 e maior após 30 HAA (tabela 3). Nas plantas do grupo MeJa vizinho (MV) observamos menor transpiração em relação ao controle vizinho (CV) em 30 HAA no primeiro contato e 9 HAA o segundo contato com metil jasmonato (tabela 4). Também pudemos observar maior taxa de transpiração de MV em relação a M às 5 HAA e redução de MV em relação a M às 100 HAA no primeiro contato (tabela 5).

A taxa de eficiência do uso da água (*EUA*) foi maior no grupo MeJa (M) em 3, 5 e 30 HAA, e menor após 7 HAA, durante o primeiro contato com o regulador vegetal. No segundo contato não observamos diferença alguma na *EUA* (tabela 3). As plantas do grupo MeJa vizinho (MV) apresentaram maior *EUA* às 5 HAA e menor *EUA* às 7, 30 e 100 HAA, após o primeiro contato com metil jasmonato (figura 7). No segundo contato com o elicitor, observamos aumento da *EUA* às 5 HAA (tabela 4). Observamos maior *EUA* no grupo MeJa (M) em relação ao MeJa vizinho (MV) às 3, 7 e 30 HAA no primeiro contato e redução de M em relação a MV às 7 e 100 HAA no segundo contato (tabela 5).

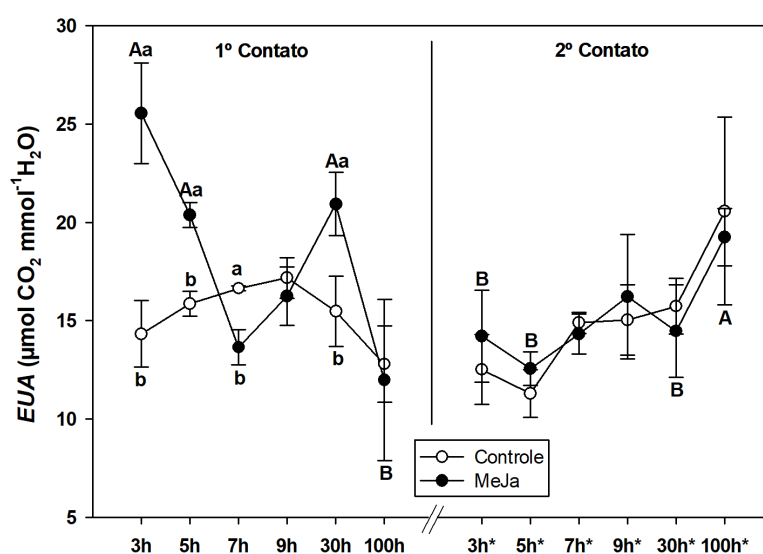


Figura 7 - Eficiência do uso da água (*EUA*, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1}\text{H}_2\text{O}$) referente ao primeiro e segundo contato com metil jasmonato. A aplicação do metil jasmonato ocorreu às 6h da manhã (0 HAA). Os resultados da análise de variância (ANOVA *one way*), seguido pelo teste Tukey com nível de significância de 5% ($P < 0,05$). Letras minúsculas indicam diferença entre MeJa e controle no respectivo contato, letras maiúsculas indicam diferença entre o primeiro e segundo contato.

3.2. Etapa fotoquímica

A taxa de transporte de elétrons (*ETR*) das plantas do grupo MeJa (M) apresentou diferença em relação ao controle (C) apenas às 7 HAA no primeiro contato. No segundo contato, observamos redução dessa taxa às 3 e 7 HAA de M em relação a C, e um aumento às 100 HAA (tabela 3). Também observamos maior *ETR* nas plantas do grupo MeJa (M) na primeira em relação a segunda aplicação às 3, 5, 7 e 9 HAA (figura 8 A). Nas plantas vizinhas, observamos redução de MV em relação a CV às 100 e 9 HAA após o primeiro e segundo contato com o regulador, respectivamente (tabela 4). Não observamos diferença da *ETR* entre M e MV.

Não foi observada alteração das plantas do grupo MeJa (M) em relação ao grupo controle (C) na fluorescência máxima (F_M), fluorescência basal (F_0), dissipação fotoquímica (qP) e

rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}) (tabela 3). Contudo observamos aumento da F_M nas plantas MeJa vizinho (MV) em relação ao controle vizinho (CV) às 9 e 30 HAA durante o primeiro contato, e às 5, 7, e 9 HAA no segundo contato (figura 8 B e C). Também foi possível observar maior F_M de CV em relação a MV às 3 HAA no primeiro contato e às 100 HAA no segundo contato (tabela 4). Observamos aumento de F_M das plantas do grupo MeJa vizinho (MV) em relação ao MeJa (M) às 5, 7 e 9 HAA no segundo contato de metil jasmonato (figura 8 D) (tabela 5).

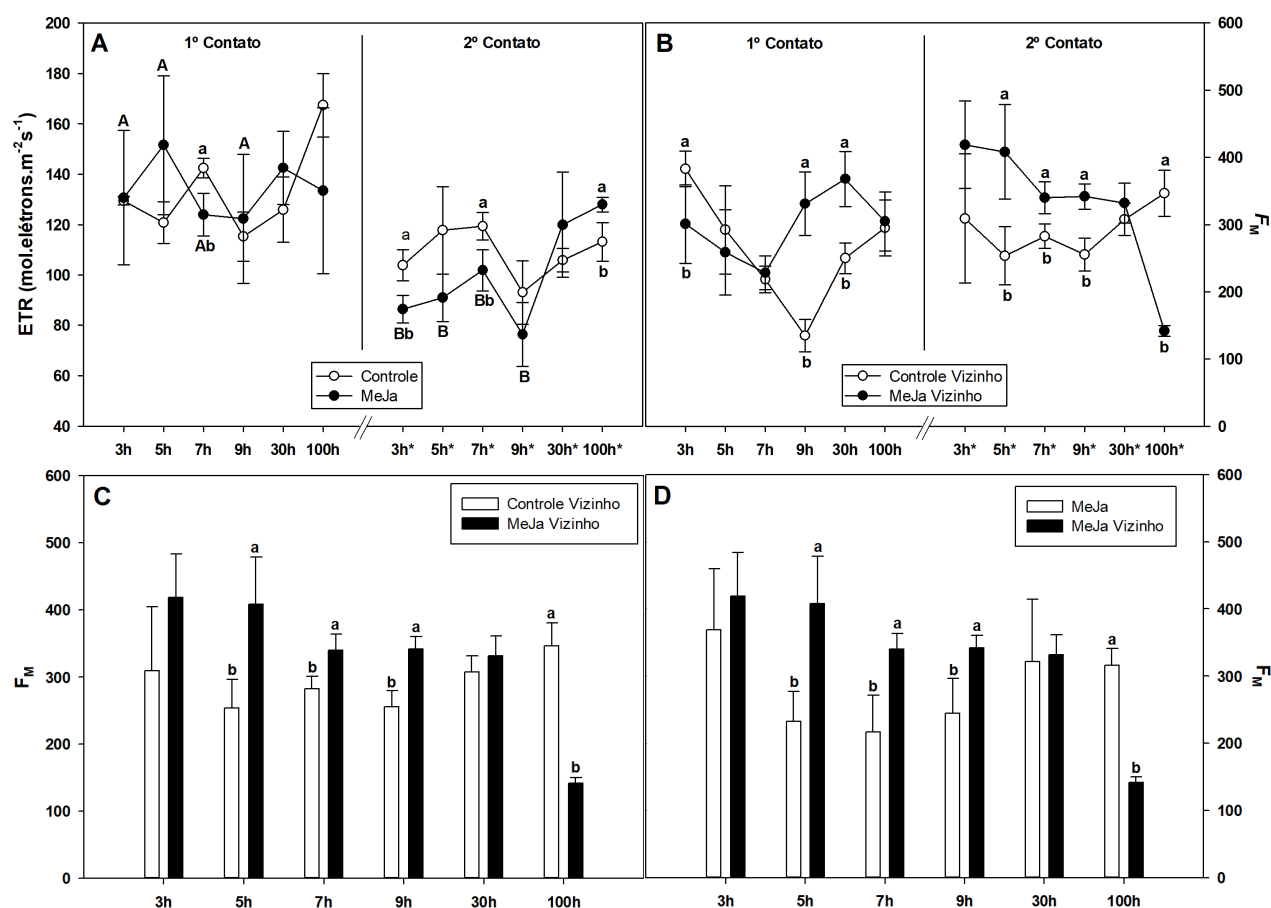


Figura 8 - A) Taxa de transporte de elétrons (ETR, $\mu\text{mol.élétrons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) referente ao primeiro e segundo contato com metil jasmonato dos grupos controle (C) e MeJa (M). **B)** Fluorescência máxima (F_M) referente ao primeiro e segundo contato com metil jasmonato dos grupo controle vizinho (CV) e MeJa vizinho (MV). **C)** F_M referente ao segundo contato com metil jasmonato dos grupos dos grupo controle vizinho (CV) e MeJa vizinho (MV). **D)** F_M referente ao segundo contato com metil jasmonato dos grupos dos grupo MeJa (M) e MeJa vizinho (MV). Letras minúsculas indicam diferença entre os grupos no respectivo contato, letras maiúsculas indicam diferença entre o primeiro e segundo contato no mesmo grupo. Os resultados da análise de variância (ANOVA *one way*), seguido pelo teste Tukey com nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

Quanto a fluorescência basal (F_0), foi possível observar aumento no MeJa vizinho (MV) se compararmos com o CV às 30 HAA no primeiro contato e 3 HAA do segundo contato (tabela 4). Quando comparamos a F_0 entre MeJa (M) e MeJa vizinho (MV), observamos que as plantas

do MV obtiveram maior F_0 às 30 HAA no primeiro contato e 3 HAA no segundo contato (tabela 5).

A dissipação fotoquímica (qP) do grupo MV foi menor em relação ao CV às 100 HAA no primeiro contato e 5 e 7 HAA no segundo contato (tabela 4). As plantas MeJa vizinho (MV) também obtiveram maior dissipação fotoquímica em relação ao grupo MeJa (M) às 100 HAA no segundo contato (tabela 5).

O rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}) foi maior em MV em relação a CV apenas às 100 HAA no primeiro contato (tabela 4). Não observamos diferença entre MeJa (M) e controle (C), e MeJa (M) em relação à MeJa vizinho (MV).

3.3. Análises anatômicas

Quanto aos aspectos anatômicos, as plantas do grupo MeJa vizinho (MV), apresentaram redução na área dos espaços intercelulares, menor diâmetro de raiz e menor área ocupada pelo estelo em relação tanto as plantas do grupo MeJa (M) como em relação ao controle vizinho (CV) (Figura 9). Não foi observada diferença no número de camadas celulares do córtex entre nenhum tratamento, sendo que todas plantas apresentaram entre 7 e 8 células. Contudo, observamos menor espessura do córtex dos grupos C e M em relação aos grupos CV e MV. O mesmo padrão de diferença também foi observado em relação ao número de elementos de vasos diferenciados do metaxilema e área do metaxilema.

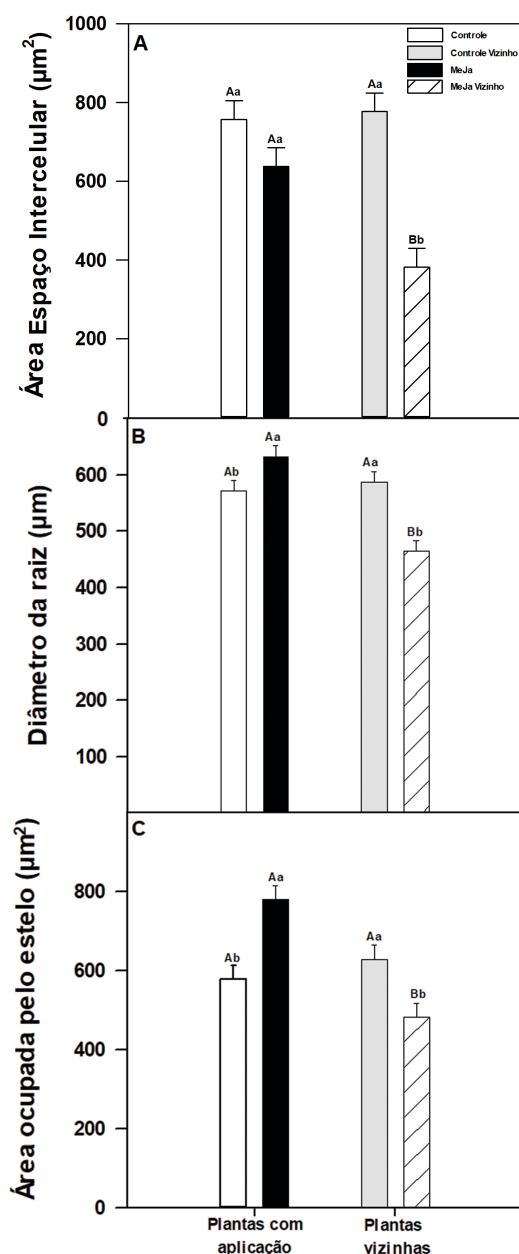


Figura 9 - Aspectos anatômicos de raízes de *Sorghum bicolor* no 18º dia de experimento. **A**, Área do espaço intercelular (µm²). **B**, Diâmetro da raiz (µm). **C**, Área ocupada pelo estelo (µm²). Os resultados da análise de variância (ANOVA *one way*), seguido pelo teste Tukey com nível de significância de 5% ($P < 0,05$). Dados referentes às médias ($n=4$). Letras maiúsculas indicam diferenças entre grupo de plantas com aplicação e plantas vizinhas (MeJa x MeJa Vizinho e Controle x Controle Vizinho). Letras minúsculas indicam diferenças entre mesmo grupo com aplicação ou vizinhas (Controle x MeJa e Controle Vizinho x MeJa Vizinho).

3.4. Expressão dos genes do desenvolvimento radicular

Não observamos diferença estatística na expressão do gene *SHR* (tabela 6) quando comparamos o controle (C) com o controle vizinho (CV) ou MeJa (M). Também não observamos diferença na comparação entre os tratamentos MeJa vizinho (MV) e MeJa (M) ou controle vizinho (CV). Em nenhum dos momentos observamos alguma diferença, tanto as 6, 12 e 200 horas após a aplicação de metil jasmonato tanto no primeiro, como no segundo contato. Todavia, encontramos diferença significativa quando comparamos a expressão do gene *SHR* entre o mesmo tratamento no primeiro e segundo contato. Observamos tendência a menor expressão do tratamento M às 12 HAA no primeiro contato de metil jasmonato em relação ao mesmo período no segundo contato (figura 10). Do mesmo modo, observamos menor expressão

do tratamento MV às 12 HAA no primeiro contato em relação ao mesmo período no segundo contato.

Não realizamos a análise da expressão gênica às 24 HAA tanto no primeiro, como no segundo contato conforme previsto no cronograma inicial. O motivo pelo qual não realizamos a análise, foi a baixa integridade do RNA das amostras (*RIN*), abaixo de 6,5. Esse baixo *RIN* não nos daria segurança para confirmar que a amplificação do cDNA por RT-qPCR estaria realmente relacionado ao gene *SHR*.

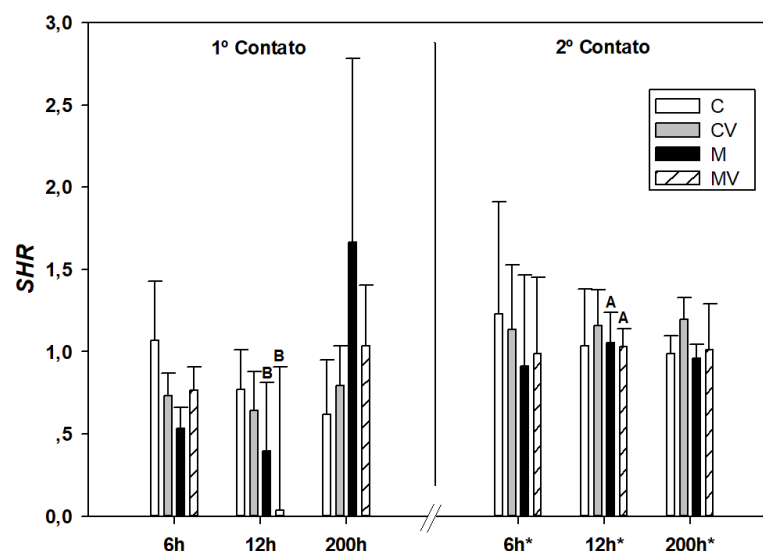


Figura 10 - Log da expressão relativa do gene *SHR*. A aplicação do metil jasmonato ocorreu às 6h da manhã (0 HAA). Os resultados da análise de variância (ANOVA *one way*), seguido pelo teste Tukey com nível de significância de 5% ($P < 0,05$). Letras maiúsculas indicam diferença entre o primeiro e segundo contato.

3.5. Análise epigenética

Após o processo de imunoprecipitação da cromatina, realizamos uma qPCR para analisar a amplificação dos genes de interesse. Para isso, realizamos a amplificação tanto das amostras com DNA imunoprecipitado quanto do controle negativo, ou seja, as mesmas amostras, porém com DNA total, não imunoprecipitado. Ao término da qPCR, pudemos constatar baixa amplificação ou amplificação inexistente das amostras com DNA imunoprecipitado (figura 11 A e C). Contudo, observamos amplificação do DNA não imunoprecipitado das mesmas amostras (figura 11 B e D).

Observamos pequena amplificação do DNA imunoprecipitado do gene *SHR*. Confirmando esse resultado com a mesma temperatura de melting do DNA imunoprecipitado com o DNA não imunoprecipitado (figura 12 A e B). O mesmo não ocorreu com o gene *GST*, pois o observado na curva de melting nos indica a formação de dímeros de *primer* e não da amplificação da sequência esperada (figura 12 C e D).

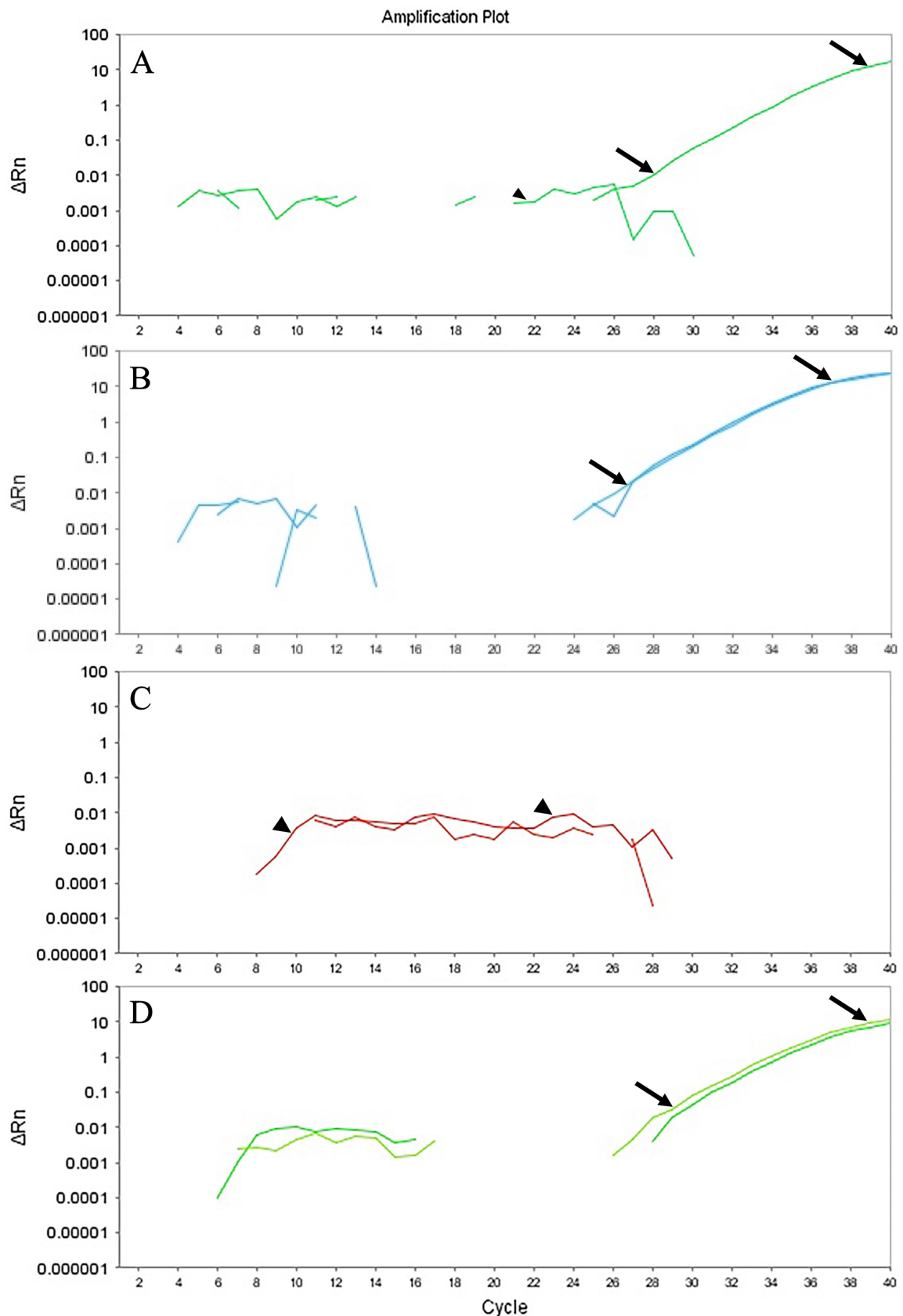


Figura 11 - Curva de amplificação. **A)** Amostras de DNA imunoprecipitado com *primer* do gene *SHR*. **B)** Amostras de DNA não imunoprecipitado com *primer* do gene *SHR*. **C)** Amostras de DNA imunoprecipitado com *primer* do gene *GST*. **D)** Amostras de DNA não imunoprecipitado com *primer* do gene *GST*. Setas indicam início e fim da amplificação de DNA. Pontas de setas indicam produto inespecífico, ou seja, DNA não amplificado ou dímeros de *primer*.

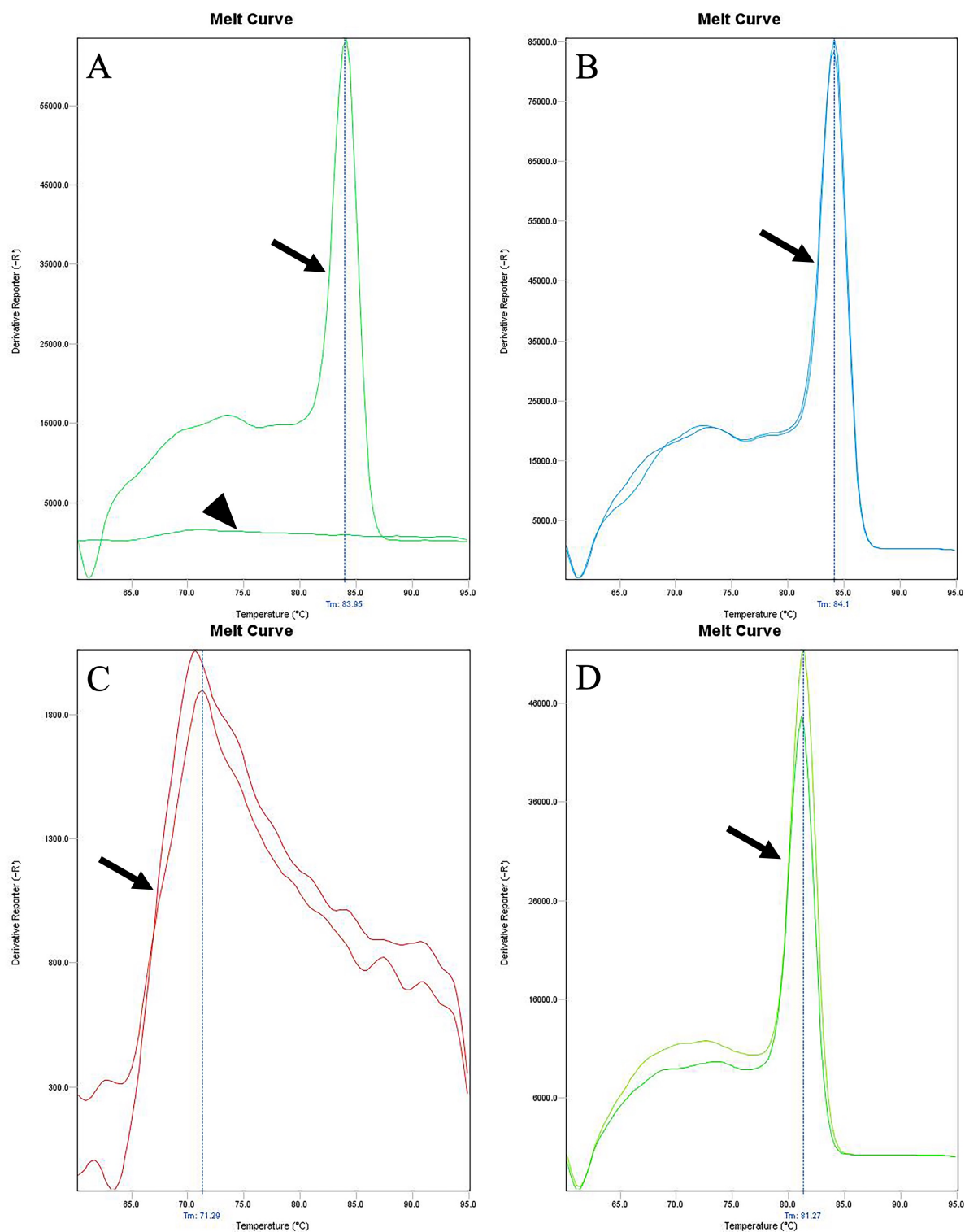


Figura 12 - Curva de melting. **A)** Curva de melting do DNA imunoprecipitado e amplificado do gene SHR. **B)** Curva de melting do DNA não imunoprecipitado e amplificado do gene SHR. **C)** Curva de melting do DNA imunoprecipitado e amplificado do gene GST. **D)** Curva de melting do DNA não imunoprecipitado e amplificado do gene GST. Setas indicam curva de amplificação do DNA. Pontas de seta indica produto inespecífico, ou seja, DNA não amplificado.

4. DISCUSSÃO

Através de avaliações durante e após o primeiro e segundo contato com metil jasmonato, foi possível comparar o efeito do estímulo químico recorrente. Também foi possível avaliar a comunicação entre plantas através da técnica *Split-root*. A comunicação e o possível efeito de memória podem ser discutidos através dos seguintes parâmetros apresentados.

Derivado de um ácido graxo, o metil jasmonato regula o crescimento e desenvolvimento vegetal, sendo liberado após estresse, como ferimentos e doenças (HOWE; MAJOR; KOO, 2018). A ativação de uma cascata de sinalização para a produção de jasmonato (JA) foi o efeito inicial observado após aplicação exógena de metil jasmonato (LIU et al., 2017). Uma hora após aplicação, o nível de JA pode aumentar em até 10 vezes (FAGAN et al., 2015), acarretando a inibição do desenvolvimento vegetal, principalmente da raiz (LIU et al., 2017). Outro efeito do JA é a inibição da fotossíntese, pois inibe a formação e promove a degradação da clorofila e da rubisco, além de estimular o fechamento estomático (RAKWAL; KOMATSU, 2001; ZHANG; XING, 2008).

Estudo realizado por Suhita et al. (2004) em *Arabidopsis*, comprova que a aplicação exógena de metil jasmonato acarretou o fechamento estomático e consequentemente a redução da condutância estomática (g_s). Corroborando esse estudo, observamos a redução de g_s poucas horas após o primeiro contato com o regulador vegetal. A estratégia de fechamento estomático após um evento de estresse desencadeia uma série de alterações fisiológicas, sendo uma delas a diminuição da incorporação de CO_2 no ciclo de Calvin-Benson. A menor incorporação de carbono diminui a taxa de assimilação líquida (A), conforme constado no grupo MeJa (M) logo após o primeiro contato. Outro fator correlacionado à abertura estomática é a transpiração (E), que no tratamento com o regulador vegetal, apresentou taxas menores já na primeira medição após o primeiro contato.

A taxa de transpiração consiste na razão da quantidade de moléculas de carbono incorporada pela planta e na quantidade moléculas de H_2O que a planta consegue trocar com a atmosfera. Esses dois fatores juntos nos indica a eficiência do uso da água ($EUA = A/E$) (LIN et al., 2018). Ao contrário da condutância estomática, assimilação de carbono e transpiração, a EUA do grupo MeJa (M) foi maior em relação ao controle (C) no início do tratamento com o regulador. O sorgo conseguiu manter alta EUA , semelhante demonstrado por Galmé et al. (2007) e Gallé et al. (2007) em outras espécies de planta, pois a menor abertura estomática acarretou na baixa transpiração, ou seja, menor denominador na razão ($EUA = A/E$) e, portanto, uma menor perda d'água para a atmosfera o que consequentemente eleva a EUA .

Conforme citado anteriormente, o metil jasmonato além de interferir na abertura dos estômatos, intervém diretamente na fotossíntese, inibindo a formação da clorofila e ativando enzimas que promovem degradação tanto da clorofila como da rubisco (FAGAN et al., 2015; ZHANG; XING, 2008). Essa interposição pode induzir o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) na planta, ocasionando uma redução na eficiência fotoquímica (RAKWAL; KOMATSU, 2001). O metil jasmonato pode induzir o acúmulo de EROs tanto no cloroplasto como na mitocôndria, atingindo o pico em uma a cinco horas após o contato (ZHANG; XING, 2008). Esse acúmulo de EROs no cloroplasto pode impedir a produção da enzima rubisco, o que consequentemente impede a catalisação da reação da molécula de CO₂ com uma molécula de H₂O e impossibilita a carboxilação no ciclo de Calvin-Benson (SHARMA et al., 2012). Embora o metil jasmonato interfira diretamente na etapa fotoquímica da fotossíntese, não foi observada nenhuma diferença estatística nos valores de ETR, F_M , F_0 , qP e no Φ_{PSII} .

No segundo contato com o regulador, não observamos diferença entre o grupo MeJa e o grupo controle quanto à assimilação de CO₂ (A), condutância estomática (g_s) e eficiência do uso da água (EUA). Porém se comparamos os dados do primeiro contato com metil jasmonato com dados do segundo contato (tabela 3), podemos observar maior assimilação de CO₂ (A) do grupo MeJa no segundo contato com metil jasmonato. Essa mesma diferença entre primeiro e segundo contato também foi observada quanto a condutância estomática e a taxa de transpiração, dando indícios da existência de possível memória, pois em um segundo contato com o elicitor, as plantas do grupo MeJa reestabeleceram seus parâmetros fisiológicos maiores, assemelhando ao grupo controle.

Organismos que possuem a capacidade de armazenar informações sobre experiências prévias, podem comparar e avaliar experiências recentes, reagindo de forma mais rápida ou até melhor do que em situações passadas (WITZANY, 2018). Segundo Okano et al. (2000), a aprendizagem se baseia no processo de aquisição de memória, adquirida a partir de mudanças no comportamento do organismo. Esse aprendizado não pode ser observado diretamente, portanto só podemos detectá-lo através de observações e comparações na alteração de comportamento devido a uma experiência anterior (KAWECKI, 2010).

Walter et al. (2011), denominam esse tipo de memória como “*stress imprint*”, resultado de plasticidade fenotípica de uma espécie que demonstra respostas fisiológicas otimizadas no evento estressante seguinte (CRISP et al., 2016). Tal memória pode estar relacionada a mudanças na conformação da cromatina (MADLUNG; COMAI, 2004) e, essa plasticidade em segundo evento estressante deve-se a alterações epigenéticas, dando o nome de “efeito de memória” (BRUCE et al., 2007).

Testamos tal efeito pela análise da conformação da cromatina, mais precisamente pela trimetilação da lisina da posição 4 da histona H3 (H3K4me3). Essa marca epigenética pode ativar a transcrição de genes relacionados ao estresse ambiental (BIRD, 2007; MADLUNG; COMAI, 2004). No caso do presente estudo, o esperado era que ocorresse a trimetilação após o primeiro contato com o metil jasmonato, permitindo assim, fácil acesso de enzimas de transcrição à região promotora do gene *SHR* e *GST*, consequentemente uma resposta mais rápida e eficiente em um segundo estímulo. Contudo não obtivemos dados comprovando que ocorreu a trimetilação, pois a quantidade de DNA metilado não foi significativa. Porém não podemos descartar que não ocorreu o efeito de memória, porque apesar da quantidade de DNA metilado não ser significativa, ainda assim pudemos constatar a metilação no DNA de alguns indivíduos (figura 11 A).

A razão por observamos a diferença de alguns indivíduos terem metilado seu DNA e outros não é a diferença individual. As plantas não se comportam todas de mesmo modo, mesmo que sejam clones uma das outras. Dentre uma determinada população de clones, pode existir diferença no padrão de aprendizagem de um indivíduo para outro. Miller et al. (2012) demonstraram que o padrão da atividade cerebral de humanos são diferentes entre si quando expostos ao mesmo ambiente ou situação cotidiana. Porém esse padrão pode ser consistente ao longo do tempo, indicando que essas diferenças são devidas a diferenças sistemáticas das características individuais, descartando erro no padrão de coleta de dados. Ainda segundo Miller et al. (2012), a diferença observada no caso de humanos pode ser devida a diferença no estilo cognitivo ou estratégia utilizada pelo indivíduo para se recuperar de um episódio. O mesmo pode ser estabelecido para as plantas. Os indivíduos de sorgo podem ter diferentes estilos senciante ou estratégia distinta para se recuperar do estímulo causado pelo metil jasmonato, ou seja, estratégia distinta para gravar um efeito de memória.

Para ocorrer o efeito de memória, o indivíduo que sofre estresse ambiental, estimula o desencadeamento de uma cascata de sinalização interna (SUHITA et al., 2004), permitindo assim a resposta na planta como um todo. Porém, essa sinalização pode não ficar restrita apenas ao indivíduo, ela também pode ser compartilhada com plantas ou organismos ao redor. Em experimentos realizados em milho (*Zea mays*), Elhakeem et al. (2018) demonstraram que apenas o toque da parte aérea de planta-planta pode desencadear respostas às plantas vizinhas não tocadas, através de comunicação subterrânea. Ainda no mesmo estudo, foi comprovado que a raiz tem a principal capacidade de detectar o estado fisiológico alterado de plantas vizinhas através de sinais químicos liberados por elas, sendo que tal composto químico recebe o nome de exsudato radicular.

Em estudos realizado com feijão (*Phaseolus vulgaris*), Eke et al. (2016) observaram exsudação de flavonoides pode assistir o desenvolvimento de micorrizas. A associação das micorrizas com as raízes da leguminosa são estimuladas em caso de infecções, auxiliando contra ataque de patógenos. Portanto podendo ser entendida pela planta vizinha como sinalização de defesa e causando em redução de parâmetros biológicos. Ao que tudo indica, as plantas do grupo MV receberam uma sinalização ao estímulo sofrido pelo grupo M. Horas após o estímulo, observamos maior assimilação e condutância estomática do tratamento MV em relação ao CV. Segundo Zhang & Xing (2008), o estímulo causado pelo metil jasmonato leva de uma a cinco horas para afetar a etapa fotoquímica da fotossíntese. Logo às 3 horas após a primeira aplicação observamos uma redução de F_M e F_0 de MV em relação a CV, indicando que ao entrar em contato pela primeira vez com o regulador vegetal, as plantas do grupo M podem ter desencadeado um processo de comunicação, resultando na diminuição de parâmetros fotoquímicos, corroborando o estudo de Jacob et al. (2017), em que plantas de ervilha responderam à presença de vizinhos, desencadeando alterações nos padrões fisiológicos e reduzindo o crescimento radicular (tabela 4).

Outra resposta interessante foi o aumento de F_M e F_0 das plantas MV em relação a CV no segundo contato (figura 8 C). Esses dados também nos indicam possível comunicação entre as plantas, pois ao entrar em contato com metil jasmonato, as plantas do tratamento M podem ter emitido sinais para plantas MV, aumentando a F_M e F_0 . De mesmo modo, também observamos possível efeito de memória das plantas, ou seja, em segundo contato com o metil jasmonato, a planta responde de forma mais rápida ao estresse (WALTER et al., 2013), aumentando suas taxas de fluorescência horas após o estímulo, caracterizando em sinalização para a prevenção contra o estímulo do metil jasmonato.

A expressão do gene *SHR* tendeu a seguir o mesmo padrão encontrado nas trocas gasosas, ou seja, maior no segundo contato em relação ao primeiro contato. Doze horas após o segundo contato com metil jasmonato, o valor da expressão relativa do tratamento MV foi maior em relação ao mesmo período no primeiro contato (figura 10). A maior expressão do gene *SHR* em MV no segundo contato ($P=0,013$), nos indica estratégia semelhante às respostas fisiológicas, evidenciando que o tratamento com metil jasmonato induziu a comunicação entre raízes, elevando a expressão do gene *SHR*. Corroborando com o mesmo raciocínio, observamos uma tendência a diferença entre o tratamento M às 12 HAA no segundo contato em relação ao primeiro contato ($P=0,065$). Descrevemos como tendência, pois o valor de P foi ligeiramente acima de 0,05, significando uma tendência a diferença estatística. Quando comparamos todas as seis análises da expressão gênica do tratamento M entre si, não constatamos diferença, porém

o valor de P também tendeu a uma diferença ($P=0,056$), nos indicando que um n amostral maior, talvez nos mostrasse uma diferença.

O aumento da expressão pode estar correlacionado com o maior diâmetro das raízes e da área ocupada pelo estelo do tratamento M, pois a maior expressão do gene *SHR* está diretamente relacionada com o desenvolvimento lateral das células do tecido vascular (HAO et al., 2011), retomada da diferenciação do periciclo e desenvolvimento lateral das raízes (LEVESQUE et al., 2006). Portanto, em contato com o regulador vegetal, a planta reduziu o crescimento radicular, investindo em maturação e crescimento secundário da raiz. Por essa razão, podemos observar menor área de espaço entre as células da raiz nas plantas do tratamento M e MV.

Deste modo, inicialmente plantas que receberam o estímulo apresentaram queda nos parâmetros fisiológicos em resposta ao metil jasmonato, contudo no segundo estímulo, essa resposta não diferiu do grupo controle indicando possível efeito de memória. Também observamos que plantas que receberam o metil jasmonato podem ter sinalizado através de suas raízes informações sobre o estímulo. Essa sinalização acarretou inicialmente a alteração dos padrões fisiológicos como condutância estomática, assimilação de carbono e etapas da fase fotoquímica da fotossíntese. No segundo contato, observamos que as plantas MV tiveram efeito de memória concomitante com efeito da comunicação, proporcionando uma maior taxa de A , g_s , F_M e F_0 de MV em relação a M. Esses dados corroboram em parte com duas de nossas hipóteses, pois o metil jasmonato induziu a comunicação entre plantas e a sinalização produzidas por plantas em contato com metil jasmonato, alteraram os padrões fisiológicos e expressão gênica de plantas vizinhas. Portanto, temos elementos biológicos, para afirmar que a comunicação entre plantas pode levar a manutenção de processos fisiológicos em resposta a alterações ambientais, antecipando respostas e elevando as chances de tolerar um possível futuro evento de estresse.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo investigou respostas moleculares, fisiológicas e anatômicas de *Sorghum bicolor* diante duas aplicação de metil jasmonato. Além de testar o efeito de memória entre dois estímulos e a ocorrência da comunicação entre plantas.

Destacamos a dificuldade de trabalhar com RNA, pois pela sua alta instabilidade, optamos por não realizarmos análises de comprimento de raiz, para o congelamento da amostra biológica o mais rápido possível. Mesmo assim, não conseguimos uma boa qualidade de RNA em duas das oito coletas de material biológico para a expressão gênica. Portanto, infelizmente não tivemos outra opção a não ser descartar essas duas coletas.

Outra dificuldade enfrentada foi a análise da marca epigenética. Poucos dados constam na literatura para análises de metilação em raiz. Portanto, diversas vezes alteramos protocolos encontrados, tentando adequar ao material que estávamos trabalhando. Acreditamos que o resultado impreciso da epigenética e baixa diferença na expressão gênica não foi resultado de falta de dados na literatura, pois esse foi estabelecido e registrado para futuros experimentos, e sim por um baixo estresse causado pelo metil jasmonato na planta.

Apesar dos resultados negativos, esperamos ter sanado algumas lacunas sobre o conhecimento da comunicação vegetal. Sendo assim, muito trabalho ainda precisa ser feito para que possamos explicar como ocorre esse processo de memória nas plantas.

6. TABELAS

Tabela 1 - RIN (*RNA integrity number*) obtidos a partir de eletroferograma.

Amostra	RIN	Amostra	RIN	Amostra	RIN	Amostra	RIN	Amostra	RIN	Amostra	RIN
6h - 1° contato	7 8,40	12h - 1° contato	1 8,40	200h - 1° contato	3 7,80	6h - 2° contato	53 7,80	12h - 2° contato	45 8,70	200h - 2° contato	69 7,50
	8 8,00		2 6,70		4 8,90		54 7,20		46 8,60		70 7,10
	13 8,30		17 8,50		11 8,50		93 8,00		65 8,40		81 8,10
	14 8,70		18 8,20		12 8,40		94 8,20		66 8,20		82 6,80
	19 8,30		23 7,80		77 8,40		119 7,20		89 8,70		97 6,50
	20 8,40		24 8,10		78 8,20		120 8,40		90 8,50		98 7,70
	67 7,50		71 8,50		85 8,40		123 8,10		113 8,50		109 6,50
	68 8,20		72 8,60		86 8,40		124 7,80		114 8,70		110 7,50
	83 7,90		75 6,80		99 8,20		127 6,90		115 8,30		121 7,80
	84 7,40		76 8,20		100 7,50		128 8,40		116 8,40		122 6,20
91 8,50		171 8,10		105 8,50		177 7,40		175 8,40		161 6,90	
92 7,40		172 8,00		106 7,20		178 7,20		176 8,50		162 6,50	

Tabela 2 - Iniciadores específicos utilizados na avaliação quantitativa da expressão gênica via RT- qPCR e na avaliação da metilação de histonas via qPCR.

Iniciador	Gene	Sequência 5' - 3'	Amplicon	Acesso
<i>SHR FW</i> <i>SHR RV</i>	<i>Short Root</i>	AGCCACAGTTGTTCTAATCC CCATCTCCACCTCATTC	137	XM_021452376.1
<i>SHR FW</i> <i>SHR RV</i>	<i>Short Root</i>	TGCCATTAAAAACCCCTTC CCAACCTAAACAGCGTATCCA	110	XM_021452376.1
<i>GST FW</i> <i>GST RV</i>	<i>Glutathione S- Transferase TAU8</i>	GAGTTTGGGTCCGAAGTT GACAGGAGCAGTGATGAAT	128	XM_002459056.2
<i>GST FW</i> <i>GST RV</i>	<i>Glutathione S- Transferase TAU8</i>	CGAAGTTCGGACTTGAAGAA ATCTCCTCTGATCTTCTACCTC	183	XM_002459056.2
<i>PP2AFW</i> <i>PP2A RV</i>	<i>Serine/threonine- Protein Phosphatase</i>	CCGCAAAACCCCAGACTACT CGAGAAAGCAGCAACAAAATC	180	XM_002453490.2
<i>EIF4α FW</i> <i>EIF4α RV</i>	<i>Eukaryotic Initiation Factor 4α</i>	ATGAGCGGATGCTGTTTGAC GAATAGAACCCGACCTTACCACT	199	XM_002451491.2
<i>ACT FW</i> <i>ACT RV</i>	<i>Actin 1</i>	GTGCTATTCCAGCCATCCTTCATTGG GCGGTCAGCAATACCAGGGAAC	159	XM_002456645.2

Tabela 3 - Média ($n=4$) dos dados de assimilação de CO_2 (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mmol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$), taxa de transpiração (E , $\text{mmol vapor d'água m}^{-2}\text{s}^{-1}$), eficiência do uso da água (EUA , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1}\text{H}_2\text{O}$), taxa de transporte de elétrons (ETR , $\mu\text{mol.elétrons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$), fluorescência máxima (F_M), fluorescência basal (F_0), dissipação fotoquímica (qP) e rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}), referente à primeira avaliação às 9 horas da manhã, antes da aplicação do aleloquímico (0h). CV: controle vizinha; MV: MeJa vizinho. Os resultados da análise de variância (ANOVA *one way*). Seguido pelo teste Tukey com nível de significância de 5% ($P<0,05$). Letras minúsculas indicam diferença entre MeJa e controle no respectivo contato, letras maiúsculas indicam diferença entre o primeiro e segundo contato.

	HAA	<i>A</i>	<i>g_s</i>	<i>E</i>	<i>EUA</i>	ETR	<i>F_M</i>	<i>F₀</i>	qP	Φ _{PSII}	
1° Contato	3h	C	30,39 ± 2,35	123,02 ^a ± 6,45	1,98 ^a ± 0,27	14,32 ^b ± 1,69	129,43 ± 1,66	336,75 ± 16,36	131,00 ± 10,00	0,32 ± 0,02	0,21 ± 0,01
		M	25,64 ± 7,13	75,44 ^b ± 27,21	0,93 ^b ± 0,42	25,54 ^{Aa} ± 2,56	130,67 ^A ± 26,70	308,94 ± 72,34	122,75 ± 20,55	0,34 ^A ± 0,05	0,21 ^A ± 0,04
	5h	C	24,60 ^a ± 2,16	118,52 ^a ± 15,99	1,60 ^B ± 0,08	15,86 ^b ± 0,63	120,79 ± 8,32	245,50 ± 20,68	134,25 ± 23,04	0,32 ± 0,03	0,19 ± 0,01
		M	18,82 ^{Bb} ± 1,81	64,65 ^{Bb} ± 10,35	1,23 ^B ± 0,21	20,38 ^{Aa} ± 2,91	151,59 ^A ± 27,54	213,25 ± 93,11	109,25 ± 35,40	0,38 ± 0,01	0,21 ± 0,08
	7h	C	25,07 ^a ± 1,44	92,94 ^a ± 5,88	1,52 ± 0,25	16,65 ^a ± 0,12	142,45 ^a ± 3,89	258,25 ± 65,96	104,25 ± 14,93	0,35 ± 0,01	0,22 ± 0,02
		M	18,84 ^{Bb} ± 3,27	79,12 ^b ± 4,24	1,58 ± 0,15	13,64 ^b ± 0,90	124,04 ^{Ab} ± 8,46	225,00 ± 84,06	104,56 ^B ± 14,31	0,36 ± 0,06	0,20 ^A ± 0,01
	9h	C	23,44 ± 0,92	72,37 ± 3,99	1,33 ± 0,11	17,18 ± 1,03	115,27 ± 9,83	264,50 ± 42,34	111,10 ± 7,34	0,28 ± 0,03	0,17 ± 0,03
		M	21,38 ± 3,33	74,48 ± 6,09	1,32 ± 0,19	16,25 ± 1,50	122,31 ^A ± 25,67	291,50 ± 37,21	120,00 ± 12,44	0,33 ± 0,08	0,19 ^A ± 0,04
	30h	C	30,59 ± 1,90	79,30 ± 16,65	1,77 ± 0,53	15,47 ^b ± 1,80	125,94 ± 12,98	224,75 ± 82,48	111,00 ± 19,97	0,32 ± 0,04	0,20 ± 0,02
		M	29,87 ± 3,67	76,13 ^B ± 11,07	1,47 ^B ± 0,28	20,93 ^{Aa} ± 1,61	142,53 ± 14,58	277,25 ± 72,05	115,25 ^B ± 9,29	0,41 ± 0,08	0,23 ± 0,02
	100h	C	42,55 ^{Aa} ± 6,27	137,45 ^A ± 17,38	2,61 ^b ± 0,24	12,79 ± 1,95	167,40 ± 12,58	253,75 ± 45,93	128,00 ± 21,73	0,47 ± 0,01	0,27 ± 0,02
		M	32,47 ^b ± 4,19	127,43 ^A ± 5,47	3,39 ^{Aa} ± 0,39	11,97 ^B ± 4,10	133,51 ± 33,01	261,50 ± 86,13	145,25 ± 23,99	0,43 ^A ± 0,07	0,24 ± 0,06
2° Contato	3h	C	29,39 ± 2,14	90,34 ± 12,86	2,16 ^a ± 0,16	12,51 ± 1,77	103,78 ^a ± 6,20	351,00 ± 18,89	138,00 ± 8,64	0,28 ± 0,02	0,17 ± 0,01
		M	24,92 ± 4,44	77,27 ± 11,63	1,33 ^b ± 0,16	14,21 ^B ± 2,33	86,35 ^{Bb} ± 5,46	369,25 ± 90,25	134,75 ± 15,65	0,23 ^B ± 0,02	0,14 ^B ± 0,01
	5h	C	28,22 ± 1,31	134,28 ± 21,03	2,635 ^{Aa} ± 0,26	11,28 ± 1,21	117,75 ± 17,34	231,75 ± 37,76	122,25 ± 18,19	0,40 ± 0,07	0,17 ± 0,02
		M	27,16 ^A ± 2,51	108,42 ^A ± 6,48	2,13 ^{Ab} ± 0,22	12,56 ^B ± 0,85	90,90 ^B ± 9,42	232,75 ± 44,14	141,75 ± 10,72	0,40 ± 0,04	0,15 ± 0,03
	7h	C	31,36 ± 4,45	124,59 ± 6,75	1,85 ± 0,24	14,88 ± 0,54	119,411 ^a ± 5,46	293,25 ± 47,39	142,00 ± 3,27	0,38 ± 0,32	0,18 ± 0,01
		M	26,28 ^A ± 4,01	90,08 ± 18,85	1,90 ± 0,16	14,32 ± 1,02	101,86 ^{Bb} ± 8,18	216,25 ± 55,49	144,75 ^A ± 25,05	0,37 ± 0,03	0,16 ^B ± 0,02
	9h	C	20,17 ± 3,59	57,17 ± 10,10	1,28 ± 0,24	15,04 ± 1,80	93,03 ± 12,55	225,75 ± 47,67	137,75 ± 14,89	0,33 ± 0,04	0,13 ± 0,01
		M	20,84 ± 2,89	51,02 ± 2,69	1,14 ± 0,06	16,22 ± 3,17	76,31 ^B ± 12,74	244,25 ± 51,82	140,19 ± 13,40	0,24 ± 0,04	0,12 ^B ± 0,02
	30h	C	27,33 ± 1,54	89,41 ^b ± 8,30	1,95 ^b ± 0,29	15,73 ± 1,43	105,85 ± 4,62	276,25 ± 18,73	142,00 ± 8,64	0,31 ± 0,02	0,17 ± 0,01
		M	30,64 ± 6,36	140,94 ^{Aa} ± 14,93	2,77 ^{Aa} ± 0,30	14,47 ^B ± 2,37	119,94 ± 20,86	321,50 ± 92,82	147,75 ^A ± 15,63	0,35 ± 0,04	0,19 ± 0,03
	100h	C	31,61 ^B ± 1,83	63,76 ^B ± 10,50	1,08 ± 0,26	20,57 ± 4,780	113,18 ^b ± 7,65	291,75 ± 25,17	141,75 ± 16,17	0,34 ± 0,04	0,18 ± 0,01
		M	38,73 ± 2,54	87,68 ^B ± 10,19	1,69 ^B ± 0,32	19,25 ^A ± 1,45	127,96 ^a ± 2,95	316,00 ± 12,49	141,00 ± 3,83	0,38 ^B ± 0,02	0,20 ± 0,00

Tabela 4 - Média ($n=4$) dos dados de assimilação de CO_2 (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mmol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$), taxa de transpiração (E , $\text{mmol vapor d'água m}^{-2}\text{s}^{-1}$), eficiência do uso da água (EUA , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1}\text{H}_2\text{O}$), taxa de transporte de elétrons (ETR , $\mu\text{mol.elétrons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$), fluorescência máxima (F_M), fluorescência basal (F_0), dissipação fotoquímica (qP) e rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}), referente à primeira avaliação às 9 horas da manhã, antes da aplicação do aleloquímico (0h). CV: controle vizinha; MV: MeJa vizinho. Os resultados da análise de variância (ANOVA *one way*). Seguido pelo teste Tukey com nível de significância de 5% ($P<0,05$). Letras minúsculas indicam diferença entre MeJa e controle no respectivo contato.

	HAA		<i>A</i>	<i>g_s</i>	<i>E</i>	<i>EUA</i>	ETR	<i>F_M</i>	<i>F₀</i>	qP	Φ _{PSII}
1° Contato	3h	CV	30,21 ^A ± 1,13	89,35 ± 19,16	2,04 ± 0,70	20,49 ± 6,06	134,38 ± 9,43	383,00 ^a ± 26,61	146,25 ^a ± 7,93	0,36 ± 0,05	0,21 ± 0,01
		MV	29,46 ± 5,73	113,53 ^A ± 36,93	1,73 ± 0,73	16,52 ± 4,55	130,02 ^A ± 19,39	301,00 ^{Bb} ± 58,52	108,00 ^{Bb} ± 14,79	0,35 ± 0,06	0,21 ± 0,03
	5h	CV	28,62 ± 2,52	113,42 ^B ± 14,76	1,99 ± 0,30	13,64 ^b ± 0,32	136,18 ± 14,22	292,25 ± 65,74	136,00 ± 32,74	0,35 ± 0,04	0,22 ± 0,02
		MV	29,73 ± 4,32	106,31 ^B ± 11,66	1,69 ± 0,12	18,75 ^{Aa} ± 1,31	120,93 ± 20,11	258,75 ^B ± 63,37	123,00 ± 35,04	0,35 ± 0,06	0,19 ± 0,03
	7h	CV	19,40 ^{Bb} ± 1,96	70,12 ^b ± 13,42	1,89 ± 0,75	17,43 ^a ± 3,02	116,82 ± 9,29	218,25 ± 20,02	120,00 ± 20,00	0,35 ± 0,03	0,19 ± 0,01
		MV	25,06 ^{Ba} ± 3,42	97,75 ^a ± 17,76	1,97 ± 0,40	12,06 ^{Bb} ± 0,79	116,47 ^A ± 6,23	228,00 ^B ± 25,03	116,00 ± 33,67	0,34 ± 0,03	0,18 ^A ± 0,01
	9h	CV	22,29 ± 3,73	78,26 ± 5,73	1,54 ± 0,17	13,20 ± 1,64	108,10 ± 9,83	134,75 ^b ± 23,94	134,75 ± 23,94	0,28 ± 0,03	0,17 ± 0,02
		MV	23,84 ^A ± 2,12	81,82 ^A ± 6,55	1,34 ^A ± 0,42	15,13 ± 2,96	130,75 ^A ± 22,66	331,00 ^a ± 47,38	127,00 ± 19,70	0,35 ^A ± 0,07	0,21 ^A ± 0,04
	30h	CV	29,21 ± 6,39	110,68 ^b ± 9,27	2,60 ^a ± 0,49	25,63 ^a ± 6,64	144,69 ± 15,99	249,75 ^b ± 22,57	115,50 ^b ± 11,24	0,39 ^b ± 0,05	0,20 ± 0,03
		MV	27,21 ± 4,77	140,70 ^a ± 15,91	1,39 ^b ± 0,39	17,24 ^b ± 1,70	160,20 ^A ± 14,80	368,00 ^a ± 41,04	141,00 ^a ± 15,12	0,41 ^a ± 0,08	0,23 ± 0,02
	100h	CV	31,29 ^b ± 4,44	93,43 ± 8,31	2,50 ± 0,32	15,28 ^a ± 1,74	168,24 ^a ± 5,39	295,00 ± 41,72	125,25 ± 12,69	0,46 ^a ± 0,02	0,27 ^a ± 0,01
		MV	38,72 ^a ± 1,90	104,96 ± 16,25	2,04 ± 0,38	11,15 ^{Bb} ± 0,57	107,31 ^b ± 22,20	304,75 ^A ± 43,83	126,00 ^B ± 8,00	0,35 ^b ± 0,04	0,21 ^b ± 0,02
2° Contato	3h	CV	25,13 ^B ± 1,77	87,97 ^a ± 7,89	1,62 ± 0,34	16,13 ± 3,10	101,71 ± 8,99	309,00 ± 96,09	128,00 ^b ± 17,74	0,31 ± 0,05	0,18 ± 0,03
		MV	25,32 ± 3,38	63,07 ^{Bb} ± 6,02	1,28 ± 0,52	19,77 ± 9,56	85,44 ^B ± 15,12	418,75 ^A ± 65,12	153,75 ^{Aa} ± 4,99	0,29 ± 0,06	0,16 ± 0,03
	5h	CV	29,70 ± 6,84	145,36 ^A ± 28,27	3,13 ± 0,80	11,21 ^b ± 1,04	133,97 ± 17,29	253,50 ^b ± 43,36	120,75 ± 13,10	0,42 ^a ± 0,05	0,21 ± 0,03
		MV	33,85 ± 1,66	138,68 ^A ± 14,25	2,31 ± 0,53	14,09 ^{Ba} ± 1,02	114,93 ± 14,18	408,25 ^{Aa} ± 70,41	142,25 ± 20,47	0,32 ^b ± 0,02	0,18 ± 0,02
	7h	CV	30,45 ^A ± 2,40	105,72 ^b ± 7,61	1,70 ± 0,19	16,79 ± 1,19	102,47 ± 9,28	282,75 ^b ± 18,28	146,00 ± 9,80	0,34 ^a ± 0,03	0,17 ± 0,01
		MV	30,78 ^A ± 2,15	120,56 ^a ± 5,72	1,94 ± 0,38	17,06 ^A ± 1,49	102,46 ^B ± 4,19	340,00 ^{Aa} ± 23,66	149,00 ± 13,22	0,29 ^b ± 0,04	0,16 ^B ± 0,01
	9h	CV	22,96 ^a ± 2,56	91,40 ^a ± 6,74	1,74 ^a ± 0,19	15,05 ± 0,92	103,32 ^a ± 6,34	255,50 ^b ± 24,37	137,25 ± 10,81	0,32 ± 0,03	0,16 ± 0,01
		MV	16,53 ^{Bb} ± 2,73	48,49 ^{Bb} ± 13,73	1,02 ^{Bb} ± 0,17	16,57 ± 1,78	61,37 ^{Bb} ± 5,39	341,75 ^a ± 18,98	144,00 ± 8,33	0,20 ^B ± 0,05	0,11 ^B ± 0,03
	30h	CV	32,71 ± 2,52	68,96 ± 21,32	2,22 ± 0,73	15,02 ± 2,09	118,38 ± 12,70	308,00 ± 23,94	134,00 ± 8,64	0,37 ± 0,04	0,17 ± 0,02
		MV	35,94 ± 8,32	120,14 ± 37,92	2,32 ± 0,69	15,93 ± 2,52	129,38 ^B ± 15,48	332,00 ± 29,62	142,50 ± 9,85	0,36 ± 0,04	0,21 ± 0,02
	100h	CV	32,10 ± 1,75	84,65 ± 11,83	1,77 ± 0,29	19,86 ± 2,21	111,93 ± 7,76	346,50 ^a ± 34,51	146,75 ± 12,95	0,31 ^b ± 0,04	0,18 ± 0,01
		MV	35,03 ± 3,87	88,17 ± 17,92	2,06 ± 0,41	22,93 ^A ± 2,44	122,45 ± 4,95	141,75 ^{Bb} ± 7,85	141,75 ^A ± 7,85	0,43 ^a ± 0,03	0,19 ± 0,01

Tabela 5 - Média ($n=4$) dos dados de assimilação de CO_2 (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mmol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$), taxa de transpiração (E , $\text{mmol vapor d'água m}^{-2}\text{s}^{-1}$), eficiência do uso da água (EUA , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1}\text{H}_2\text{O}$), taxa de transporte de elétrons (ETR, $\mu\text{mol.elétrons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$), fluorescência máxima (F_M), fluorescência basal (F_0), dissipação fotoquímica (qP) e rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}), referente à primeira avaliação às 9 horas da manhã, antes da aplicação do aleloquímico (0h). M: MeJa; MV: MeJa vizinho. Os resultados da análise de variância (ANOVA *one way*). Seguido pelo teste Tukey com nível de significância de 5% ($P<0,05$). Letras minúsculas indicam diferença entre MeJa e MeJa vizinho do respectivo contato.

	HAA		<i>A</i>	<i>g_s</i>	<i>E</i>	<i>EUA</i>	ETR	<i>F_M</i>	<i>F₀</i>	qP	Φ _{PSII}
1° Contato	3h	M	25,64 ± 7,13	75,44 ± 27,21	0,92 ± 0,42	25,54 ^{Aa} ± 2,56	130,67 ^A ± 26,70	308,94 ± 72,34	122,75 ± 20,25	0,34 ^A ± 0,05	0,21 ^A ± 0,04
		MV	29,46 ± 5,73	113,53 ^A ± 36,93	1,73 ± 0,73	16,52 ^b ± 4,55	130,02 ^A ± 19,39	301,00 ^B ± 58,52	108,00 ^B ± 14,79	0,35 ± 0,06	0,21 ± 0,03
	5h	M	18,82 ^{Bb} ± 1,81	64,64 ^{Bb} ± 10,35	1,23 ^{Bb} ± 0,21	20,38 ^A ± 2,91	151,59 ^A ± 27,54	213,25 ± 93,11	109,25 ± 35,40	0,38 ± 0,02	0,21 ± 0,08
		MV	29,73 ^a ± 4,32	106,31 ^{Ba} ± 11,66	1,68 ^a ± 0,12	18,75 ^A ± 1,31	120,93 ± 20,11	258,75 ^B ± 63,37	123,00 ± 35,04	0,35 ± 0,06	0,19 ± 0,03
	7h	M	18,84 ^{Bb} ± 3,27	79,12 ± 4,24	1,58 ± 0,15	13,64 ^a ± 0,90	124,04 ^A ± 8,46	225,00 ± 84,06	104,56 ^B ± 14,32	0,36 ± 0,06	0,20 ^A ± 0,01
		MV	25,06 ^{Ba} ± 3,41	97,75 ± 17,76	1,97 ± 0,40	12,06 ^{Bb} ± 0,79	116,47 ^A ± 6,23	228,00 ^B ± 25,03	116,00 ± 33,67	0,34 ± 0,03	0,18 ^A ± 0,01
	9h	M	21,37 ± 3,33	74,48 ± 6,09	1,31 ± 0,19	16,25 ± 1,50	122,31 ^A ± 25,67	291,50 ± 37,21	120,00 ± 12,44	0,33 ± 0,09	0,19 ^A ± 0,04
		MV	23,84 ^A ± 2,12	81,82 ^A ± 6,55	1,34 ^A ± 0,42	15,13 ± 2,96	130,75 ^A ± 22,66	331,00 ± 47,38	127,00 ± 19,70	0,35 ^A ± 0,07	0,21 ^A ± 0,04
	30h	M	29,87 ± 3,67	76,13 ^{Bb} ± 11,07	1,47 ^B ± 0,28	20,93 ^{Aa} ± 1,62	142,53 ± 14,58	277,25 ± 72,05	115,25 ^{Bb} ± 9,29	0,41 ± 0,08	0,23 ± 0,02
		MV	27,21 ± 4,77	140,70 ^a ± 15,91	1,37 ± 1,39	17,24 ^b ± 1,70	160,20 ^A ± 14,80	368,00 ± 41,04	141,00 ^a ± 15,12	0,41 ± 0,08	0,23 ± 0,02
	100h	M	32,47 ^b ± 4,19	127,43 ^{Aa} ± 5,47	3,39 ^{Aa} ± 0,39	11,97 ^B ± 4,10	133,51 ± 33,01	261,50 ± 86,13	145,25 ± 23,99	0,43 ^A ± 0,07	0,24 ± 0,06
		MV	38,75 ^a ± 1,91	104,96 ^b ± 16,25	2,04 ^b ± 0,38	11,15 ^B ± 0,57	107,31 ± 22,20	304,75 ^A ± 43,83	126,00 ^B ± 8,00	0,35 ± 0,04	0,21 ± 0,02
2° Contato	3h	M	24,92 ± 4,44	77,27 ± 11,64	1,32 ± 0,16	14,21 ^B ± 2,33	86,35 ^B ± 5,46	369,25 ± 90,25	134,75 ^b ± 15,65	0,23 ^B ± 0,02	0,14 ^B ± 0,01
		MV	25,32 ± 3,38	63,07 ^B ± 6,02	1,27 ± 0,52	19,77 ± 9,56	85,44 ^B ± 15,12	418,75 ^A ± 65,12	153,75 ^{Aa} ± 4,99	0,29 ± 0,06	0,16 ± 0,03
	5h	M	27,16 ^{Ab} ± 2,51	108,42 ^{Ab} ± 6,49	2,13 ^A ± 0,22	12,56 ^B ± 0,85	90,90 ^B ± 9,42	232,75 ^b ± 44,14	141,75 ± 10,72	0,40 ± 0,04	0,15 ± 0,03
		MV	33,85 ^a ± 1,66	138,68 ^{Aa} ± 14,25	2,31 ± 0,53	14,09 ^B ± 1,02	114,93 ± 14,18	408,25 ^{Aa} ± 70,41	142,25 ± 20,47	0,32 ± 0,02	0,18 ± 0,02
	7h	M	26,28 ^A ± 4,01	90,08 ^b ± 18,85	1,89 ± 0,16	14,32 ^b ± 1,02	101,86 ^B ± 8,18	216,25 ^b ± 55,49	144,75 ^A ± 25,05	0,37 ± 0,03	0,16 ^B ± 0,02
		MV	30,78 ^A ± 2,15	120,56 ± 5,72	1,94 ± 0,38	17,06 ^{Aa} ± 1,49	102,46 ^B ± 4,19	340,00 ^{Aa} ± 23,66	149,00 ± 13,22	0,29 ± 0,04	0,16 ^B ± 0,01
	9h	M	20,84 ± 2,89	51,02 ± 2,70	1,13 ± 0,06	16,22 ± 3,17	76,31 ^B ± 12,74	244,25 ^b ± 51,82	140,19 ± 13,40	0,24 ± 0,05	0,12 ^B ± 0,02
		MV	16,53 ^B ± 2,73	48,49 ^B ± 13,73	1,02 ^B ± 0,17	16,57 ± 1,78	61,37 ^B ± 5,39	341,75 ^a ± 18,98	144,00 ± 8,33	0,20 ^B ± 0,05	0,11 ^B ± 0,03
	30h	M	30,64 ± 6,36	140,95 ^A ± 14,93	2,77 ^A ± 0,30	14,47 ^B ± 2,37	119,94 ± 20,86	321,50 ± 92,82	147,75 ^A ± 15,63	0,35 ± 0,04	0,19 ± 0,03
		MV	35,94 ± 8,32	120,14 ± 37,92	2,31 ± 0,69	15,93 ± 2,52	129,38 ^B ± 15,48	332,00 ± 29,62	142,50 ± 9,85	0,36 ± 0,04	0,21 ± 0,02
	100h	M	38,73 ± 2,54	87,68 ^B ± 10,19	1,69 ^B ± 0,32	19,25 ^{Ab} ± 1,45	127,96 ± 2,95	316,00 ^a ± 24,98	141,00 ± 3,83	0,38 ^{Bb} ± 0,02	0,20 ± 0,00
		MV	35,03 ± 3,87	88,17 ± 17,92	2,06 ± 0,41	22,93 ^{Aa} ± 2,44	122,45 ± 4,95	141,75 ^{Bb} ± 7,85	141,75 ^A ± 7,85	0,43 ^a ± 0,03	0,19 ± 0,01

Tabela 6 - Expressão relativa do gene *SHR* em raízes de sorgo. A expressão gênica é representada pelo produto (expressão relativa) do valor da expressão do gene *SHR* com o valor de expressão dos genes normalizadores, *PP2A* e *EIF4α*. M₁: tratamento MeJa no primeiro contato com metil jasmonato; M₂: tratamento MeJa no segundo contato com metil jasmonato; MV₁: tratamento MeJa vizinho no primeiro contato do grupo M com metil jasmonato; MV₂: tratamento MeJa vizinho no segundo contato com metil jasmonato; C₁: tratamento controle no primeiro contato do grupo M com metil jasmonato; C₂: tratamento controle no segundo contato do grupo M com metil jasmonato; CV₁: tratamento controle vizinho no primeiro contato do grupo M com metil jasmonato; CV₂: tratamento controle vizinho no segundo contato do grupo M com metil jasmonato. Os resultados da análise de variância (ANOVA *one way*), seguido pelo teste Tukey com nível de significância de 5% ($P < 0,05$). Letras maiúsculas indicam diferença entre o primeiro e segundo contato.

	6h		12h		200h	
	Expressão	<i>P</i>	Expressão	<i>P</i>	Expressão	<i>P</i>
M ₁	3,510 ± 1,055	0,196	3,428 ± 3,370	0,400	308,072 ± 515,299	0,366
C ₁	14,794 ± 12,558		6,543 ± 3,912		4,990 ± 3,420	
MV ₁	6,009 ± 1,757	0,760	2,348 ± 1,986	0,233	13,754 ± 11,505	0,385
CV ₁	5,545 ± 1,718		4,780 ± 2,252		6,906 ± 3,937	
M ₁	3,510 ± 1,055	0,102	3,428 ± 3,370	0,658	308,072 ± 515,299	0,379
MV ₁	6,009 ± 1,757		2,348 ± 1,986		13,754 ± 11,505	
M ₂	14,427 ± 18,101	0,461	12,052 ± 5,224	0,872	9,240 ± 1,926	0,740
C ₂	29,991 ± 27,687		13,080 ± 8,919		9,881 ± 2,447	
MV ₂	13,526 ± 11,657	0,727	10,960 ± 2,906	0,403	11,936 ± 8,286	0,478
CV ₂	17,239 ± 12,621		15,681 ± 8,255		16,168 ± 4,381	
M ₂	14,427 ± 18,101	0,946	12,052 ± 5,224	0,768	9,240 ± 1,926	0,612
MV ₂	13,526 ± 11,657		10,960 ± 2,906		11,936 ± 8,286	
M ₁	3,510 ± 1,055	0,356	3,428 ^B ± 3,370	0,065	308,072 ± 515,299	0,232
M ₂	14,427 ± 18,101		12,052 ^A ± 5,224		9,240 ± 1,926	
MV ₁	6,009 ± 1,757	0,331	2,348 ^B ± 1,986	0,013	13,754 ± 11,505	0,835
MV ₂	13,526 ± 11,657		10,960 ^A ± 2,906		11,936 ± 8,286	

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAIS, Harsh P. et al. Allelopathy and Exotic Plant Invasion: From Molecules and Genes to Species Interactions. **Science**, [s. l.], v. 301, n. 5638, p. 1377–1380, 2003.

BALUŠKA, František; GAGLIANO, Monica; WITZANY, Guenther. **Memory and Learning in Plants**. 1. ed. Cham: Springer International Publishing, 2018.

BALUŠKA, František; MANCUSO, Stefano. Plant Cognition and Behavior: From Environmental Awareness to Synaptic Circuits Navigating Root Apices. In: BALUŠKA, František; GAGLIANO, Monica; WITZANY, Guenther (Eds.). **Memory and Learning in Plants**. 1. ed. Cham: Springer International Publishing, 2018.

BANNISTER, Andrew J.; KOUZARIDES, Tony. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Research**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 381–395, 2011.

BENFEY, Philip N. et al. Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. **Development**, [s. l.], v. 119, p. 57–70, 1993.

BHATTACHARJEE, Soumen. The Language of Reactive Oxygen Species Signaling in Plants. **Journal of Botany**, [s. l.], v. 2012, p. 1–22, 2012.

BIRD, Adrian. Perceptions of epigenetics. **Nature**, [s. l.], v. 447, n. 7143, p. 396–398, 2007.

BRUCE, Toby J. A. et al. Stressful “memories” of plants: Evidence and possible mechanisms. **Plant Science**, [s. l.], v. 173, n. 6, p. 603–608, 2007.

CHEN, Bin J. W.; DURING, Heinjo J.; ANTEN, Niels P. R. Detect thy neighbor: Identity recognition at the root level in plants. **Plant Science**, [s. l.], v. 195, p. 157–167, 2012.

CHEONG, Jong Joo; CHOI, Yang Do. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. **Trends in Genetics**, [s. l.], v. 19, n. 7, p. 409–413, 2003.

CONRATH, Uwe et al. Priming: Getting Ready for Battle. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [s. l.], v. 19, n. 10, p. 1062–1071, 2006.

CREELMAN, Robert A.; MULLET, John E. Biosynthesis and Action of Jasmonates in Plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 355–381, 1997.

CRISP, P. A. et al. Reconsidering plant memory: Intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. **Science Advances**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. e1501340–e1501340, 2016.

DARWIN, Charles; DARWIN, Francis. **The Power of Movement in Plants**. London: William Clowes and Sons, 1880.

DICKE, Marcel. Plants talk, but are they deaf? **Trends in Plant Science**, [s. l.], v. 8, n.

9, p. 403–405, 2003.

EKE, Pierre et al. Mycorrhiza consortia suppress the fusarium root rot (*Fusarium solani* f. sp. *Phaseoli*) in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Biological Control**, [s. l.], v. 103, p. 240–250, 2016.

ELHAKEEM, Ali et al. Aboveground mechanical stimuli affect belowground plant-plant communication. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 1–15, 2018.

ENGELBERTH, J. et al. Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 101, n. 6, p. 1781–1785, 2004.

FAGAN, Evandro Binotto et al. **Fisiologia Vegetal: Reguladores Vegetais**. São Paulo: Andrei Editora Ltda., 2015.

FERREIRA, Alfredo Gui; AQUILA, Maria Estefânia Alves. Allelopathy: an Emerging Topic in Ecophysiology. **Revista Brasileira De Fisiologia Vegetal**, [s. l.], v. 12, n. Vii, p. 175–204, 2000.

GAGLIANO, Monica et al. Experience teaches plants to learn faster and forget slower in environments where it matters. **Oecologia**, [s. l.], v. 175, n. 1, p. 63–72, 2014.

GAGLIANO, Monica et al. Learning by Association in Plants. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 38427, 2016.

GALLÉ, Alexander; HALDIMANN, Pierre; FELLER, Urs. Photosynthetic performance and water relations in young pubescent oak (*Quercus pubescens*) trees during drought stress and recovery. **New Phytologist**, [s. l.], v. 174, n. 4, p. 799–810, 2007.

GALMÉS, Jeroni; MEDRANO, Hipólito; FLEXAS, Jaume. Photosynthetic limitations in response to water stress and recovery in Mediterranean plants with different growth forms. **New Phytologist**, [s. l.], v. 175, n. 1, p. 81–93, 2007.

GENDREL, Anne-Valerie et al. Profiling histone modification patterns in plants using genomic tiling microarrays. **Nature Methods**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 213–218, 2005.

GERRITS, Pirter Oest; HOROBIN, Richard W. The application of glycol methacrylate in histotechnology; some fundamental principles. **Faculteit der Geneeskunde, Rijksuniversiteit Groningen**, [s. l.], 1991.

HAO, Yu-Jun et al. Soybean NAC transcription factors promote abiotic stress tolerance and lateral root formation in transgenic plants. **The Plant Journal**, [s. l.], v. 68, n. 2, p. 302–313, 2011.

HEIMANN, L. et al. A Common Histone Modification Code on C4 Genes in Maize and Its Conservation in Sorghum and *Setaria italica*. **PLANT PHYSIOLOGY**, [s. l.], v. 162, n. 1, p. 456–469, 2013.

HELARIUTTA, Y. et al. The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the

Arabidopsis root through radial signaling. **Cell**, [s. l.], v. 101, n. 5, p. 555–67, 2000.

HOAGLAND, Dennis Robert; ARNON, Daniel Israel. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station**, [s. l.], v. 347, 1950.

HOWE, Gregg A.; MAJOR, Ian T.; KOO, Abraham J. Modularity in Jasmonate Signaling for Multistress Resilience. **Annual Review of Plant Biology**, [s. l.], v. 69, n. 1, p. 387–415, 2018.

HUDGINS, J. W.; CHRISTIANSEN, Erik; FRANCESCHI, Vincent R. Methyl jasmonate induces changes mimicking anatomical defenses in diverse members of the Pinaceae. **Tree Physiology**, [s. l.], v. 23, n. 6, p. 361–371, 2003.

JACOB, Cory E.; TOZZI, Eric; WILLENBORG, Christian J. Neighbour presence, not identity, influences root and shoot allocation in pea. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 1–12, 2017.

JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940.

KARBAN, Richard. Plant behaviour and communication. **Ecology Letters**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. 727–739, 2008.

KAWECKI, Tadeusz J. Evolutionary ecology of learning: insights from fruit flies. **Population Ecology**, [s. l.], v. 52, n. 1, p. 15–25, 2010.

KOIZUMI, K. et al. The *SHORT-ROOT* protein acts as a mobile, dose-dependent signal in patterning the ground tissue. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 109, n. 32, p. 13010–13015, 2012.

KOSOVÁ, Klára et al. Plant proteome changes under abiotic stress - Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. **Journal of Proteomics**, [s. l.], v. 74, n. 8, p. 1301–1322, 2011.

LEVESQUE, Mitchell P. et al. Whole-Genome Analysis of the *SHORT-ROOT* Developmental Pathway in *Arabidopsis*. **PLoS Biology**, [s. l.], v. 4, n. 5, p. e143, 2006.

LIN, Changjie et al. Diel ecosystem conductance response to vapor pressure deficit is suboptimal and independent of soil moisture. **Agricultural and Forest Meteorology**, [s. l.], v. 250–251, n. November 2017, p. 24–34, 2018.

LIU, Chunyan et al. Histone Methylation in Higher Plants. **Annual Review of Plant Biology**, [s. l.], v. 61, n. 1, p. 395–420, 2010.

LIU, Hongwei et al. Effects of jasmonic acid signalling on the wheat microbiome differ between body sites. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, p. 41766, 2017.

LYON, Pamela. The biogenic approach to cognition. **Cognitive Processing**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 11–29, 2006.

MADLUNG, A.; COMAI, Luca. The Effect of Stress on Genome Regulation and

Structure. **Annals of Botany**, [s. l.], v. 94, n. 4, p. 481–495, 2004.

MARRS, Kathleen A. The Functions and Regulation of Glutathione S-Transferases in Plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 127–158, 1996.

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

MILLER, Michael B. et al. Individual differences in cognitive style and strategy predict similarities in the patterns of brain activity between individuals. **NeuroImage**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 83–93, 2012.

NG, Huck Hui et al. Targeted Recruitment of Set1 Histone Methylase by Elongating Pol II Provides a Localized Mark and Memory of Recent Transcriptional Activity. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 709–719, 2003.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, [s. l.], v. 59, n. 2, p. 368–373, 1964.

OKANO, Hideyuki; HIRANO, Tomoo; BALABAN, Evan. Learning and memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 97, n. 23, p. 12403–12404, 2000.

PATERSON, Andrew H. et al. The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses. **Nature**, [s. l.], v. 457, n. 7229, p. 551–556, 2009.

PFAFFL, Michael W.; HAGELEIT, M. Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 23, p. 275–282, 2001.

RAKWAL, Randeep; KOMATSU, Setsuko. Jasmonic acid-induced necrosis and drastic decreases in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in rice seedlings under light involves reactive oxygen species. **Journal of Plant Physiology**, [s. l.], v. 158, n. 6, p. 679–688, 2001.

REA, Stephen et al. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. **Nature**, [s. l.], v. 406, n. 6796, p. 593–599, 2000.

REDDY, Palakolanu Sudhakar et al. Evaluation of Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.)] Reference Genes in Various Tissues and under Abiotic Stress Conditions for Quantitative Real-Time PCR Data Normalization. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 7, n. April, p. 1–14, 2016.

SCHERES, Ben et al. Mutations affecting the radial organisation of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. **Development**, [s. l.], v. 121, n. 1, p. 53–62, 1995.

SHARMA, Pallavi et al. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, [s. l.], v. 2012,

p. 1–26, 2012.

STOJAKOWSKA, Anna; MALARZ, Janusz; KISIEL, Wanda. Salicylate and methyl jasmonate differentially influence diacetylene accumulation pattern in transformed roots of feverfew. **Plant Science**, [s. l.], v. 163, n. 6, p. 1147–1152, 2002.

SUHITA, D. et al. Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid- induced stomatal closure. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 134, n. 4, p. 1536–1545, 2004.

VENTURI, Vittorio; KEEL, Christoph. Signaling in the Rhizosphere. **Trends in Plant Science**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 187–198, 2016.

VRIET, Cecile; HENNIG, Lars; LALOI, Christophe. Stress-induced chromatin changes in plants: of memories, metabolites and crop improvement. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 72, n. 7, p. 1261–1273, 2015.

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

WALTER, Julia et al. Ecological stress memory and cross stress tolerance in plants in the face of climate extremes. **Environmental and Experimental Botany**, [s. l.], v. 94, p. 3–8, 2013.

WATERBORG, Jakob H. Plant histone acetylation: In the beginning.... **Biochimica et Biophysica Acta**, [s. l.], v. 1809, n. 8, p. 353–359, 2011.

WITZANY, Guenther. Memory and Learning as Key Competences of Living Organisms. In: BALUSKA, Frantisek; GAGLIANO, Monica; WITZANY, Guenther (Eds.). **Memory and Learning in Plants**. 1. ed. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 223.

ZHANG, Lingrui; XING, Da. Methyl Jasmonate Induces Production of Reactive Oxygen Species and Alterations in Mitochondrial Dynamics that Precede Photosynthetic Dysfunction and Subsequent Cell Death. **Plant and Cell Physiology**, [s. l.], v. 49, n. 7, p. 1092–1111, 2008.

ZHU, J. K. et al. Involvement of Arabidopsis HOS15 in histone deacetylation and cold tolerance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 105, n. 12, p. 4945–4950, 2008.

APÊNDICE

Tabela 7 - Aspectos anatômicos de raízes de *Sorghum bicolor* no 18º dia de experimento. Os resultados da análise de variância (ANOVA *one way*), seguido pelo teste Tukey com nível de significância de 5% ($P < 0,05$). Dados referentes às médias ($n=4$) e desvio padrão. Letras maiúsculas indicam diferenças entre grupo de plantas com aplicação e plantas vizinhas (MeJa x MeJa Vizinho e Controle x Controle Vizinho). Letras minúsculas indicam diferenças entre mesmo grupo com aplicação ou vizinhas (Controle x MeJa e Controle Vizinho x MeJa Vizinho).

Grupos	Tratamento	Área de espaço intercelular (μm^2)	Diâmetro da raiz (μm)	Área ocupada pelo estelo (μm^2)
Plantas com aplicação	Controle	757,38 ^{Aa} $\pm$ 167,56	570,83 ^{Ab} $\pm$ 44,75	577,34 ^{Ab} $\pm$ 107,58
	MeJa	637,35 ^{Aa} $\pm$ 25,56	632,41 ^{Aa} $\pm$ 21,78	779,97 ^{Aa} $\pm$ 69,15
Plantas vizinhas	Controle Vizinho	776,66 ^{Aa} $\pm$ 72,90	587,30 ^{Aa} $\pm$ 31,22	635, 41 ^{Aa} $\pm$ 26,37
	MeJa Vizinho	382,25 ^{Bb} $\pm$ 42,68	464,22 ^{Bb} $\pm$ 49,76	482,06 ^{Bb} $\pm$ 56,50