



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



PAULO VITOR GALDINO DA SILVA

**RESPOSTAS BIOQUÍMICAS, FISIOLÓGICAS E MOLECULARES EM SEMENTES
E PLÂNTULAS DE *CENOSTIGMA PYRAMIDALE* APÓS HIDRATAÇÃO
DESCONTÍNUA**

Recife
2023

PAULO VITOR GALDINO DA SILVA

**RESPOSTAS BIOQUÍMICAS, FISIOLÓGICAS E MOLECULARES NA
GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS DE *CENOSTIGMA*
PYRAMIDALE APÓS CICLOS DE HIDRATAÇÃO E DESIDRATAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas

Área de concentração: Biotecnologia
e Bioinformática

Orientadora: Prof^a Dr^a Valesca Pandolfi

Coorientadores: Prof^a Dr^a Ana Maria Benko-Iseppon
Prof. Dr. Marcos Vinicius Meiado

Recife

2023

Catálogo de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Paulo Vitor Galdino da Silva.

Respostas bioquímicas, fisiológicas e moleculares em sementes e plântulas de *cenostigma pyramidale* após hidratação descontínua / Paulo Vitor Galdino da Silva. - Recife, 2023.
84f.: il.

Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2023.

Orientação: Valesca Pandolfi.

Coorientação: Ana Maria Benko-Iseppon.

Coorientação: Marcos Vinicius Meiado.

1. Catingueira; 2. Hidratação descontínua; 3. Memória hídrica. I. Pandolfi, Valesca. II. Benko-Iseppon, Ana Maria. III. Meiado, Marcos Vinicius. IV. Título.

UFPE-Biblioteca Central

CDD 572

PAULO VITOR GALDINO DA SILVA

**RESPOSTAS BIOQUÍMICAS, FISIOLÓGICAS E MOLECULARES NA
GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS DE *CENOSTIGMA*
PYRAMIDALE APÓS CICLOS DE HIDRATAÇÃO E DESIDRATAÇÃO**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Pernambuco, como
requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Ciências
Biológicas.

Aprovada em: 01/09/2023

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Valesca Pandolfi (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. José Ribamar Costa Ferreira Neto (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a Elizamar Ciríaco da Silva (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Sergipe, UFS

A MINHA QUERIDA MÃE,
TEREZINHA LOURENÇO DA SILVA,
PELO AMOR, AFETO E CONFIANÇA
QUE SEMPRE DEPOSITOU EM MIM.
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, desejo expressar minha profunda gratidão à **Deus** por guiar-me de maneira constante ao longo desta etapa da minha jornada profissional. Sua orientação tem sido um farol que ilumina o meu caminho, encorajando-me a perseverar diariamente na busca dos meus sonhos.

À minha querida mãe, quero manifestar minha profunda gratidão por todo o incentivo e apoio que você sempre me proporcionou. Embora seus estudos não tenham sido concluídos, este trabalho é dedicado inteiramente a senhora. Obrigado por estar ao meu lado, nunca me abandonar e me dar a coragem necessária para tomar decisões importantes. Você é meu porto seguro, a fonte de força que me capacita a enfrentar os desafios diários. Você é a flor mais preciosa do meu jardim. Te amo hoje e sempre!

Aos meus familiares Marilene, Nicolý, Julia, Vitória, Vilma e Antônio que estiveram e sempre estão em prontidão para me ouvirem. Em vocês eu vejo um mosaico de apoio, amor e compreensão.

À minha grandiosa professora Dra. **Valesca Pandolfi**, mais que uma orientadora, e sim, uma "mãe". Expresso minha profunda gratidão pela orientação maravilhosa, compreensão, sábios conselhos, amizade e extrema paciência o qual foi importante para a construção desse homérico trabalho. Obrigado "Vale", você sempre terá minha eterna admiração!

Aos professores **Ana Benko** e **Marcos Meiado**, cujas análises foram primordiais e cirúrgicas e que me fizeram reconsiderar o rumo incerto deste trabalho.

Ao professor **Mauro Guida** por me permitir gerar *insights* em relação ao meu trabalho.

Às grandiosas pesquisadoras da Fisiologia Vegetal (UFPE), Wanessa Carvalho e Mariana Santos, pelas várias contribuições no âmbito fisiológico, seja pela troca de ideias, discussões enriquecedoras e os momentos compartilhados. Vocês foram primordiais para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Gostaria de tornar público a competência e o companheirismo de Cleidiane Santos, Gabriel Dias e Manassés Daniel pela enorme paciência e por não soltarem minha mão nos momentos mais difíceis e corridos de conclusão desse trabalho.

Ao meu amigo **Thyago Borba**, pela paciência de me ouvir e por me

estimular nos momentos mais difíceis da minha vida, me ajudando sempre a me manter firme nesta jornada.

Expresso minha profunda gratidão ao meu fiel companheiro, **Leakim**, por sua presença constante durante os momentos de criação do meu projeto, onde sua companhia se mostrou verdadeiramente indispensável. Seu amor e apoio silenciosos tornaram cada desafio mais fácil de superar.

Gostaria de expressar minha enorme gratidão a **Mikael Nascimento** pela fonte de companheirismo e apoio, tornando minha jornada mais significativa.

Aos meus amigos **Bruno Italo** e **Yasmim Karolliny**, por sempre estarem comigo nos altos e baixos da vida. Vocês são aqueles que nunca falham em me arrancar longas risadas.

Agradeço fortemente ao nosso grupo de Biologia Molecular (LGBV) por todo esforço coletivo e sinergia. Juntos, somos imparáveis!

Apesar de tentar mencionar todos, possa intercorrer no esquecimento, eu ainda correrei esse risco. Meus sinceros agradecimentos aos amigos do âmbito laboratorial, à Ana Carolina, Jailene, Laura, Fernanda Alves, Fernanda Freitas, Vanessa, Wilson Dias, por tornarem a atmosfera laboratorial positiva, sendo cada dia mais leve e divertido. Obrigado pelo apoio mútuo em todos os momentos que precisei de vocês.

A **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior) pelo apoio financeiro fornecido para o desenvolvimento desse projeto de pesquisa, e ao o **Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas**, pela oportunidade de realização do mestrado.

Muito obrigado!

“A FÉ FAZ O HÉROI”
JAMILY.

RESUMO

Em ecossistemas áridos e semiáridos padrões irregulares de precipitação são constantes, promovendo modificações fisiológicas, bioquímicas e moleculares nas plantas, em qualquer período do seu ciclo de vida, incluindo a germinação, crescimento vegetativo e reprodutivo. Estudos apontam que uma exposição prévia a um determinado estresse pode induzir respostas mais rápidas e efetivas a estresses subsequentes, sugerindo uma memória ao estresse. Considerando a importância que o déficit hídrico exerce sobre o crescimento e desenvolvimento vegetal, este estudo avaliou os efeitos dos ciclos de hidratação e desidratação (HD) sobre a germinação e crescimento vegetativo de plantas de *Cenostigma pyramidale* (Catingueira), em associação à memória ao referido estresse. Sementes da Catingueira foram submetidas a diferentes ciclos de HD durante a germinação das sementes (desidratação simulado por PEG 6000) em diferentes potenciais osmóticos. Parâmetros fisiológicos como porcentagem, sincronia, tempo e velocidade média de germinação foram avaliados. Adicionalmente, plantas jovens foram avaliadas após quatro ciclos de HD avaliando-se, também, quanto parâmetros fisiológicos. A análise molecular foi realizada através da expressão diferencial de genes de memória à deficiência hídrica. Sementes que passaram pelos ciclos de HD (tratamento SHD) apresentaram melhoras significativas em todos os parâmetros avaliados durante a germinação. O tratamento SHD também favoreceu germinação em potenciais hídricos mais negativos, sugerindo uma resposta positiva da memória hídrica no processo. Resultados positivos também foram obtidos com plantas tratadas com ciclos de HD (tratamento PHD), as quais foram capazes de manter seu *status* hídrico, mesmo durante o período de desidratação contínua (DC). A raiz foi o órgão predominante no armazenamento de amido e acúmulo de açúcares solúveis. Dos cinco genes de memória analisados, três (E3 ubiquitin-protein ligase CpRZF1; PYR_PYL_RCAR_like e PRK11107_GAF) foram diferencialmente expressos, revelando *insights* sobre uma possível memória hídrica na espécie estudada. Em conjunto, nossos dados ressaltam a importância de estudos que visam compreender como as espécies de regiões áridas e semiáridas, como a Catingueira, respondem a situações de estresse, especialmente sob condições de pouca disponibilidade hídrica, visando o desenvolvimento de plantas mais tolerantes à seca, considerando as crescentes mudanças climáticas globais.

Palavras-chave: Catingueira; Germinação; Hidratação descontínua; Memória hídrica.

ABSTRACT

In arid and semiarid ecosystems irregular precipitation patterns are constant, promoting physiological, biochemical and molecular modifications in plants, which can occur in any periods of the life cycle, including germination, vegetative growth, and reproduction. Studies indicate that previous exposure to a given stress can induce faster and more effective responses to subsequent stresses, which is related to stress memory. Considering the importance that water déficit has on plant growth and development, this study evaluated the effects of hydration and dehydration (HD) cycles on the germination and vegetative growth of *Cenostigma pyramidale* (Catingueira) plants in association to dehydration stress memory. The seeds of Catingueira were subjected to different HD cycles during germination process (dehydration simulated by PEG 6000) at different osmotic potentials. Physiological parameters such as percentage, synchrony, time and average germination speed were evaluated. Additionally, young plants were evaluated after four HD cycles, also assessing physiological parameters. Molecular analysis was performed through the differential expression of dehydration stress memory genes. Seeds that underwent HD cycles (SHD treatment) showed significant improvements in all parameters evaluated during germination. SHD treatment also favored germination at more negative water potentials, suggesting a positive response of dehydration memory. Positive results were also obtained with plants treated with HD cycles (PHD treatment), which were able to maintain their water status, even during the period of continuous dehydration (CD). The root was the predominant organ in starch storage and soluble sugars accumulation. Of the five memory genes analyzed, three (E3 ubiquitin-protein ligase CpRZF1; PYR_PYL_RCAR_like and PRK11107_GAF) were differentially expressed, revealing insights into a possible dehydration stress memory in the studied species. Taken together, our data highlight the importance of studies that aim to understand how species like Catingueira respond to stress situations, especially under conditions of low water availability, aiming at the development of plants that are more tolerant to drought, considering the increasing global climate changes.

Keywords: Catingueira; Germination; Discontinuous hydration; stress memory.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

- Figura 1 –** Esquema representativo das fases e os eventos do processo de germinação, bem como a curva de embebição de sementes que não foram submetidas (sem *priming*) e que foram submetidas (pré-condicionadas; *priming*) aos ciclos de hidratação e desidratação (ciclos de HD). 21
- Figura 2 –** Esquema do mecanismo de memória ao estresse por seca. (S1) percepção ao primeiro estresse; (R1) reidratação/ hidratação; (S2) segundo estresse; (Genes de memória) expressão em S1 significativamente distinto de S2, *Up* ou *Down*; (Genes de memória atrasada/tardia) expressão similar entre plantas sem estresse e S1. Apresentam potencial para perceber sinais de estresse em S2.; (Genes sem memória) após o “alívio” do estresse (em R1), a resposta em S2 é análoga a S1; (=) expressão semelhante; (+) genes induzidos; (-) genes reprimidos; (PSE) planta sem estresse.. 27

RESULTADOS E DISCUSSÃO

- Figura 1 –** Esquema representando: (A) o padrão trifásico do processo de germinação e seus respectivos tempos de hidratação; (B) condicionamento fisiológico de sementes por meio dos ciclos de HD dada a hidratação durante a Fase I..... 39
- Figura 2 –** Esquema do delineamento experimental para análises fisiológicas, bioquímicas e moleculares de plantas de *C. Pyramidale* após ciclos de hidratação e desidratação (ciclos HD), às quais as plantas foram submetidas: Sementes/plantas sem ciclos de HD (Ctr/Controle); sementes submetidas a três ciclos de HD (SHD); plantas submetidas a quatro ciclos de HD (PHD); sementes e plantas submetidas aos ciclos de HD (SPHD). As coletas (folha, raiz e caule) estão indicadas pela figura de uma tesoura. (CRA) Conteúdo relativo de água foliar; (CNEs) Carboidratos Não Estruturais; (R1-R4) Reidratação..... 41
- Figura 3 –** Curva de Embebição (A) e de desidratação (B) de sementes de *C. pyramidale*..... 46
- Figura 4 –** Parâmetros de germinação de sementes de *C. pyramidale* condicionadas a três ciclos de HD e à diferentes potenciais osmóticos. (A) porcentagem de germinação; (B) sincronia da

germinação; (C) Tempo médio de germinação (TMG) e Velocidade média de germinação (VMG). 0C (Sementes não condicionadas aos ciclos de HD); 3C (Sementes submetidas a três ciclos de HD). As letras apontam as diferenças estatísticas entre os grupos conforme o teste de Newman-Keuls, e os valores representam a média das repetições ($n=5 \pm$ erro padrão).....

47

- Figura 5 –** Variação do Conteúdo Relativo de Água (CRA) foliar medidos antes do amanhecer em *C. pyramidale*, durante o período de 15 dias de desidratação contínua. As letras correspondem as diferenças estatísticas entre os tratamentos pelo teste de Newman-Keuls, bem como os valores sinalizam o valor médio para as repetições experimentais ($n=4 \pm$ erro padrão). Ctr (Controle), PHD (Plantas submetidas aos ciclos de HD), SHD (Sementes submetidas aos ciclos de HD) e SPHD (Sementes e Plantas submetidas aos ciclos de HD)..... 48
- Figura 6 –** Concentração de açúcares solúveis totais (AST) em diferentes tecidos (folha, caule e raiz) de plantas de *C. pyramidale* após a quarta reidratação - R4 (A) e, em seguida, de desidratação contínua - DC (B). Ctr (Controle), PHD (Ciclos de HD nas plantas), SHD (ciclos de HD nas sementes) e SPHD (ciclos de HD nas sementes e plantas). As letras correspondem as diferenças estatísticas entre os grupos pelo teste de Newman-Keuls, e os os valores sinalizam o valor médio das repetições ($n=5 \pm$ erro padrão)..... 50
- Figura 7 –** Concentração de Amido em diferentes tecidos (folha, caule e raiz) de plantas de *C. pyramidale* após a quarta reidratação - R4 (A) e após a desidratação contínua - DC (B). Ctr (Controle), PHD (ciclos de HD nas plantas), SHD (ciclos de HD nas sementes) e SPHD (ciclos de HD nas sementes e plantas). As letras correspondem as diferenças estatísticas entre os grupos pelo teste de Newman-Keuls, e os os valores sinalizam o valor médio das repetições ($n=4 \pm$ erro padrão)..... 51
- Figura 8 –** Concentração de carboidratos não estruturais (CNEs) em diferentes tecidos (folha, caule e raiz) de plantas de *C. pyramidale* após a quarta reidratação - R4 (A) e após a desidratação contínua - DC (B). Ctr (Controle), PHD (ciclos de HD nas plantas), SHD (ciclos de HD nas sementes) e SPHD (ciclos de HD em sementes e plantas). As letras correspondem as diferenças estatísticas entre os grupos pelo teste de Newman-Keuls, e os os valores sinalizam o valor médio das repetições ($n=4 \pm$ erro padrão).....

52

Figura 9 –	Genes de memória diferencialmente expressos no tecido radicular da Catingueira na quarta reidratação (R4) após o período de desidatação intermitente. Os “asteriscos” significam os genes diferencialmente expresso dos tratamentos em relação ao controle (up-regulated ou down-regulated) ($p < 0,05$). PHD (ciclos de HD nas plantas), SHD (ciclos de HD nas sementes) e e SPHD (ciclos de HD nas sementes e plantas) GM: Genes de Memória.....	54
Figura S1 –	Curvas de eficiência absoluta para os genes de alvos (A) e os genes de referência (B) oriundas das reações de RT-qPCR.....	72

LISTA DE TABELAS

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela S1 –	Pares de <i>primers</i> de genes de referência candidatos (CRGs) e dos transcritos alvos (genes de memória) desenhados, sintetizados e testados em tecidos radiculares de <i>C. pyramidale</i> sob condição de estresse hídrico no tecido radicular, conforme a literatura e identificados no transcriptoma de <i>C. pyramidale</i> . GM: Gene de memória; Tm: Temperatura de <i>melting</i> ; G/C (%):percentual de nucleotídeos Guanina (G) e Citosina (C); pb: pares; E %: Eficiência; N/E: Não eficiente.....	69
Tabela S2 –	Expressão diferencial RT-qPCR da região radicular de <i>C. pyramidale</i> durante a reidratação. Ctr (Controle); PHD (Plantas submetidas aos ciclos de HD), SHD (Sementes submetidas aos ciclos de HD) e SPHD (Sementes e Plantas submetidas aos ciclos de HD); E (%): Porcentagem de Eficiência; DR: Downregulation/regulação negativa; UP: Upregulation/regulação positiva; NS: Não significativo/Not significant; R: Correlation; S: Slope; ED*: Expressão Diferencial; NS: Não significativo; UP: up-regulated/regulação positiva; DOWN: down-regulated/regulação negativa.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AST	Açúcares Solúveis Totais
ABA	Ácido abscísico; <i>Abscisic acid</i>
BLAST	Ferramenta de Busca por Alinhamento Local; <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
ARP3	Actin-related protein 3
CE	Carboidratos Estruturais
cDNA	DNA complementar; <i>Complement DNA</i>
Ctr	Controle
SHD	Sementes que passaram por ciclos hidratação/desidratação
PHD	Plantas que passaram por ciclos de hidratação/desidratação
SPHD	Sementes e plantas que passaram por ciclos de HD
CRA	Conteúdo Relativo de Água Foliar; <i>Relative Water Content</i>
CNEs	Carboidratos Não Estruturais/ <i>Non-Structural Carbohydrates</i>
Ciclos de HD	Ciclos de Hidratação e Desidratação
DE	Diferencialmente Expresso
DR	Regulação negativa; <i>Down-regulated</i>
ROS	Espécie Reativa de Oxigênio/ <i>Reactive oxygen species</i>
T_b	Temperatura base
T_o	Temperatura ótima
T_c	Temperatura máxima e/ou teto
FTs	Fatores de Transcrições
GA₃	Ácido Giberélico
GM	Gene de memória
HAG2	Histone acetyltransferase type B catalytic subunit
lncRNAs	RNAs longos não codificantes
MIQE	<i>Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments</i>
MF	Massa Fresca
MT	Massa Túrgida
MYB4	Fator de transcrição da família MYB
MPTs	Modificações pós-traducionais

Mpa	Megapascal
mRNA	RNA mensageiro
MT	Memória transcricional
ncRNAs	RNAs não codificantes
NE	Não eficiente
NS	Não significativo
PSE	Planta Sem Estresse
PEG	Polietilenoglicol
R4	Quarta reidratação
RD	Responsivos à desidratação
RAB	Responsivos ao Acido Abscísico
REST	Ferramenta de análise da expressão relativa; <i>Relative Expression Software Tool</i>
RSH1	Relat/SPOT homolog1
RNA	Ácido Ribonucleico; <i>Ribonucleic Acid</i>
RNA-Seq	Sequenciamento de RNA
SAC1	Suppressor of Actin
DC	Desidratação Contínua
TMG	Tempo Médio de Germinação
UP	Regulação positiva; <i>Up-regulated</i>
VMG	Velocidade Média de Germinação
VFB1	Vier F-box protein1
0C	Sementes não condicionadas aos ciclos de HD
3C	Sementes submetidas a três ciclos de HD

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
3.1	CONDIÇÕES EDAFOCLIMÁTICAS NA CAATINGA	18
3.2	GERMINAÇÃO DE SEMENTES NA CAATINGA	19
3.3	ESTRATÉGIAS DE PRÉ-CONDICIONAMENTO DE SEMENTES	22
3.3.1	Ciclos de Hidratação e Desidratação (Ciclos de HD)	23
3.4	DEFICIÊNCIA HÍDRICA <i>VERSUS</i> MEMÓRIA DE ESTRESSE	25
3.5	MECANISMOS MOLECULARES ASSOCIADOS À MEMÓRIA HÍDRICA...	28
3.6	DÉFICIT HÍDRICO E A DINÂMICA DOS CARBOIDRATOS NÃO ESTRUTURAIS.....	31
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1	ARTIGO 1.....	33
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
6.	SÚMULA CURRÍCULAR	74
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

1. INTRODUÇÃO

A seca é, majoritariamente, uma das principais perturbações ambientais globais, com efeitos sobre os mais diversos sistemas incluindo o solo, crescimento da vegetação, a fauna, a qualidade da água, entre outros (VICENTE-SERRANO et al., 2020). No bioma Caatinga, a irregularidade das chuvas e a alta taxa de evapotranspiração resultam na baixa disponibilidade de água nesses ambientes (MEIADO et al., 2014; LIMA e MEIADO, 2018). No entanto, algumas espécies apresentam a capacidade de germinar sob temperaturas mais elevadas e baixa disponibilidade hídrica, evidenciando maior tolerância em relação àquelas de ecossistemas mais úmidos (DANTAS et al., 2020). Um exemplo é a Catingueira [*Cenostigma pyramidale* (Tul.) E. Gagnon & G. P. Lewis], cuja maturação das sementes ocorre no final da estação seca, tornando-se aptas para germinar mesmo sob condições de temperaturas elevadas (DANTAS et al. 2008; MEIADO et al., 2012; 2016). Trata-se de uma espécie da família Fabaceae, nativa da Caatinga, que apresenta potencial madeireiro, medicinal, forrageiro, na restauração florestal e, sobretudo, uma alternativa sustentável para regiões de clima árido ou semiárido (QUEIROZ, 2009; MATIAS et al., 2018; VILELA et al., 2021).

No entanto, as variações nos níveis de precipitação nessas regiões contribuem para o fenômeno conhecido como ciclos de Hidratação Descontínua (ou ciclos de hidratação e desidratação - HD) (MEIADO et al., 2013) – um fator fundamental para persistência e dinâmica das sementes. Considerando este cenário, o processo de embebição de sementes ortodoxas da Caatinga é descontínuo e pode desencadear uma proteção ecofisiológica aprimorada. Isso significa que as sementes, ao germinarem novamente, podem evocar a informação armazenada para um estabelecimento inicial mais eficiente (SARMENTO et al., 2020). Inúmeros estudos têm demonstrado os benefícios dos ciclos de HD durante a germinação, associando suas causas ao fenômeno de ‘memória hídrica’, cujos principais efeitos são uma maior velocidade da germinação em um menor período de tempo, um padrão mais coordenado, assim como maior porcentagem germinativa (DUBROVSKY, 1998; LIMA et al., 2018; NICOLAU et al., 2020; NASCIMENTO et al., 2021).

Diante este cenário, a aptidão das sementes e plantas em identificar, memorizar e se comunicar, fazem um organismo altamente capaz de se moldar aos

ambientes flutuantes (MANCUSO, 2019). Esse mecanismo de “aprendizagem”, sejam por sinais químicos, elétricos ou transcricionais, é conhecido como memória, aclimação, condicionamento ou *priming* (estado de alerta) (THELLIER; LUTTGE, 2013; CRISP et al., 2016; ZUO; AHAMMED; GUO, 2023). Diversos trabalhos demonstram que sucessivos estresses durante o desenvolvimento das plantas podem melhorar a resposta em relação ao estresse anterior (VIRLOUVET et al., 2018; GALVIZ; RIBEIRO; SOUZA et al., 2020) ou a outro estresse (*crossover*) (WALTER et al., 2013; HOSSAIN et al., 2020; ROSSATTO et al., 2023). Dentre os vários fatores que participam no mecanismo de memória incluem: modulações dos seus níveis transcricionais (DING et al., 2012; VIRLOUVET et al., 2018; KIM et al., 2020), marcas de metilações de citosinas em regiões promotoras do DNA, regulação por ncRNAs (LÄMKE; BAURLE, 2017; SRIVASTAVA et al., 2021), alteração na dinâmica dos carboidratos não estruturais (CNEs) (SANTOS et al., 2021; 2022), ajuste hormonal (MARCOS, 2018a, 2018b; WANG et al., 2021; ROSSATTO et al., 2023), sinalização de canais de cálcio (KNIGHT; BRANDT; KNIGHT, 1998), na ativação de enzimas antioxidantes (MENCONI et al., 1995; RAMÍREZ et al., 2015; AULER et al., 2021), nos parâmetros fotossintéticos (TANKARI et al., 2021; FUENTE et al., 2023), entre outras.

Diante deste panorama, a investigação do perfil de expressão de genes relacionados à memória do estresse, em especial aqueles responsivos a desidratação, emergiu como um campo de pesquisa fascinante. O crescente número de publicações acerca desse tema reforça a importância dos genes de memória como alvos a serem utilizados no melhoramento genético vegetal, visando plantas cada vez mais tolerantes aos estresses abióticos. Neste contexto, a transcriptômica, juntamente com a análise da expressão diferencial via RT-qPCR têm sido metodologias amplamente utilizadas para este propósito (GUEDES et al., 2019).

Tendo em vista que estudos sobre a dinâmica fisiológica, bioquímica e molecular de espécies nativas da Caatinga ainda sejam escassos, este trabalho buscou compreender os mecanismos de memória em *C. Pyramidale* submetida a ciclos de HD nas sementes e no seu crescimento vegetativo, visando maior tolerância a seca.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- ✓ Avaliar os mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares relacionados à memória ao déficit hídrico na Cantigueira (*Cenostigma pyramidale*) pela imposição de ciclos de hidratação e desidratação nas sementes e plantas jovens.

2.2 Específicos

- ✓ Compreender como as sementes de *C. Pyramidale* se tornam viáveis em bancos de sementes no solo após estresses recorrentes de seca.
- ✓ Analisar a influência dos ciclos de Hidratação e Desidratação (HD) nos parâmetros germinativos de sementes da *C. Pyramidale*.
- ✓ Investigar a eficiência do condicionamento por ciclos de HD (na fase germinativa e vegetativa), como estratégia para melhorar a resistência da *C. Pyramidale* aos efeitos adversos da desidratação contínua durante a fase juvenil da espécie.
- ✓ Avaliar a dinâmica dos Carboidratos Não Estruturais (CNEs) no acúmulo e no armazenamento de energia (açúcares solúveis e amido) nos diferentes tecidos da *C. Pyramidale* tanto na fase de reidratação como durante os períodos de deficiência hídrica.
- ✓ Escrutinar um grupo de genes candidatos para análise *in silico* no transcriptoma da *C. Pyramidale*, além de avaliar a expressão diferencial destes, via RT-qPCR em plantas submetidas ao ciclo HD em relação ao controle.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Condições edafoclimáticas na Caatinga

A Caatinga compõe um dos seis biomas Brasileiros, estendendo-se pelos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Piauí, Sergipe e o norte de Minas Gerais, ocupando aproximadamente 10% do território nacional (IBGE, 2019). É uma região ecologicamente e evolutivamente heterogênea, constituindo um repositório importante de biodiversidade, com características distintas e identidade própria (da SILVA et al., 2018a; FERNANDES et al., 2020). Embora composto por elementos florísticos de diferentes biomas (Savanas, Florestas Tropicais, Campos Rupestres e Floresta Tropical Sazonalmente Seca) (da SILVA, et al., 2018a), a baixa precipitação pluvial anual (distribuída em intervalos curtos e irregulares) caracteriza a Caatinga como uma Floresta Tropical Sazonalmente Seca (QUEIROZ, 2009).

Nesses ambientes (semiáridos), a germinação e o estabelecimento inicial de plântulas são fortemente influenciados, principalmente, por fatores abióticos (como temperatura, disponibilidade hídrica, luminosidade e/ou propriedades físico-química do solo) (ABUD et al., 2010; SILVA et al., 2017; ALMEIDA et al., 2020; BONFIM et al., 2021; MORO et al., 2021).

As temperaturas elevadas interferem na qualidade, estrutura e diversidade do ecossistema, incluindo solo, ar e a vegetação (VICENTE-SERRANO et al., 2020). Tal condição é acompanhada por uma cascata de sinalizações envolvendo fatores físicos, como: alta radiação solar, baixa umidade do ar, aumento da evapotranspiração, alteração no balanço hídrico e a deficiência hídrica, culminando no estresse por deficiência hídrica em sementes e plantas (SANTOS et al., 2022). A redução de água no solo ocasiona a diminuição da solubilidade de íons, impactando de maneira direta na cinética de germinação das sementes e a capacidade do transporte de sais pelos tecidos vasculares das plantas (ZANDALINAS et al., 2020).

Apesar da pouca disponibilidade hídrica ser um fator recorrente em ambientes de clima árido e semiárido, as projeções climáticas revelam aumentos significativos nas temperaturas globais, influenciando diretamente sobre a gravidade dos períodos de seca, cada vez mais severos e frequentes (DAI, 2013; VICENTE-SERRANO et al 2020). Neste sentido, é crescente a preocupação acerca dos impactos provocados

pela deficiência hídrica, uma vez que representa um dos fatores ambientais mais ameaçadores à sobrevivência e à produtividade vegetal (XU et al., 2019).

3.2. Germinação de sementes (com enfoque na Caatinga)

Ao considerar o ciclo de vida da planta, a água é um elemento primordial no processo germinação de sementes, pois reativa o metabolismo respiratório, hidratando os tecidos e promovendo a turgescência celular. Esta, por sua vez, estimula o desenvolvimento embrionário e, eventualmente, a protrusão radicular, marcando o final do processo germinativo (LECHOWSKA, et al., 2019; NASCIMENTO; MEIADO, 2021).

As altas temperaturas e a deficiência hídrica, representam dois fatores ambientais mais críticos que influenciam no sucesso germinativo, principalmente em ambientes áridos e semiáridos (DANTAS et al., 2020). A temperatura é responsável por desencadear enzimas-chaves específicas e reações bioquímicas (CARVALHO; NAKAGAWA 2012; CARRERA-CASTAÑO et al., 2020; NASCIMENTO; DANTAS; MEIADO, 2021), podendo promover o atraso da emergência radicular e/ou aumento de perda de água pelas sementes (SANTOS; ZONETTI, 2009). Segundo Bewley e colaboradores (2013), a temperatura considerada ótima para germinação é aquela em que resulta em maior número de sementes germinadas, em um menor período de tempo, embora uma faixa ótima de temperatura esteja relacionada ao local de ocorrência no período de dispersão e das estratégias germinativas.

Além disso, a germinação das sementes de cada espécie ocorre em uma faixa específica de temperatura, proposta como temperaturas cardeais, sendo: temperatura base (T_b), é a temperatura mínima necessária para a germinação ocorrer, temperatura ótima (T_o), cujo a germinação é mais rápida e a temperatura máxima ou teto (T_c), caracterizada pela temperatura mais alta na qual as sementes podem germinar (ALVARADO; BRADFORD, 2002). Na catingueira, o final da maturação das sementes ocorre no final da estação de seca. Assim, com a retomada das condições ideais de umidade, as sementes tornam-se aptas para germinar dentro de 48 horas (DANTAS et al., 2008), mesmo sob condições de temperaturas mais altas (30-35°C), em comparação às espécies de ecossistemas mais úmidos (MEIADO et al., 2012; 2016; DANTAS et al., 2020), o que reforça sua condição de tolerância a esses ambientes.

Avaliando os efeitos de diferentes temperaturas sob a germinação de algumas

espécies da família Fabaceae ocorrentes na Caatinga (*Anadenanthera colubrina*, *Enterolobium contortisiliquum*, *Pityrocarpa moniliformis* e *Pterogyne nitens*), Nascimento e colaboradores (2021) verificaram melhores respostas na germinação sob temperaturas de $>10 < 40^{\circ}\text{C}$. Temperaturas fora dessa faixa afetaram drasticamente a porcentagem germinação das sementes (NASCIMENTO et al., 2021). Além disso, a alternância da temperatura não só promoveu tolerância à seca em *Mimosa ophthalmocentra* (NOGUEIRA et al., 2018), como também promoveu maiores taxas germinativas de duas cactáceas do gênero *Discocactus* (*D. bahiensis* e *D. zehntneri* subsp. *Zehntneri*), cuja temperatura ótima de germinação variou de $25-35^{\circ}\text{C}$ (NASCIMENTO; MEIADO, SIQUEIRA-FILHO, 2018). Considerando-se que a temperatura da superfície do solo geralmente é mais alta (mesmo no período chuvoso) na Caatinga, esse pode ser um dos principais fatores que interferem no número, velocidade e a sincronia da germinação (CONTRERAS-QUIROZ et al., 2016).

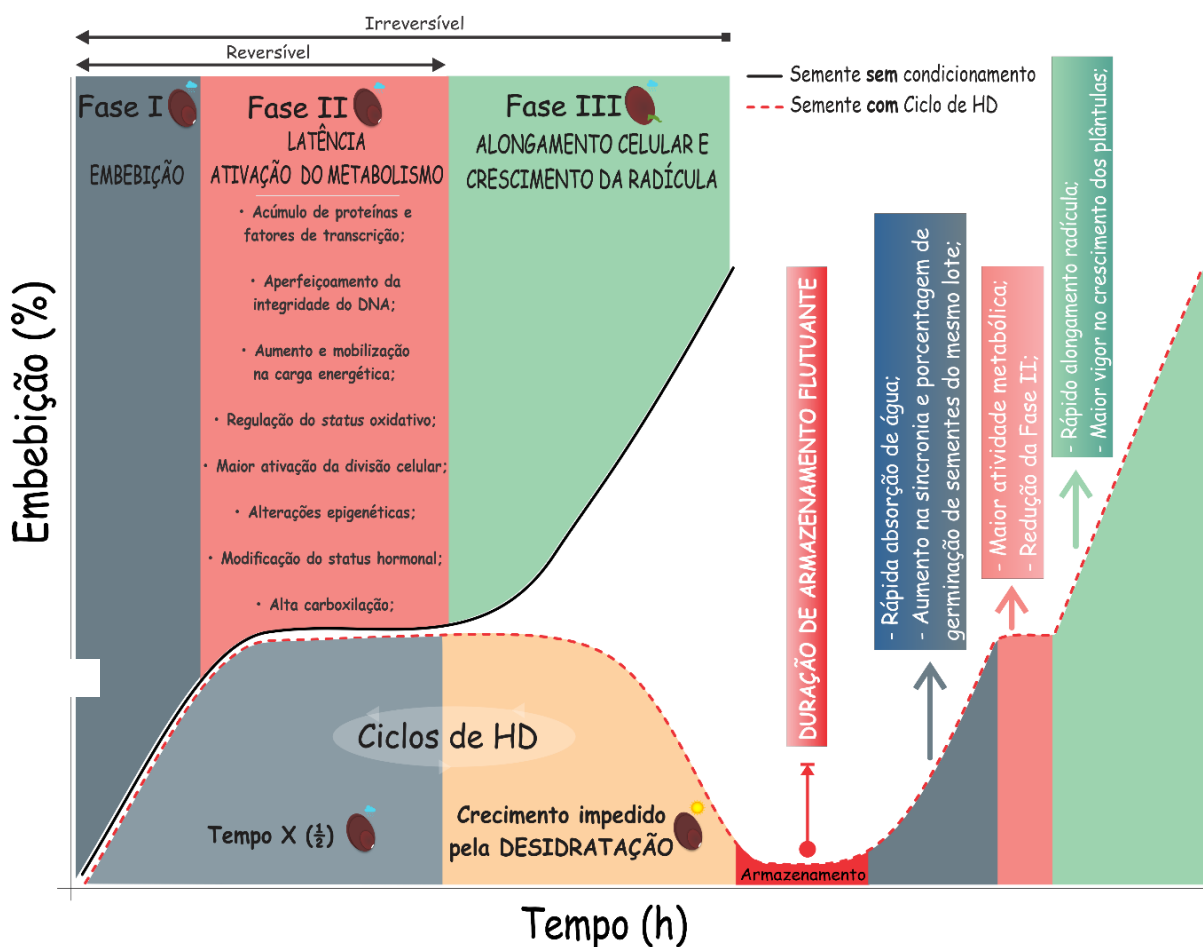
A irregularidade das chuvas e elevada taxa de evapotranspiração também podem resultar no acúmulo de sais no solo. Esse tipo de estresse reduz a capacidade das sementes em absorver água, podem afetar negativamente a germinação, as taxas de estabelecimento e crescimento das plântulas, juntamente com inúmeras alterações metabólicas causadas pela seca (MEIADO, 2014). O excesso de íons no solo provoca o estresse osmótico, cujo compromete a capacidade de absorção de água pela semente, além de alterações na mobilização das reservas armazenadas, a organização estrutural das proteínas (IBRAHIM, 2016) e/ou promovendo efeitos tóxicos do Na^+ e íons Cl^- na semente (KHAJEH-HOSSEINI; POWELL; BINGHAM, 2003) que podem atrasar ou inibir a germinação. Além disso, as irregularidades nas precipitações do ambiente sujeitam as sementes a ciclos de hidratação descontínua, a qual desempenham um papel vital na persistência e na variabilidade populacional das espécies (MEIADO et al., 2012).

Outros fatores, como o tegumento da semente e a sua espessura impermeável, também podem dificultar a absorção de água pela semente (ARAÚJO et al., 2006) e, por consequência, a nutrição do embrião. Por outro lado, a “dormência tegumentar” promove a proteção das sementes, tanto para sua dispersão, como para seu estabelecimento em ambientes hostis, uma habilidade adaptativa que lhes permite sobreviver em bancos de sementes por períodos mais longos (PENFIELD, MacGREGOR, 2017).

Assim, uma vez que as condições ambientais se tornam favoráveis, a primeira

fase do mecanismo de germinação das sementes é a embebição, seguido da fase de latência e, por fim, o alongamento celular. Para algumas espécies, é estabelecido um padrão trifásico de absorção de água pelas sementes (SILVA et al., 2018; SRIVASTAVA et al., 2021), onde cada fase é responsável por um evento no processo de germinação. Para melhor compreensão o padrão trifásico é ilustrado na Figura 1.

Figura 1. Esquema representativo das fases e os eventos do processo de germinação, bem como a curva de embebição de sementes que não foram submetidas (sem *priming*) e que foram submetidas (pré-condicionadas; *priming*) aos ciclos de hidratação e desidratação (ciclos de HD).



Fonte: Adaptado de Lutts e colaboradores (2016).

Segundo a Figura 1, a fase I é caracterizada pela reativação do metabolismo (reparo do DNA, síntese proteica e modificações pós-tradicionais) por influência rápida ingestão passiva de água (LEMMENS et al., 2019). Em contrapartida, durante a Fase II, a semente encontra-se túrgida, estabilizando seu conteúdo hídrico (Figura 1). Neste estágio, observa-se uma fase de latência/platô, com acentuação da atividade

enzimática como α -amilase, endoxilanase e fitase (LEMMENS et al., 2019). Por fim, a Fase III surge com aumento da absorção de água (Figura 1) e, por consequência, aumento na atividade respiratória, resultando (em geral) na emergência da radícula e, consequentemente, o estabelecimento da plântula (TAIZ et al., 2017).

Diante esse panorama, compreender as respostas das sementes em face das pressões ambientais é de extrema importância, visto que os desafios futuros demandam estratégias de melhoramento de culturas eficazes, visando mitigar os danos causados pelas severas variações climáticas, as quais vêm influenciando em perdas expressivas nos rendimentos e na produtividade agrícola (BAILEY-SERRES et al., 2019).

3.3. Estratégias de pré-condicionamento de sementes

Estratégias que visem estimular a memória hídrica em sementes podem fornecer novos *insights* de respostas aos estímulos externos ambientais, abrindo caminhos para investigações futuras sobre a tolerância das espécies. Assim, uma série de metodologias de baixo custo de implementação, baseados no sistema imune vegetal, têm sido desenvolvidas, com o intuito de aprimorar a eficácia do processo de germinação de sementes (WOJTYLA et al., 2020).

A técnica de pré-condicionamento (ou *priming*) foi inicialmente apresentada por Heydecker e colaboradores (1973). Este método baseia-se na rápida absorção de água (e/ou solução osmótica) pelos tecidos embrionários, durante um período determinado na germinação (tempo estabelecido pela curva de embebição, ilustrado na Figura 1), seguida da desidratação, sem protrusão da radícula (NASCIMENTO; MEIADO, 2021).

No sistema de condicionamento, a embebição da semente não deve suceder a fase II (ver Figura 1) do processo de germinação. Com uma embebição incompleta, ocorre o acúmulo e a síntese de RNAs, proteínas e enzimas (α - e β -tubulinas para divisão celular), mobilização energética e ativação precoce do sistema antioxidante (FAROOQ et al., 2021a). Segundo estudos, o condicionamento fisiológico de sementes pode aumentar a taxa de germinabilidade e uniformidade, produzir mudas mais vigorosas, melhora a foto-assimilação, a qualidade nutricional dos grãos (biofortificação), além de estabelecer respostas transcricionais frente aos estresses bióticos e abióticos (FAROOQ et al., 2019).

Os métodos de preparo de sementes têm como finalidade alcançar uma maior taxa (%) de germinação de sementes em um curto período de tempo e, por consequência, gerar mudas tolerantes aos ambientes desafiadores. Esses métodos podem ser categorizados em duas principais abordagens: físicas (como radiação ionizante; ondas eletromagnéticas; ondas ultrassônicas; e campos magnéticos) e convencionais (que incluem os ciclos de hidratação e desidratação, halocondicionamento; osmocondicionamento; biocondicionamento; nutricaocondicionamento; condicionamento por hormônios; condicionamento de matriz sólida; e outras fontes orgânicas) (SHER et al., 2019).

3.2.1. Ciclos de Hidratação e Desidratação (ciclos de HD)

Em ambientes áridos e semiáridos, o mecanismo de absorção de água das sementes ocorre de maneira intermitente devido à imprevisibilidade das chuvas nessas regiões (como previamente mencionado fundamentação teórica), as sujeitando a condições recorrentes de ciclos de hidratação descontínua. Os ciclos de hidratação descontínua podem ser simulados experimentalmente (ver Figura 1), cujo tratamento tem sido referido como ciclos de hidratação ou desidratação (ciclos de HD) ou hidrocondicionamento (*hidropriming*) (NASCIMENTO et al., 2021; SANTOS; LIMA; MEIADO, 2023).

Essa técnica é reconhecida por sua simplicidade e custo acessível, uma vez que as sementes são previamente embebidas em água, por um período de tempo definido, completando a fase I e/ou II do processo germinativo, seguido pela interrupção da germinação por meio da secagem, até que retornem a sua massa inicial (KHALID et al., 2019). Os de ciclos de HD têm demonstrado melhorias significativas na porcentagem (%) de germinação, velocidade média de germinação (VMG), tempo médio de germinação (TMG), sincronia, vigor, uniformidade, longevidade das sementes e tolerância ao déficit hídrico (por meio de memória hídrica) (DUBROVSKY, 1998; LIMA et al., 2018; NICOLAU et al., 2020; SARMENTO et al., 2020; NASCIMENTO et al., 2021).

Estudo com sementes de plantas nativas da Caatinga (*C. pyramidalis*, *Cnidioscolus quercifolius*, *Spondias tuberosa*, *Cereus jamacaru* DC. subsp. *jamacaru*, *Amburana cearensis* e *E. Contortisiliquum*), revelaram memória hídrica após tratamento com ciclos de HD, sendo representadas pelo menor TMG, maior

sincronização e velocidade de germinação (MEIADO, 2013). Em um estudo recente, Santos, Lima e Meiado (2023) constataram que as sementes de *Xiquexique gounlei* subsp. *gounellei* originárias da região de Canindé de São Francisco, quando submetidas aos ciclos de HD tiveram sua germinabilidade favorecidas e foram mais tolerantes ao déficit hídrico, em contrastes com as sementes de outra população. Os autores observaram que ambas as populações exibiram distintos padrões de germinação quando sujeitas ao déficit hídrico simulado (PEG 6000), indicando que essas variações podem ter ligações direta com as oscilações sazonais e às particularidades do ambiente onde as plantas progenitoras produzem e disseminam suas sementes (SANTOS; LIMA; MEIADO, 2023). Segundo Lima e Meiado (2017), a memória de hidratação depende fortemente das condições edafoclimáticas do ambiente onde as espécies estão sendo estabelecidas. Isso ocorre devido ao fato de que os estímulos ambientais podem excitar os metabólitos ou transcritos para respostas mais eficazes em situações de estresses subsequentes.

Fatores intrínsecos também podem influenciar no condicionamento, uma vez que sementes armazenadas por longos períodos podem perder a sua viabilidade, como observado em *Aspidosperma pyrifolium* (uma árvore nativa da Caatinga). Segundo Santos e Dantas (2021), lotes mais novos de sementes dessa espécie foram favorecidos pelos ciclos de HD, quando comparado a lotes mais antigos.

O número de ciclos de HD é outro fator que desempenha um papel crítico na germinação e no subsequente estabelecimento de plântulas de algumas espécies, podendo ter efeitos positivos ou negativos (MEIADO, 2013). O uso de dois ciclos de HD proporcionou maior biomassa (tanto no número de folíolos, como de folhas) em plântulas de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), conforme relatado por Santos e Meiado (2016). Sementes de fruta-pinha (*Annona squamosa*) expostas a três ciclos de HD tiveram um aumento na germinabilidade e na taxa de emergência das mudas, além do TMG que foi reduzido, entretanto, para a sincronia não houve diferenças significativas (JÚNIOR; FREITAS; SILVA, 2021).

Em contrapartida, Nicolau e colaboradores (2020) observaram que a promoção de quatro ciclos de HD inviabilizou a qualidade fisiológica das sementes de *Pityrocarpa moniliformis*. No entanto, para *Mimosa caesalpiniiifolia* a resposta não foi significativa. Embora que não houve efeitos positivos nos parâmetros de germinação, a promoção de três ciclos de HD em sementes de *Triplaris gardneriana* (Polygonaceae) resultou em benefícios no desenvolvimento das mudas em condições de restrição hídrica ao

longo de quatorze dias (FREITAS; MEIADO; DA SILVA, 2021). O efeito mais notável foi o aumento significativo no diâmetro do caule, com um incremento de 87% em relação às mudas de sementes que não foram submetidas aos ciclos de HD (FREITAS; MEIADO; DA SILVA, 2021). Isso reforça ideia de que os ciclos de HD não estão simplesmente ligados à melhoria dos parâmetros de germinação, mas também podem desempenhar um papel fundamental no estágio inicial de estabelecimento de mudas das espécies (LÓPEZ-URRUTIA et al., 2014; LIMA, 2019; JÚNIOR; FREITAS; SILVA, 2021).

Assim, os aspectos empíricos relacionado aos protocolos dos ciclos de HD indicam que os efeitos positivos nem sempre são consistentes, pois a avaliação abrangente de todos os fatores (biológicos, fisiológicos e bioquímicos) é essencial e varia de acordo com a espécie, a variedade e o lote das sementes. Por outro lado, a integração do manejo de áreas cultivadas com a aplicação dos ciclos de HD pode constituir uma valiosa estratégia, não apenas para fomentar o desenvolvimento agrícola regional, mas também para contribuir significativamente para a restauração de áreas degradadas.

3.4. Deficiência hídrica versus Memória ao estresse

Segundo Galviz, Souza e Lüttge (2022) o termo “estresse” pode ser definido como os desafios pelos quais uma planta enfrenta no tempo e espaço, por estímulos externos (contínuos/descontínuos), cujo o resultado (*eustress* ou *distress*) dependerá das informações adquiridas ao longo do processo. Entretanto, fatores como o tempo, a duração, o genótipo, a severidade e a velocidade de desenvolvimento, sem dúvida, têm papel fundamental na determinação de como uma planta responde às condições de estresse (AULER et al., 2021). Assim, as plantas estão sob constantes ajustes no seu metabolismo, em virtude da dinâmica dos estresses transitórios e recorrentes ao longo de todo seu desenvolvimento (CRISP et al., 2016).

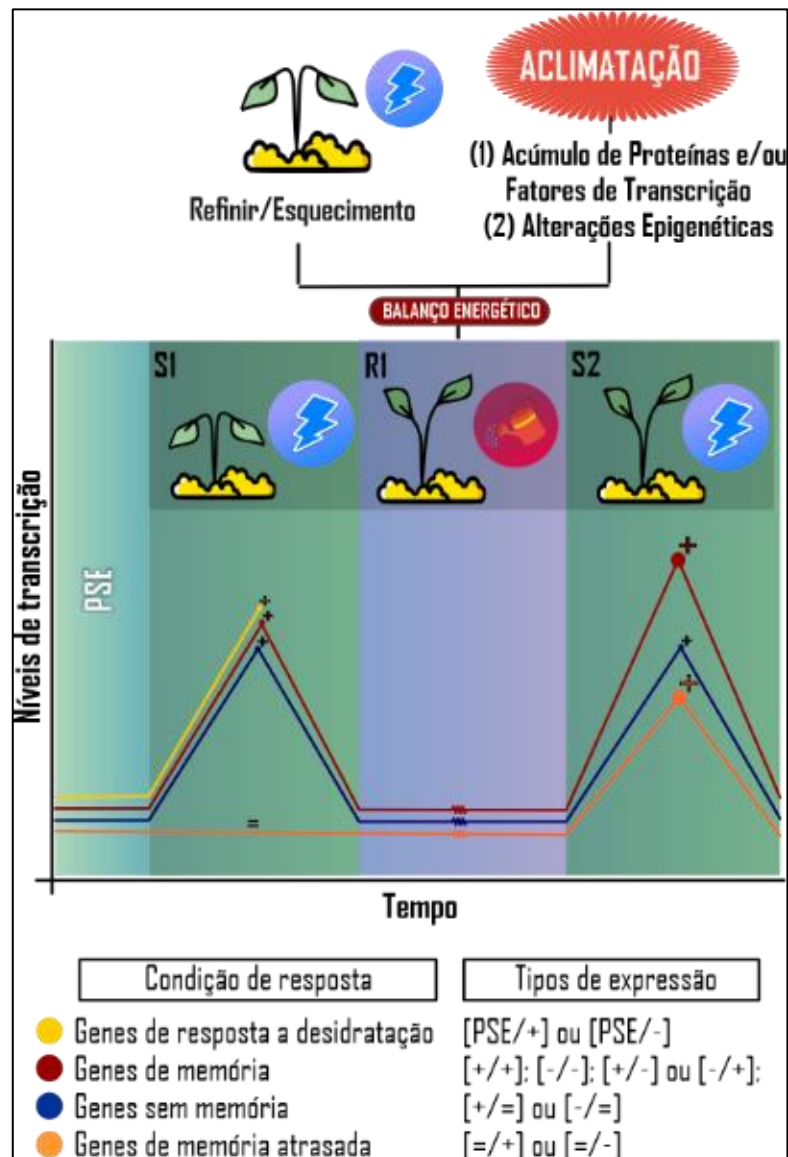
Desta forma, sob um cenário de estresse flutuante (como períodos de seca frequentes associados a curtos intervalos de reidratação), a sobrevivência das plantas depende criticamente da capacidade de “lembrar”, “aprender” ou “recordar” o estímulo metabólico ou transcricional do estresse anterior. Isso é capaz de alterar sua maquinaria operacional, preparando-a para uma resposta mais eficiente contra os estresses subsequentes. Este processo adaptativo é chamado de “*Priming*”

(condicionamento), memória e/ ou aclimatação, cujo objetivo é aumentar a tolerância das plantas aos estresses ambientais (FLETA-SORIANO; MUNNÉ-BOSCH, 2016; GALVIZ, RIBEIRO, SOUZA et al., 2020; LIU; QUAN; BARTELS, 2022).

Os termos atribuídos à memória de estresse geralmente são baseados no estágio da planta. Quando ocorre o *priming* e no modo de herança, sendo tanto na mesma geração (somática) e/ou na(s) próxima(s) geração(ões) (intergeracional ou transgeracional), visando adaptação e sobrevivência (GALVIZ, SOUZA E LÜTTGE, 2022; KAMBONA et al., 2023). Os processos fisiológicos e moleculares envolvidos nos estímulos de *priming* que estão diretamente envolvidos na memória, ainda não são totalmente compreendidos. Estes dependem de inúmeros fatores, seja a potência ou duração dos estímulos, assim como condições intrínsecas das plantas (HILKER et al., 2016). Entretanto, sabe-se que a memória envolve múltiplas modificações em níveis fisiológicos, proteômicos, transcricionais e mecanismos epigenéticos, que podem ocorrer em qualquer período do ciclo de vida, incluindo a germinação, o crescimento vegetativo e reprodutivo (KAMBONA et al., 2023).

Ao contrário dos animais, as plantas não possuem estruturas específicas para armazenar informações adquiridas ao longo do seu ciclo de vida, seus mecanismos de memória apresentam um caráter sistemático e dissociativo (MICHMIZOS; HILLOTI, 2019; LIU; PARISE et al., 2022). Dessa forma, a medida que ocorre o primeiro evento de estresse, durante período de reidratação é estabelecida uma relação “custo-benefício” onde a informação pode ser “esquecida” ou “recuperada” (Figura 2). Assim, em um segundo evento de estresse (caso o estímulo transcricional armazenado seja recrutado), a resposta ao novo estímulo tende a ser mais rápida e efetiva (aclimatação) (Figura 2).

Figura 2. Esquema do mecanismo de memória ao estresse por seca. (S1) percepção ao primeiro estresse; (R1) reidratação/ hidratação; (S2) segundo estresse; (Genes de memória) expressão em S1 significativamente distinto de S2, *Up* ou *Down*; (Genes de memória atrasada/tardia) expressão similar entre plantas sem estresse e S1. Apresentam potencial para perceber sinais de estresse em S2.; (Genes sem memória) após o “alívio” do estresse (em R1), a resposta em S2 é análoga a S1; (=) expressão semelhante; (+) genes induzidos; (-) genes reprimidos; (PSE) planta sem estresse.



Fonte: O autor.

Cabe salientar que o desempenho da planta nem sempre é positivo, uma vez que para armazenar a informação é exigido um alto custo metabólico, o qual pode ser refletido sobre o seu crescimento mais lento, devido às alterações hormonais (DING et al., 2014; LI, et al., 2019), no acréscimo de biomassa (SANI et al., 2013; MARCOS et al., 2018ab), nos rendimentos de grãos (ABID et al., 2018) e em alteração nas taxas

fotossintéticas (CHEN et al., 2020; RIBEIRO et al., 2021). Por outro lado, a planta pode “esquecer” a memória armazenada, exigindo dela maior performance e mais energia para o seu desenvolvimento, tornando-a mais vulnerável aos estresses subsequentes, com danos ainda maiores (CRISP et al., 2016; LIU; QUAN; BARTELS, 2022).

3.5 Mecanismos moleculares associados à memória hídrica

Como já mencionado, as plantas sujeitas a múltiplos estresses ambientais respondem mais rapidamente a nível transcricional, em comparação com plantas que não foram previamente expostas a essas condições desafiadoras. Em geral, genes de memória hídrica (à seca) apresentam níveis de expressão mais elevados, sendo que após um período de reidratação (hidratação), a expressão volta aos seus níveis basais (ver Figura 2). Por outro lado, o nível de expressão de alguns genes pode ser induzido ou reprimido (UP ou DR) em resposta à ciclos de hidratação e desidratação (ciclos de HD) (JACQUES et al., 2021). Isso faz com que a planta module a expressão de muitos genes (do inglês, *drought-modulated genes*), cujo efeito dependerá do tipo e severidade do estresse (DING, FROMM, AVRAMOVA, 2012). Tais genes apresentam mecanismos regulatórios complexos, em vários níveis, incluindo níveis transcricionais, pós-transcricionais, tradução e pós-tradução (ZHENG et al., 2017; WANG et al., 2021). Segundo Mayer e Charron (2020), a alteração na expressão gênica enfatiza o conceito de memória transcricional (MT), cujos mecanismos reguladores variam a um único estímulo ou a estímulos de estresse repetitivos.

Mecanismos epigenéticos (modificações covalentes de DNA e histonas, afetando a atividade transcricional da cromatina sem alterar a sequência do DNA) também figuram como importantes reguladores da expressão gênica. Tal mecanismo também está intimamente relacionado à modulação da expressão de genes em resposta à deficiência hídrica (LÄMKE, BÄURLE, 2017). Atuando sobre a transcrição de genes relacionados, fatores epigenéticos proporcionam respostas mais efetivas ao estresse subsequente, evidenciando um papel primordial na memória hídrica (GODWIN, FARRONA, 2020).

Dentre as principais modificações epigenéticas que resultam na modulação da expressão gênica estão a metilação do DNA, modificações de histonas e a participação de ncRNAs (RNAs não-codificantes) (HILKER; SCHUMULLING, 2019; WOJTYLA et al., 2020). A metilação do DNA consiste, basicamente, na adição de um

grupo metil no carbono 5 da citosina, formando 5-metilcitosina (5mC). Em plantas, a metilação ocorre amplamente nos contextos CG, CHG e CHH (onde: H = A, C ou T) (LAW; JACOBSEN, 2010), sendo considerado um dos mecanismos regulatórios mais conhecidos por atuar no funcionamento do genoma e na adaptação aos estresses abióticos.

Estudos com metilação do DNA em *Boea hygrometrica* (uma planta com notável habilidade em tolerar condições extremas, como seca e alta radiação solar, considerada um modelo para estudos de mecanismos de tolerância à seca) revelou implicações potenciais na memória do estresse por seca (SUN et al., 2021). Modificações de histonas estão associadas à vários genes de estresse induzidos. Por exemplo, a metilação da lisina 4 da histona H3 (H3K4) marca os genes responsivos a desidratação, agindo como um fator de modulação da memória ao estresse (LIU et al., 2014). ncRNAs (RNA não-codificantes) também participam da regulação, tanto nos níveis transcricionais quanto pós-transcricionais, desempenhando um papel importante no controle epigenético (THIEBAUT; HEMERLY; PERREIRA, 2019). Essa classe envolve os lncRNAs (RNAs longos não-codificantes), os quais podem servir como moléculas estruturais ou reguladoras de genes responsivos a estresses abióticos, os quais atuam como moléculas endógenas estabilizando mRNA alvos (CHEN; ZHON; QI, 2021).

Fatores de Transcrição (FTs) também são elementos fundamentais na memória hídrica em plantas (DING et al., 2012). Uma melhor compreensão dos mecanismos associados à MT e sua ampla aplicação no melhoramento genético vegetal é de grande importância, uma vez que as informações podem ser eficientemente utilizadas na obtenção de genótipos mais tolerantes, como no uso biotecnológico (KAMBONA et al., 2023).

Neste sentido, muitos genes de memória hídrica têm sido explorados em diferentes espécies, a exemplo de: *Arabidopsis thaliana* (DING et al., 2013), milho (DING et al., 2014; VIRLOUVET et al., 2018), café (GUEDES et al., 2018), arroz (LI et al., 2019), nabo (LUO et al., 2020), batata (CHEN et al., 2020), soja (KIM et al., 2020), entre outras.

Plantas de *Arabidopsis* durante estresse por desidratação recorrente apresentaram melhor performance (resposta rápida/eficiente) em eventos subsequentes de seca, como evidenciado pelo aumento na expressão dos genes *RD29A* (*Responsive to Dehydration*) e *RAB18* (*responsive to ABA*) (DING, FROMM,

AVRAMOVA, 2012), os quais são considerados marcadores responsivos à desidratação (LIU, FROMM, AVRAMOVA, 2014).

FTs regulados por ABA apresentaram indução sob estresse por desidratação. Embora houve redução na transcrição, tanto *RD29B* quanto *RAB18*, os níveis de expressão desses genes foram maiores durante o estresse recorrente (até S4), em relação S1, indicando a que a memória transcricional foi mantida (DING, FROMM, AVRAMOVA, 2012). Quinases e desidrinas também apresentam papel sobre a modulação de FTs a exemplo do *AP2/ERF*, *NAC*, *bHLH* e *WRKY* (DING et al., 2014).

Nesse sentido, diversos grupos de pesquisa têm concentrado seus esforços no estudo de genes relacionados à memória de deficiência hídrica, especialmente em culturas de importância agrícola. O condicionamento de soja (*Glycine max* L.) a restrição hídrica promoveu a indução de 392 transcritos relacionados à memória à esse tipo de estresse. Estes incluem FTs, proteínas *LEA* e proteínas da família *PP2C* (KIM et al., 2020). Outros 613 genes foram reprimidos, a exemplo daqueles envolvidos no processo fotossintético e do metabolismo primário (KIM et al., 2020). Em arroz (*Oryza sativa*) estresses consecutivos de seca induziram a expressão de lncRNAs, sugerindo o importante papel dessas moléculas reguladoras no processo de memória e, portanto, na tolerância à seca a curto prazo (LI et al., 2019).

A regulação por mecanismos de metilação do DNA, via sinalização hormonal e biossíntese de metabólitos secundários (LI et al., 2019) também tem sido amplamente relatado. Uma excelente performance da *H3K4me3* e *Ser5P* RNA polimerase II paralisada durante as fases de reidratação, desempenham papéis-chaves na resiliência futura aos estresses por desidratação, atuando diretamente na regulação dos genes de memória (DING, FROMM, AVRAMOVA, 2012; LIU et al., 2014). Segundo Kim e colaboradores (2012), o estresse potencializa a RNA-Pol II, a acetilação e metilação de histonas (*H3K9ac* e *H3K4me3*, respectivamente), influenciando sobre atividade gênica, modulando genes de memória, como observado nos genes *RD29A*, *RD20* e *AtGOLS2*. O nível de marcas *H3K4me3* e a produção de mRNA foram diminuindo progressivamente à medida que as plantas foram reidratadas. Resultados semelhantes foram descritos em sorgo (*Sorghum bicolor*) onde foi verificado que a memória a desidratação a longo prazo foi associada às marcas *H3K4me3*, em plantas sujeitas à ciclos de HD (MANTOAN et al., 2020).

3.6 Déficit hídrico e a dinâmica dos carboidratos não estruturais

Uma porção do carbono obtido da fotossíntese é convertida em carboidratos, direcionados para o crescimento e desenvolvimento das plantas, uma vez que são constituintes fundamentais na geração de energia (PIPER; MORENO-MEYNARD; FAJARDO, 2022). Dessa forma, a capacidade de equilibrar as exigências metabólicas, através do armazenamento de carboidratos em tecidos lignificados, permitem com que as plantas lenhosas consigam se manter durante períodos de restrição hídrica (DIETZE et al., 2014).

Os carboidratos podem ser categorizados em duas classes principais: carboidratos estruturais (CE), que consistem em moléculas extensas e de complexas cadeias, exercendo função na estabilização e na constituição da biomassa vegetal (folhas, caules e raízes), sendo seus principais componentes estruturais a celulose, hemicelulose e a pectina (HARTMANN; TRUMBORE, 2016). Já, os carboidratos não estruturais (CNEs) constituem elementos importantes para metabolismo primário e secundário das plantas, fornecendo substrato para seu desenvolvimento e o funcionamento metabólico (HARTMANN; TRUMBORE, 2016). Assim, a distribuição de CNEs em diferentes órgãos da planta, compõe um dos fatores essenciais para manutenção do turgor da célula, promovendo tolerância à deficiência hídrica (DU; LU; XIA, 2020). Os CNEs são classificados de acordo com sua função, seja no acúmulo de açúcares solúveis totais (AST) ou armazenamento de amido (QUENTIN et al., 2015). Os AST (ex. glicose, frutose e sacarose) apresentam baixo peso molecular, o que confere a essas moléculas maior dinamismo e versatilidade em processos respiratórios, de defesa, sinalização e transporte (ROSELL et al., 2021).

Considerando as constantes mudanças climáticas, a redução do teor de carbono nas plantas pode ocasionar impactos negativos em seu crescimento e desenvolvimento (NARDINI et al., 2016), promovendo, portanto, deficiência na produção de AST, os quais são fundamentais na manutenção das membranas celulares, eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs), osmoproteção, além do importante papel como sinalizadores moleculares (MARTÍNEZ-VILALTA et al., 2016; TOMASELLA et al., 2019).

Nesse mesmo contexto, a maior parte do amido, um polissacarídeo, é armazenada em tecidos lignificados (como caules e raízes) e, sob condições adversas (a exemplo do déficit hídrico) podem ser degradados por enzimas específicas, para

servir na biossíntese dos AST, satisfazendo as demandas metabólicas das plantas (DONG; BECKLES, 2019; OMARI, 2022). Um exemplo é a espécie lenhosa, *Fraxinus ornus*, onde a exposição prolongada à deficiência hídrica promoveu uma redução de 50% em CNEs no caule, em comparação às plantas controles (TOMASELLA et al., 2019). Segundo os autores, a depleção do amido indica um possível mecanismo adaptativo da planta frente a imposição do estresse (TOMASELLA et al., 2019). Em *Eucalyptus urophylla* a deficiência hídrica promoveu reduções de 9,4% e 4,5% de CNEs nas folhas e caules, respectivamente (CHEN et al., 2020). Mudanças de *Quercus pubescens* Willd. tiveram concentrações elevadas de AST nos seus tecidos lignificados durante períodos de seca intensa (OUYANG et al., 2021), sugerindo uma possível conversão de amido em AST, indicando assim prováveis ajustes osmóticos em detrimento de uma alocação ativa de carbono para armazenamento (OUYANG et al., 2021).

Estudos apontam que espécies lenhosas da Caatinga utilizam da dinâmica de conversão dos CNEs e a sua distribuição heterogênea em distintos tecidos, como forma de tolerar a deficiência hídrica (HE et al., 2020), embora esse mecanismo de “particionamento” dos CNEs durante o déficit hídrico em plantas lenhosas ainda não sejam bem compreendidos (SANTOS et al., 2021). Um aumento significativo no teor de açúcares solúveis foram observados no tecido radicular e nas folhas de *C. Pyramidale* durante um período de seca severa (SANTOS et al., 2021). Além disso, Santos e colaboradores (2022) também notaram que plantas de *C. microphyllum* quando submetidas a ciclos recorrentes de seca apresentaram aumento 5 vezes de açúcares solúveis no caule e raízes. Com base neste estudo, o sistema radicular parece desempenhar um papel crucial como órgão armazenador de CNEs em plantas lenhosas, além de ser um importante regulador do *status* hídrico durante períodos prolongados de seca (SANTOS; NICODEMOS; SANTOS et al., 2022).

Plantas lenhosas, líderes em biomassa acima do solo, adaptam suas estratégias na alocação de carbono de acordo com princípios evolutivos ecológicos de *trade-off* (DIETZE et al., 2014). Portanto, a dinâmica dos CNEs reflete na capacidade das plantas lidarem com as condições ambientais desafiadoras, tornando-se primordiais para garantir a sobrevivência durante momentos críticos (HARTMANN; TRUMBORÉ, 2016; MARIANA et al., 2022).

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dessa dissertação estão apresentados na forma de artigo de experimental.

4.1 ARTIGO 1:

A hidratação descontínua e seus efeitos na expressão transcricional e no acúmulo de compostos protetores de estresse em *Cenostigma pyramidale*

Paulo Vitor Galdino da Silva¹; Mariana Santos de Souza Gonçalves²; Ana Carolina da Rocha Oliveira; Mauro Guida dos Santos²; Marciel Teixeira de Oliveira²; Marcos Vinicius Meiado³; Ana Maria Benko Iseppon¹; Valesca Pandolfi^{1*}.

¹*Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética, Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, Recife, Brasil*

²*Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Laboratório de Fisiologia Vegetal, Recife, Brasil*

³*Universidade Federal de Sergipe, Departamento de Biociências, Laboratório de Fisiologia de Sementes, Itabaiana, Brasil.*

RESUMO

O déficit hídrico afeta negativamente a germinação e o estabelecimento inicial das mudas. Entretanto, sementes submetidas à hidratação descontínua (ciclos de HD) e plantas à desidratação hídrica intermitente tendem a induzir processos fisiológicos, metabólicos e transcricional que as capacitam a enfrentar futuros estresses abióticos, evento popularmente conhecido como memória de hidratação. Assim, o presente estudo avaliou a influência dos ciclos de HD em sementes e da desidratação hídrica intermitente em plantas jovens de *Cenostigma pyramidale* (Catingueira) na possível formação da memória de hidratação, em aspectos fisiológicos, bioquímicos e transcricional. Dessa forma, as sementes de Catingueira foram submetidas a 0 (controle) e 3 ciclos de HD no tempo X ($\frac{1}{2}$ da fase I) para estimular a memória de hidratação. Posteriormente, as sementes foram sujeitas a germinação em condições de déficit hídrico simulado (PEG 6000) em seis potenciais osmóticos (0,0; -0,2; -0,4; -

0,6; -0,8 e 1,0 MPa). Foram avaliados os seguintes parâmetros de germinação: Porcentagem, Sincronia, Tempo Médio de Germinação e Velocidade Média de Germinação. Por outro lado, para analisar a memória na fase juvenil, as plantas foram divididas em quatro tratamentos: Ctr (Controle), PHD (Plantas submetidas aos ciclos de HD), SHD (Sementes submetidas aos ciclos de HD) e SPHD (Sementes e Plantas submetidas aos ciclos de HD). Após 6 meses de cultivo das mudas, para estimular a memória de hidratação, os tratamentos PHD e SPHD foram submetidos a quatro desidratação hídrica intermitente, em contrapartida, os grupos Ctr e CG permaneceram sob hidratação contínua. Após o término do 'condicionamento', as plantas foram analisadas quanto o armazenamento de carboidratos não estruturais nos diferentes tecidos (folha, caule e raiz) e conteúdo hídrico relativo foliar durante a reidratação e na desidratação contínua. Por outro lado, o diferencial de expressão dos genes foi analisado apenas a reidratação (R4). Sementes condicionadas com ciclos de HD tiveram todos os parâmetros de germinação favorecidos em contraste com sementes não condicionadas. Notavelmente, a capacidade das sementes de resistir à seca aumentou, à medida que o potencial osmótico se tornou mais negativo. A análise das plantas de *C. Pyramidale* na fase juvenil revelou que quando submetidas ao tratamento SPHD tiveram maiores acúmulo de açúcares solúveis durante R4, assim como um aumento no armazenamento de amido na região radicular e um maior conteúdo interno de água durante desidratação contínua (CD). Além disso, a análise transcricional durante a reidratação revelou cinco transcritos GM6 (E3 ubiquitin-protein ligase CpRZF1), GM7 (PYR_PYL_RCAR_like) e GM9 (PRK11107_GAF) associados a memória hídrica. Nossos resultados indicam que a hidratação descontínua das sementes e a desidratação hídrica intermitente em plantas jovens de *C. pyramidale* estão entre os fatores associados à resiliência de plantas que vivem em ambientes áridos e semiáridos. Sendo assim, a tecnologia de hidrocondicionamento utilizada neste estudo pode servir como uma alternativa para melhorar as espécies cultivadas, com o objetivo principal de promover o aumento da tolerância à seca.

Palavras-chave: germinação; hidratação descontínua; memória hídrica.

INTRODUÇÃO

Dentre os principais estresses abióticos, a deficiência hídrica destaca-se como uma das mais restritivas para o estabelecimento e desenvolvimento vegetal (Manavalan et al., 2009). Em espécies cultivadas, por exemplo, o déficit hídrico resulta na diminuição da produtividade, promovendo perdas agrícolas consideráveis, comprometendo a segurança alimentar global (Kumar, 2013). Assim, compreender a dinâmica fisiológica, bioquímica e molecular da tolerância à seca em sementes e plantas adaptadas a climas áridos e semiáridos pode ser uma estratégia eficaz para mitigar os efeitos dos estresses ambientais, viabilizando o desenvolvimento de espécies agrícolas tolerantes à pouca disponibilidade hídrica.

Em regiões áridas e semiáridas, como a Caatinga, os níveis de precipitação oscilam e sujeitam as sementes da flora local a eventos intermitentes de seca (Lima; Oliveira; Meiado, 2018; Santos; Lima; Meiado, 2023). Esse evento ocorre devido à elevada temperatura superficial do solo, induzindo a rápida evaporação da água e, consequentemente, interrompendo o processo de germinação, mecanismo conhecido como ciclos de hidratação descontínua (Lima; Meiado, 2018; Freitas; Silva, 2024). Os ciclos de hidratação descontínua podem ser promovidos em ambientes laboratoriais, sendo referidos como ciclos de hidratação e desidratação (ciclos de HD) (Santos; Lima; Meiado, 2023), cuja metodologia é bem conhecida em análises de tolerância à deficiência hídrica durante a germinação e desenvolvimento vegetal de diferentes ecossistemas (Dubrovsky, 1996; 1998; Nicolau et al. 2020; Nascimento et al. , 2021).

Os ciclos de HD podem desencadear respostas bioquímicas e fisiológicas de 'memória hídrica' que podem resultar em uma sincronização e uniformidade durante a germinação sob tais condições de estresse (Sarmiento et al., 2020; Júnior; Freitas e Silva, 2021). Convém ressaltar que, o número de ciclos de HD em que as sementes são expostas também deve ser considerado, uma vez que pode ser benéfico ou prejudicial à germinação (Nicolau et al. 2020).

Além disso, durante longos períodos de restrição hídrica, espécies lenhosas e caducifólias da Caatinga mostram-se capazes de armazenar e mobilizar carboidratos não estruturais (CNEs) para tecidos não fotossintéticos (Dietze et al., 2014; Santos et al., 2021; 2022), característica essa, de grande importância no processo de tolerância à seca (Bessonova; Yakovieva-nosar, 2022). Segundo Thalmann e Santelia (2017), condições de déficit hídrico no solo conduz à uma redução da absorção de CO₂ pelos

estômatos, influenciando a eficiência fotossintética e o metabolismo dos CNEs. Tendo em vista que o amido é a forma predominante de armazenamento de carbono não estrutural, a conversão mútua de amido em açúcar solúvel pode induzir mudanças adaptativas que ajudam a mitigar os efeitos negativos da seca (Dong e Beckles, 2019; Omari, 2022). Santos e colaboradores (2022) observaram que durante o estresse severo houve um aumento significativo na partição de açúcares solúveis nas zonas do caule e raiz de *Cenostigma microphyllum*, desencadeando uma resposta de tolerância ao déficit hídrico imposto.

A deficiência hídrica também interfere na expressão de inúmeros genes, incluindo genes de memória hídrica, cuja modulação da expressão faz-se necessária para que a planta possa responder rapidamente a estresses subsequentes (Thellier; Luttge, 2013; Virlouvet et al., 2018; Liu et al., 2021; Sadhukhan et al., 2022). Ding e colaboradores (2012) adotaram a terminologia “genes treináveis ou memória transcricional” para descrever plantas que recrutam transcritos específicos em resposta a um primeiro evento de estresse, os quais serão recrutados para uma resposta mais efetiva ao segundo estresse. Estudos relatam que a primeira percepção ao estresse pode deixar uma impressão no seu genoma (associada à uma melhor performance) por meio de uma adaptação/aclimatação bem sucedida (FORESTAN et al., 2020; ZUO; AHAMMED; GUO, 2023). Em *A. thaliana* um conjunto de genes são reconhecidamente responsáveis (induzidos) à desidratação, incluindo os genes *RD29A*, *RD29B*, *RAB18* e *COR15A* (DING et al, 2012). Destes, os genes *RD29B* e *RAB18* apresentaram maiores níveis de expressão (>3X) durante quatro estresses a deficiência hídrica subsequentes (S4) em comparação à primeira imposição de estresse (S1). A ativação desses genes foi associada às modificações de histonas (*H3K4me3*), mostrando sua participação na memória primária do estresse por deficiência hídrica nesta espécie (DING et al., 2012). Similarmente, Liu e colaboradores (2014) verificaram que a modificação da *H3K7me3* foi fundamental para a memória transcricional dos genes *RD29B* e *RAB18*.

A maioria dos genes de memória superexpressos em soja foram associados à biossíntese de trealose (importante fator de retenção de água em células vegetais), proteínas LEA (auxilia na tolerância à dessecação), proteínas da família PP2C (importante neutralizador de proteínas quinases), além de fatores de transcrição (FTs) (KIM et al, 2020). Por outro lado, genes associados aos processos fotossintéticos, que codificam proteínas associados às vias metabólicas primárias e metabolismo

hormonal foram reprimidos (KIM et al., 2020). A modulação gênica (Up e down regulados) também é influenciada por sinalização hormonal. Segundo Chen e colaboradores (2020), após supressão hídrica repetida em batata (*Solanum tuberosum* L.), o ácido abscísico (ABA) promoveu a indução dos genes *PP2C* e *SnRKs*. Em nabo (*Brassica rapa* L.), o efeito de memória por ciclos repetidos de desidratação promoveu a superexpressão do gene *P5CS1-2*, no segundo evento de estresse, resultando em maior acúmulo de prolina em relação ao estresse inicial (LUO et al., 2020). Segundo os autores, a retenção de *H3K4me3* no locus *P5CS1-2* foi fundamental para a memória transcricional durante o estresse subsequente. Os genes *ACS*, *ETR/CTT* e *ERF/AP2*, responsáveis pela manutenção e sinalização do etileno, bem como o crescimento radicular apresentaram maior expressão em plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) sob condicionamento de restrição hídrica (WANG et al., 2021)

Assim, considerando a notável capacidade adaptativa de *C. pyramidale* (Tul.) E. Gagnon & G.P. Lewis para ambientes com pouca disponibilidade hídrica (Vilela et al. 2021), o presente estudo avaliou os efeitos dos ciclos de HD sobre a germinação e plantas jovens (estágio vegetativo) na formação da memória hídrica desta espécie. Levantamos três hipóteses: i) sementes submetidas à ciclos de HD apresentam melhores parâmetros de germinação em comparação aos seus respectivos controles; ii) ciclos de HD estimulam o efeito de 'memória hídrica' das sementes, desencadeando tolerância ao déficit hídrico e iii) o condicionamento durante a fase germinativa e vegetativa (juvenil) das plantas de *C. pyramidale* possibilitam o maior armazenamento de CNEs em tecidos lignificados e a expressão de genes de memória, deixando uma marca de memória hídrica e permitindo maior tolerância ao déficit hídrico na espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de *C. Pyramidale* utilizadas neste estudo foram obtidas do Núcleo de Ecologia e Monitoramento Ambiental (NEMA), da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), em Petrolina, PE, Brasil.

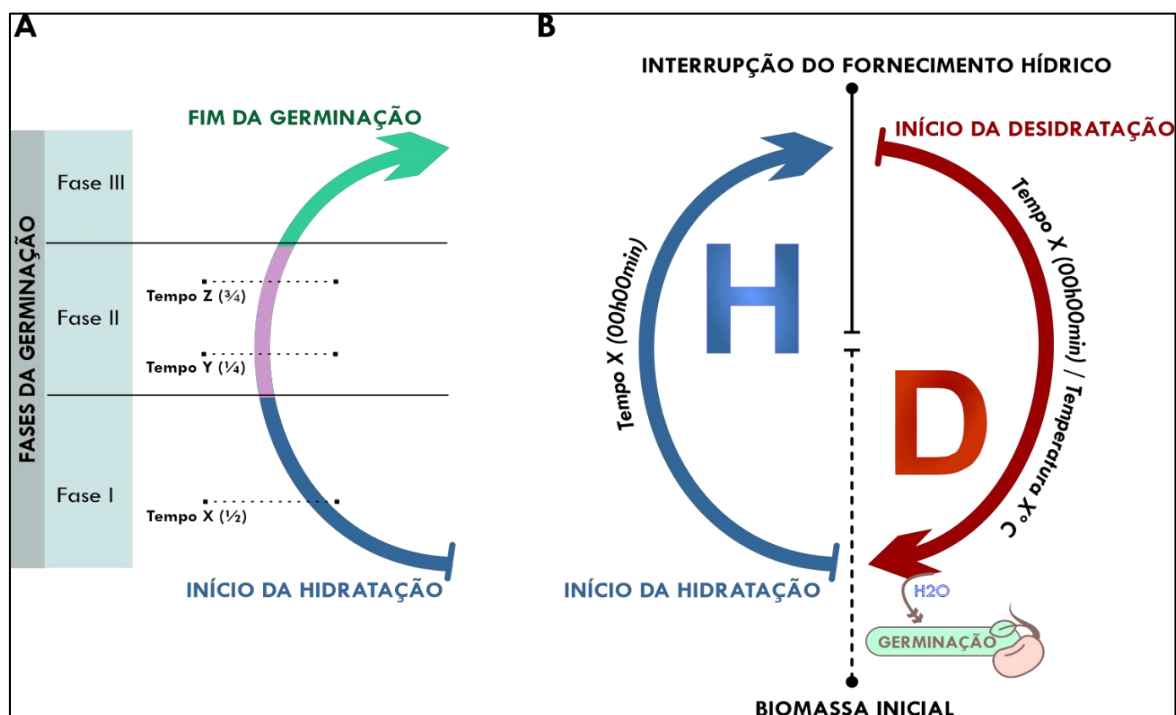
Análise da curva de hidratação e desidratação de sementes de C. Pyramidale

A curva de hidratação foi realizada com sementes de *C. Pyramidale*, previamente selecionadas (mesmo tamanho e coloração) e desinfestadas superficialmente através da imersão em uma solução de hipoclorito de sódio a 1,0 % (v / v), por 10 min, seguido por cinco lavagens em água destilada estéril e secas em papel filtro. Foram utilizadas 100 sementes, sendo 5 repetições de 20 sementes cada, onde foi realizada a pesagem da massa fresca (MF) de cada repetição em analisada.

Em seguida, as sementes foram colocadas para germinar em caixas de acrílico (11 x 11 x 3,5 cm), contendo papel filtro umedecido com água destilada estéril, e incubadas em câmara de germinação (equipamento TE-4013) à 25°C. A biomassa foi mensurada pesando-se as sementes em intervalos de 60 min, durante todo processo de germinação, sendo o final da germinação estabelecido com a visualização da protrusão da radícula (~3 mm) da primeira semente, independente da réplica/caixa (Figura 1A).

Obtida a curva de hidratação, foi possível determinar os tempos de hidratação (Figura 1A), a qual corresponde ao tempo X ($\frac{1}{2}$ da fase I), Y ($\frac{1}{4}$ da fase II) e Z ($\frac{3}{4}$ da fase II). O presente estudo teve como período de hidratação a metade da fase I ($\frac{1}{2}$) do processo germinativo, estágio estabelecido como “tempo X” (Lima, 2019).

Figura 1. Esquema representando: (A) o padrão trifásico do processo de germinação e seus respectivos tempos de hidratação; (B) tempos de hidratação para o condicionamento fisiológico das sementes.



Fonte: O autor.

A curva de desidratação também foi realizada com 100 sementes (5 caixas contendo 20 sementes cada). Após pesagem para obtenção de sua biomassa inicial, as sementes foram submetidas a hidratação (água destilada estéril) em câmara de germinação à 25°C por um período estabelecido de acordo com os dados obtidos da curva de hidratação ("tempo X"). Realizada a hidratação (Figura 1A), as sementes foram transferidas para 5 placas de petri (150 mm x 2,5 mm), previamente cobertas com papel alumínio, e mantidas em estufa à 37°C (para desidratação). As sementes foram pesadas em intervalos de 60 min, até que retornassem a sua biomassa inicial, obtendo-se, assim, seu respectivo tempo de desidratação.

O tempo "X" foi selecionado para promoção dos ciclos de HD, uma vez que trabalhos anteriores relatam um padrão consistente na aquisição de tolerância ao déficit hídrico (Lima et al., 2018; Oliveira, 2020; Lima; Meiado, 2023). Em seguida, as sementes foram submetidas a 3 ciclos de HD (Figura 1B) (estabelecidos de acordo com Oliveira, 2020), onde cada ciclo correspondeu a 8 horas de hidratação e 7 horas de desidratação, em estufa à 37°C.

Ciclos de HD e índices de germinação

Sementes da Catingueira foram divididas em dois grupos: (1) sementes submetidas aos ciclos de HD e (2) sementes não submetidas aos ciclos de HD. As sementes de ambos os tratamentos foram sujeitas à germinação em água destilada autoclavada (tratamento controle) e solução de polietileno glicol 6000 (PEG 6000) em potenciais osmóticos de -0,2; -0,4; -0,6; -0,8 e -1,0 MPa (Villela et al., 1991). Cada condição osmótica foi constituída por 5 repetições de 20 sementes cada, totalizando em 100 sementes por tratamento. As sementes foram colocadas para germinar em caixas do tipo 'gerbox' (19 x 19 x 10 cm de diâmetro) contendo duas camadas de papel filtro umedecidas com água destilada estéril (volume equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco). As caixas foram mantidas em estufa a 25°C (Villela et al., 1991), fotoperíodo de 12 horas. A protrusão da radícula foi o critério utilizado para quantificar o número de sementes germinadas. As sementes foram avaliadas diariamente, durante um período de 14 dias.

Os dados foram submetidos no software GerminaQuant 1.0 (MARQUES et al., 2015) para obtenção dos resultados referente aos parâmetros de germinação analisados (porcentagem de germinação; tempo médio de germinação – TMG; velocidade média de germinação – VMG; e sincronia). A normalidade e a homogeneidade das variâncias dos resíduos dos dados obtidos no experimento foram avaliadas por meio do teste de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente (RAZALI; YAP, 2011). Por fim, com o auxílio do programa STATISTICA 8.0 (StatSoft. Inc, Oklahoma, USA) os dados foram sujeitos à análise fatorial de variância com dois fatores (potenciais osmóticos e condicionamento da semente), com o índice de significância de 0,05.

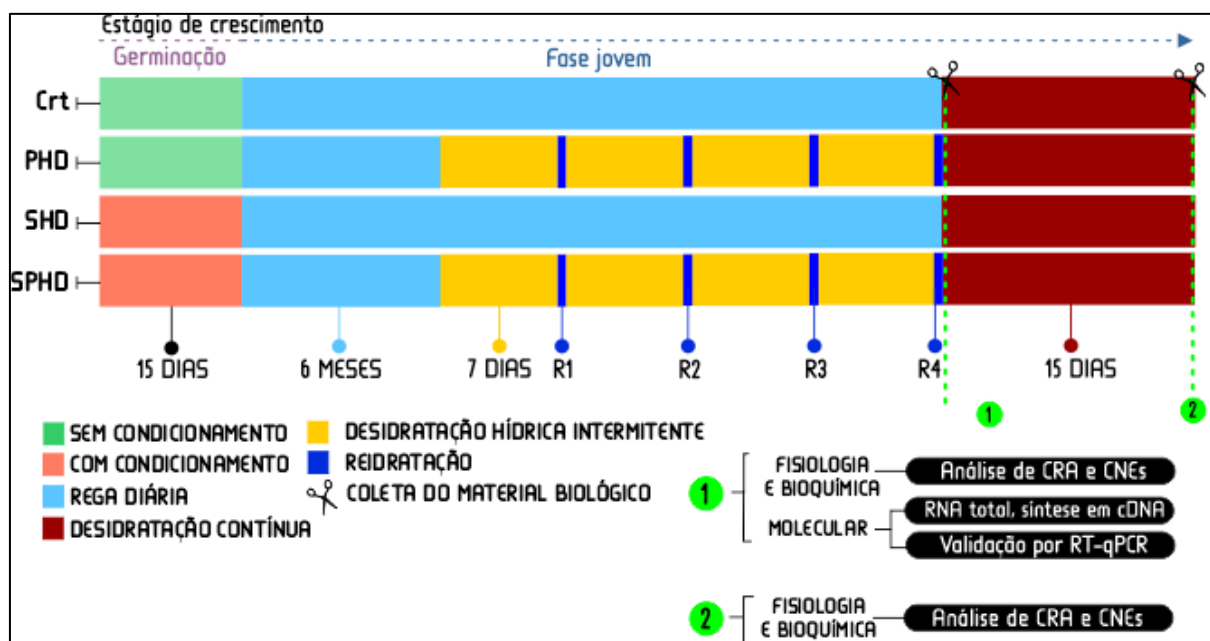
Ciclos de HD nas sementes (SHD) e nas plantas jovens (PHD) de C. pyramidale

Inicialmente, um conjunto de 16 sementes foram submetidas a ciclos de HD e 16 sementes não submetidas a ciclos de HD, sendo distribuídas em quatro tratamentos: Crt/Controle (sementes/plantas sem ciclos de HD); SHD (sementes submetidas a três ciclos de HD); PHD (plantas submetidas a quatro ciclos de HD); SPHD (sementes e plantas submetidas aos ciclos de HD) (Figura 2). Todas as sementes foram transferidas, individualmente, para tubos de ensaio de vidro tipo

(Pirex, 25 mm x 150 mm) contendo dois discos de papel filtro autoclavados e umedecidos com 2 mL de água destilada estéril. Os tubos foram mantidos a 25°C, sob fotoperíodo de 12 horas. Após 14 dias de germinação, as plântulas foram transferidas para vasos de 5 Kg, contendo areia lavada, e mantidas em casa de vegetação, com temperatura de 29°C (mesurada com termohigrômetro, Minipa MT-241, às 13 horas), sob luz natural e umidade relativa de 40-50%. As plantas foram irrigadas com 300 mL de água em um regime intercalado a cada dois dias sem intervalo, com suplementação de solução nutritiva de Hoagland a cada 15 dias.

Após 6 meses de desenvolvimento, as plantas relativas aos tratamentos PHD e SPHD foram submetidas a 4 períodos de deficiência hídrica, os quais corresponderam a 7 dias sem irrigação (quadro amarelos, Figura 2) intercalados por 1 dia de reidratação (R1-R4, Figura 2). Ao final do 6º mês, todas as plantas foram submetidas à deficiência hídrica (suspensão da irrigação) durante 15 dias (retângulos vermelho escuro, Figura 2). Foram realizadas duas coletas, uma no período R4 e após os 15 dias de desidratação contínua (Figura 2), todas as amostras foram armazenadas em ultrafreezer -80°C.

Figura 2. Esquema do delineamento experimental para análises fisiológicas, bioquímicas e moleculares de plantas de *C. Pyramidale* após ciclos de hidratação e desidratação (ciclos HD), às quais as plantas foram submetidas: Sementes/plantas sem ciclos de HD (Ctr/Controle); sementes submetidas a três ciclos de HD (SHD); plantas submetidas a quatro ciclos de HD (PHD); sementes e plantas submetidas aos ciclos de HD (SPHD). As coletas (folha, raiz e caule) estão indicadas pela figura de uma tesoura. (CRA) Conteúdo relativo de água foliar; (CNEs) Carboidratos Não Estruturais; (R1-R4) Reidratação.



Análise de parâmetros fisiológicos e bioquímicos

Conteúdo relativo de água (CRA) foliar

O Conteúdo relativo de água foliar (CRA) de todos os tratamentos foi mensurado a cada 3 dias, no período da manhã (antes do nascer do sol; “*predawn*”), a fim de avaliar o *status* hídrico da Catingueira, durante os 15 dias de deficiência hídrica. Discos foliares (~3 cm de diâmetro, a partir de ramos plagiotrópicos, localizado no quinto nó, a contar do ápice do ramo) foram coletados e pesados em balança de precisão (*adventurer* OHAUS), obtendo-se a massa fresca (MF). Em seguida, os discos foliares foram hidratados (por imersão em água deionizada) e, após 24 horas procedeu-se a pesagem para mensuração da massa turgida (MT). As amostras (discos foliares) foram transferidas para estufa (B.O.D) à 70°C por 48 horas, para então, determinar a massa seca (MS). As medidas do CRA foram calculadas através da fórmula: $CRA (\%) = (MF - MS) / (MT - MS) \times 100$, conforme descrito por Barrs e Weatherley (1962).

Açúcares solúveis totais (AST)

Quatro plantas por tratamento (Figura 2) foram selecionadas para coleta das folhas (bem desenvolvidas), segmentos do caule (casca e lenho) e raízes (finas) durante o turno vespertino (às 15:00 h). As amostras foram congeladas em N₂ líquido e armazenadas em ultrafreezer -80°C. Amostras de 25 mg (de cada tecido) foram utilizadas para avaliação do conteúdo de AST. A pesagem foi realizada em balança analítica de precisão. As amostras foram maceradas e homogeneizadas em 1,2 mL de etanol a 80%, vortexadas e incubadas por 90 min a 70°C em banho-maria (ROBBINS; PHARR, 1988). Em seguida, foram centrifugadas à 15.000 g à 25°C, por 10 min e o sobrenadante transferido para tubo de 2,5 mL (*eppendorf*). O procedimento foi repetido, através da ressuspensão do *pellet* em 600 µL de etanol 80% por 30 min. Por fim, as amostras (de todos os tecidos, em todos tratamentos) foram novamente centrifugadas à 15.000g à 25°C, por 10 min. O conteúdo das duas centrifugações (sobrenadantes) foram misturados e analisados com Geneses 10S UV-Vis (Thermo Scientific), no comprimento de onda de 490 nm, seguindo a metodologia descrita por Dubois e colaboradores (1956).

Teor de Amido

A fração insolúvel (proveniente da extração solúvel dos carboidratos, de todos os tratamentos e tecidos) foi suspensa em 1 mL de etanol a 80%, centrifugado a 15.000g à 25°C, por 10 min (está etapa foi repetida até obtenção do *pellet* purificado). Em seguida, foi adicionado 800 µL de KOH, 0,2 M ao *pellet* e as amostras foram incubadas à 95°C, por 2 horas. Estabelecido o pH 5.5, as amostras foram centrifugadas nas mesmas condições supracitadas. Por fim, o *pellet* foi hidrolisado (conversão amido - açúcar solúvel - glicose) pela adição de 10 U (unidades) da enzima *amiloglucosidase* (A1621, Sigma-Aldrich) durante 90 min à 55°C, sendo posteriormente analisado pelo método descrito por Dubois e colaboradores (1956). A concentração dos CNEs de cada tecido foi calculada pela adição das concentrações de açúcares solúveis totais e amido.

Análise estatística

O experimento foi conduzido de forma inteiramente casualizada, contendo quatro tratamentos, com 4 repetições cada, totalizando 16 plantas jovens para cada momento de coleta (R4 e SC). O teste de Shapiro-Wilk foi realizado assegurar a normalidade dos resíduos dos dados e o Levene para avaliar a homogeneidade das variâncias. A análise da variação do *status* hídrico de acordo com o tratamento, foi realizada uma ANOVA fatorial, tendo como variáveis preditoras os dias e os tratamentos. Para avaliar o acúmulo de CNEs nos tratamentos da R4 e desidratação contínua, foi realizada uma ANOVA fatorial, tendo como variáveis preditoras os tratamentos e os órgãos. As análises foram realizadas no Programa Statistica 8.0 (StatSoft. Inc, Oklahoma, USA).

Análise de expressão de genes de memória hídrica

Extração do RNA e síntese de cDNA

O RNA total do tecido radicular de *C. Pyramidale* dos tratamentos da primeira coleta (R4, Figura 2), foi extraído conforme o protocolo estabelecido por Chang e colaboradores (1993). A integridade do RNA foi avaliada através de eletroforese em

gel de agarose (1,5%). As amostras de RNA foram tratadas com DNase (DNA-free™ Kit DNase Tratamento & Remoção) (Invitrogen) e quantificadas em equipamento Qubit® 2.0 (Invitrogen). Alíquotas de 1 µg de RNA foram convertidas em cDNA, utilizando-se o kit GoScript™ Reverse Transcription Mix, Oligo(dT) (Promega), conforme as especificações do fabricante. As amostras de cDNAs foram sintetizadas em triplicata biológicas e técnicas e mantidas em freezer -20°C até a realização das análises de qPCR.

Análise de expressão via qPCR

Os genes identificados na literatura como associados à memória hídrica foram selecionados e avaliados no transcriptoma da *C. pyramidale* (Frosi et al., 2021), através de um alinhamento (BLAST), selecionando-se aqueles genes que apresentaram homologia, com base em seus domínios característicos. Como resultado dessa análise, foram identificados 13 transcritos (Tabela S1), os quais foram pré-avaliados com relação à eficiência. Para cada transcrito diferencialmente expresso (DE) *in silico* foram desenhados *primers*, através do programa Primer3 Plus (UNTERGASSER et al., 2007) e Primer-BLAST (YE et al., 2012), com os seguintes parâmetros: conteúdo de GC 50%, tamanho do *amplicon* entre 80 e 150 pb, temperatura de *melting* entre 40°C - 60°C e desenhados na junção éxon-éxon.

A análise de expressão por RT-qPCR foi realizada em equipamento LineGene 9600 (Bioer), utilizando o sistema de detecção SYBR Green. As reações foram preparadas em triplicatas biológicas e técnicas. As reações foram preparadas com 5 µL do Go-Taq qPCR Master Mix 2x (Promega), 1 µL de cDNA (1/10), 0,3 µL de cada primer (5 µM) e volume ajustado para 10 µL com H₂O ultrapura. As condições de ciclagem foram ajustadas para 95°C por 2 min, seguido por 40 ciclos à 95°C por 15s, 60°C por 60 s. A curva de *melting* foi gerada com a temperatura de amplificação variando de 65 - 95°C. As eficiências de amplificações foram determinadas a partir das curvas padrão geradas por diluições seriadas de cDNA (1/10, 1/100, 1/1000 e 1/10000) em triplicatas técnicas e calculadas por meio da equação $E=10^{(-1/\text{slope of the standard curve})}$ (RASMUSSEN, 2001). Seis genes de referência candidatos (GR) foram selecionados a partir dos estudos de Frosi e colaboradores (2021) e utilizados neste estudo, sendo: ARP3 (Actin-related protein 3); HAG2 (Histone acetyltransferase type B catalytic subunit); SAC1 (Suppressor of Actin); MYB4 (Transcription factor - MYB4);

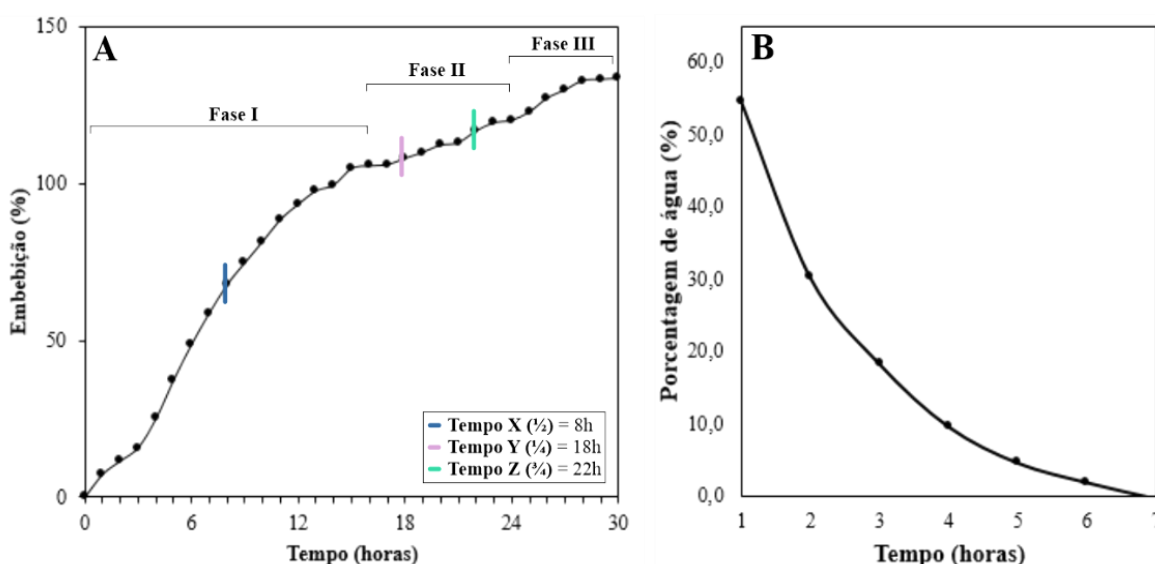
RSH1 (Relat/SPOT homolog1); VFB1 (Vier F-box protein1 At1g47056). A expressão relativa foi avaliada pelo programa REST (*Relative Expression Software Tool*, v.2.0.13; PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002). As análises de RT-qPCR seguiram as recomendações sugeridas pelo MIQE (*The Minimum Information for Publication of Quantitative RealTime PCR Experiments*) (BUSTIN et al., 2009), assegurando a máxima precisão experimental e clareza dos dados.

RESULTADOS

Análise da curva de hidratação e desidratação das sementes de C. pyramidale

A curva de embebição de *C. Pyramidale* teve duração de 30 horas, onde a fase I, II e III do processo de germinação compreendeu 16 h, 8 h e 6 h, respectivamente (Figura 3A). Com base nesses resultados, o tempo “X” correspondeu a 8 horas, o tempo “Y” a 18 horas e o tempo “Z” de 22 horas (Figura 3A). O período de desidratação das sementes, em que retrata ao retorno de sua biomassa inicial, foi de 7 horas à 37°C (Figura 3B).

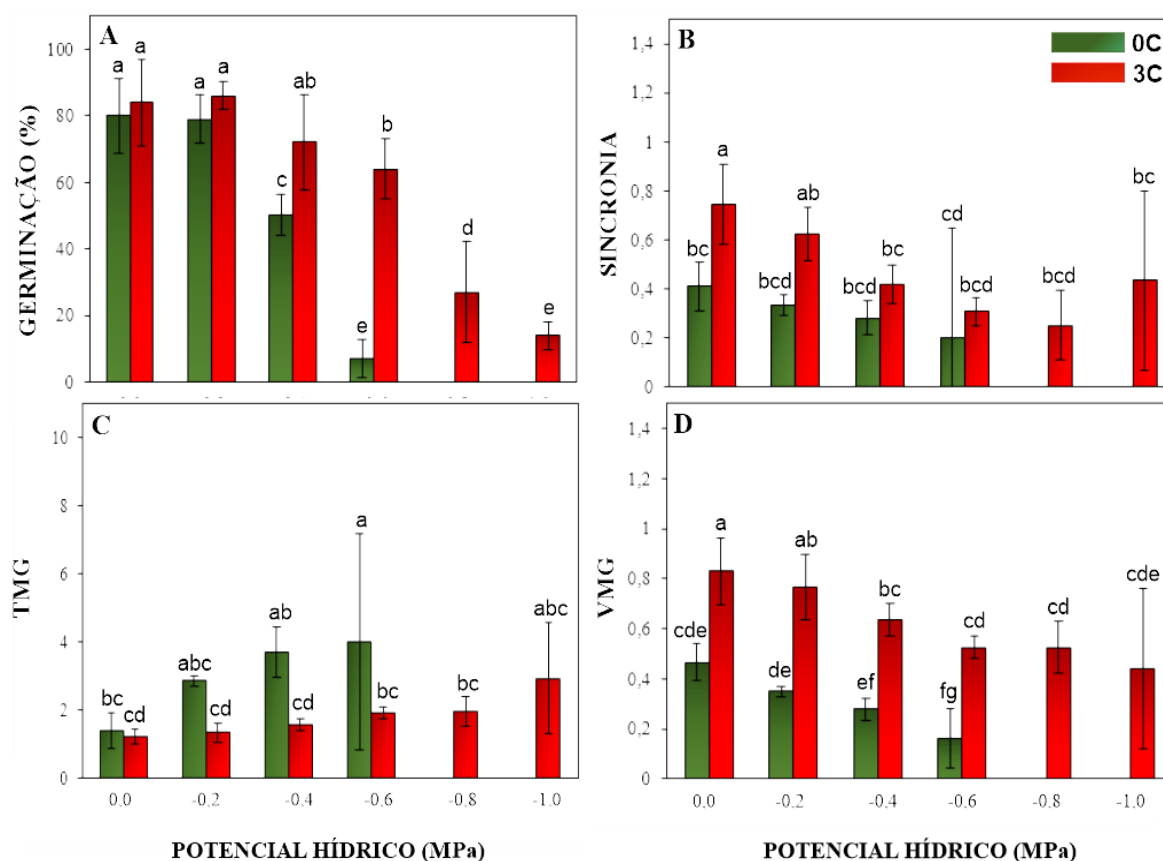
Figura 3. Curva de Embebição (A) e de desidratação (B) de sementes de *C. pyramidale*.



Influência dos ciclos de HD sobre a germinação

O condicionamento de sementes de *C. pyramidale* a três ciclos de HD favoreceu todos os parâmetros de germinação (Figura 4), confirmando nossa hipótese inicial. Além disso, sementes não condicionadas quando germinadas em potenciais inferiores a -0,8 MPa tiveram sua germinação inibida, ao contrário das sementes condicionadas, as quais responderam à germinação em todos os potenciais osmóticos avaliados (00 a -1,0 MPa) (Figura 4).

Figura 4. Parâmetros de germinação de sementes de *C. pyramidale* condicionadas a três ciclos de HD e à diferentes potenciais osmóticos. (A) porcentagem de germinação; (B) sincronia da germinação; (C) Tempo médio de germinação (TMG) e Velocidade média de germinação (VMG). 0C (Sementes não condicionadas aos ciclos de HD); 3C (Sementes submetidas a três ciclos de HD). As letras apontam as diferenças estatísticas entre os grupos conforme o teste de Newman-Keuls, e os valores representam a média das repetições ($n=5 \pm$ erro padrão).



Em termos de porcentagem de germinação (Figura 4A), podemos observar que não houve diferença significativa entre as sementes condicionadas e não condicionadas nos potenciais osmóticos de -0,0 a -0,2 MPa. No entanto, houve um aumento significativo de 44%, 814%, 37% e 14% em sementes submetidas a ciclos de HD, quando comparadas a sementes sem ciclo de HD, em potenciais osmóticos de -0,4; -0,6; -0,8 e -1,0 Mpa, respectivamente (Figura 4A).

Em termos de sincronia (Figura 4B), quando comparados sob as mesmas condições osmóticas (-0,0 MPa, apenas com água destilada estéril sem PEG 6000), sementes submetidas aos ciclos de HD (3C) teve significativamente a germinação mais ordenada e uniforme, em cerca de 85%, em comparação a sementes não submetidas aos ciclos de HD (0C). Nos potenciais de -0,8 e -1,0 MPa, a sincronia das

sementes submetidas aos ciclos de HD aumentou aproximadamente 25% e 43% em comparação com as sementes não condicionadas (0C) germinadas nas mesmas condições osmóticas (Figura 4B).

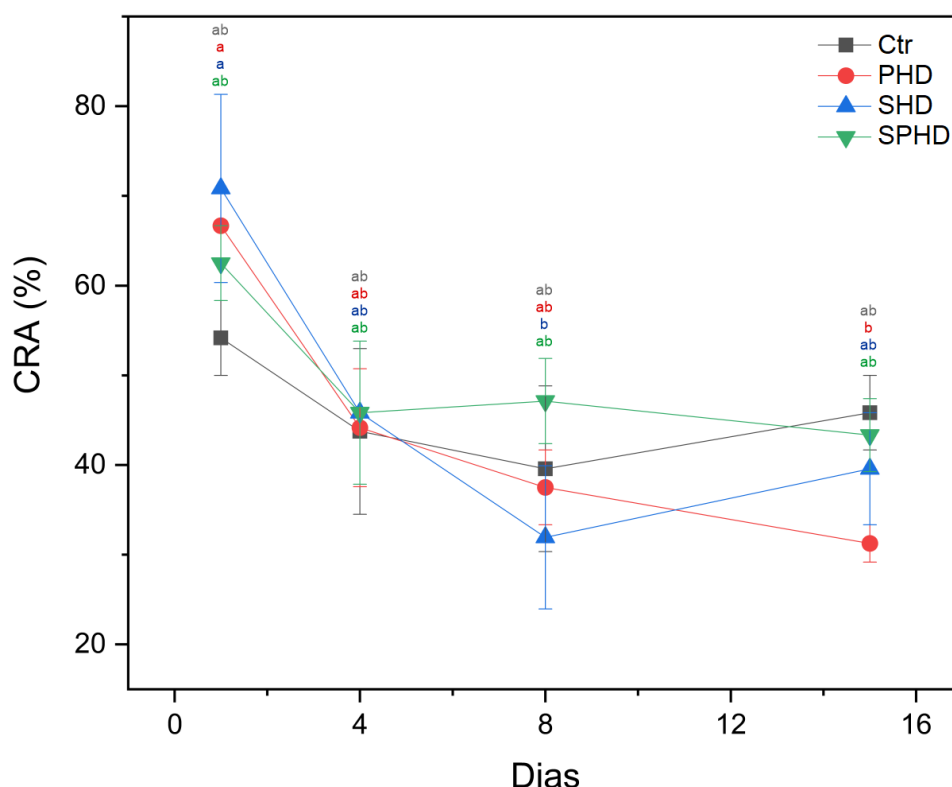
Sementes condicionadas (ciclos de HD) apresentaram Menor Tempo de Germinação (TMG). Quando em potenciais osmóticos de -0,4 e -0,6 MPa, estas apresentaram reduções significativas de TMG de 57% e 56%, respectivamente, quando comparadas às sementes não condicionadas (Figura 4C). Reduções estatisticamente significativas de 19% e 29% foram obtidas nos potenciais de -0,8 e -1,0 MPa, com respectivamente (Figura 4C).

Observa-se que as sementes condicionadas por ciclos de HD, ao serem avaliadas pelos parâmetros de sincronia e TMG, não evidenciaram os efeitos do estresse por deficiência hídrica impostos pelos diferentes potenciais osmóticos, ao contrário das sementes não condicionadas (0C) (Figura 4BC).

Os ciclos de HD também apresentou efeitos significativos na Velocidade Média da Germinação (VMG). Sementes submetidas a 3C apresentaram um aumento significativo na sua velocidade de germinação em todos os potenciais osmóticos analisados (0,0 MPa, 78%; -0,2 MPa, 123%; -0,4 MPa, 133,33%; -0,6 MPa, 225%; -0,8 MPa, 52%; e -1,0 MPa, 43%) (Figura 4D), em comparação com sementes não condicionadas (0C) germinadas sob o mesmo potencial osmótico. Sementes submetidas aos ciclos de HD tiveram um aumento significativo na velocidade de germinação em cerca de 78,26% e 65,21% nos potenciais de 0,0 e -0,2MPa, respectivamente, em relação a sementes não submetidas aos ciclos de HD germinadas em potenciais de 0,0 MPa (água destilada) (Figura 4D).

Conteúdo relativo de água foliar

Figura 5. Variação do Conteúdo Relativo de Água (CRA) foliar medidos antes do amanhecer em *C. pyramidale*, durante o período de 15 dias de desidratação contínua. As letras correspondem as diferenças estatísticas entre os tratamentos pelo teste de Newman-Keuls, bem como os valores sinalizam o valor médio para as repetições experimentais ($n=4 \pm$ erro padrão). Ctr (Controle), PHD (Plantas submetidas aos ciclos de HD), SHD (Sementes submetidas aos ciclos de HD) e SPHD (Sementes e Plantas submetidas aos ciclos de HD).



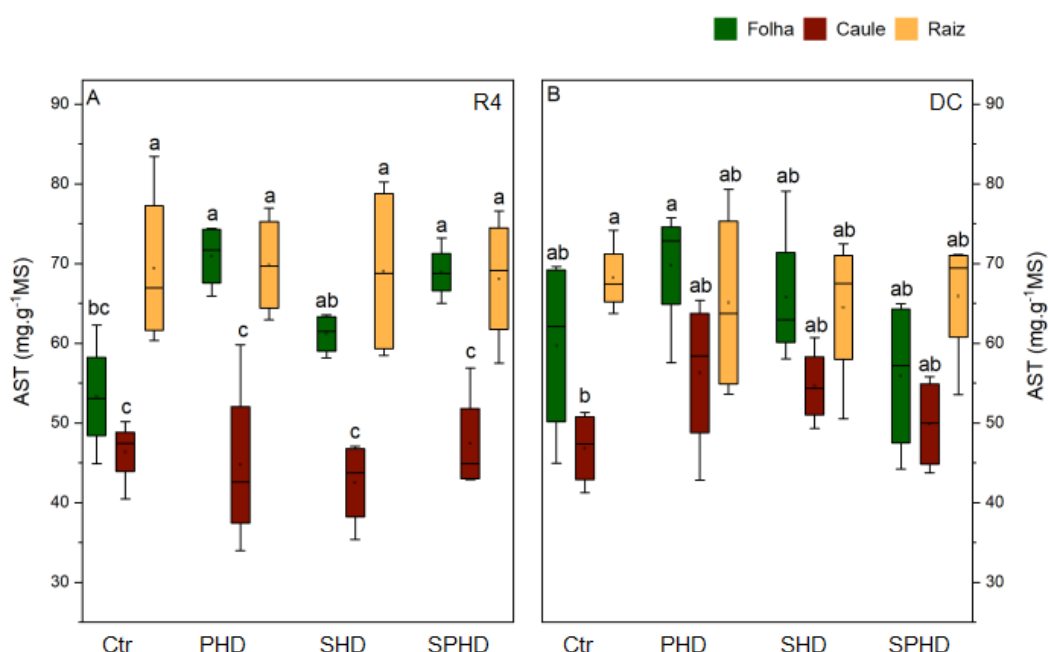
Plantas dos tratamentos Ctr (controle), SHD e PHD apresentaram reduções do CRA de 13,68%, 43,74% e 24,6%, respectivamente, em relação ao seu 1º dia ao entrar no período de déficit hídrico contínuo. Em contrapartida, plantas do tratamento SPHD mantiveram seu *status* hídrico predominante em comparação ao seu 1º dia de déficit hídrico contínuo. Porém, no 15º dia houve um aumento de 23,37% e 19,05% no CRA dos tratamentos Ctr e SHD em comparação ao 8º dia. Convém ressaltar, que no último dia da coleta (15º dia), a precipitação pluviométrica foi intensa, e a disposição espacial das plantas pertencentes aos grupos Ctr e SHD no interior da casa de vegetação provavelmente influenciou no aumento do CRA, como observado nos dados discrepantes. Em contrapartida, o grupo SPHD manteve o seu CRA constante durante a desidratação contínua (DC). Além disso, o grupo PHD no 15º dia em comparação ao 1º dia teve uma redução significativa no seu CRA de 53,12%.

Dinâmica dos carboidratos não estruturais

Plantas que passaram pelos quatro períodos de deficiência hídrica intermitente apresentaram maior acúmulo de açúcares solúveis nas folhas (Figura 6A). O último estágio de hidratação (R4) (antes de entrarem no período da desidratação contínua) foi marcado pelo aumento significativo nos órgãos foliares de 32,94% e 29,27% de

açúcares solúveis nos tratamentos PHD (plantas condicionamento por ciclos de HD) e SPHD (condicionamento por ciclos de HD na germinação e em plantas), respectivamente, em relação ao teido foliar do tratamento Ctr (Controle) (Figura 6A). Já, entre os tecidos radicular e do caule, não houve diferenças significativas no acúmulo de açúcar solúveis (Figura 6A).

Figura 6. Concentração de açúcares solúveis totais (AST) em diferentes tecidos (folha, caule e raiz) de plantas de *C. pyramidale* após a quarta reidratação - R4 (A) e, em seguida, de desidratação contínua - DC (B). Ctr (Controle), PHD (Ciclos de HD nas plantas), SHD (ciclos de HD nas sementes) e SPHD (ciclos de HD nas sementes e plantas). As letras correspondem as diferenças estatísticas entre os grupos pelo teste de Newman-Keuls, e os os valores sinalizam o valor médio das repetições ($n=5 \pm$ erro padrão).



Ainda assim, durante a R4, ao analisar os órgãos de plantas pertencentes ao mesmo grupo, as raízes mostrou-se um órgão predominante no acúmulo de açúcares solúveis, com aumentos significativos de 50%, 56%, 63% e 44% nos tratamentos Ctr, PHD, SHD e SPHD, respectivamente, quando em comparação ao caule. Neste período (R4), observa-se também, um aumento significativo de açúcares solúveis de 58,50%, 44% e 45,44% nas folhas, em contraste ao caule, respectivamente nos tratamentos PHD, SHD e SPHD (Figura 6A). Já o tratamento controle (Ctr) não apresentou diferenças significativas no caule e folhas (Figura 6A).

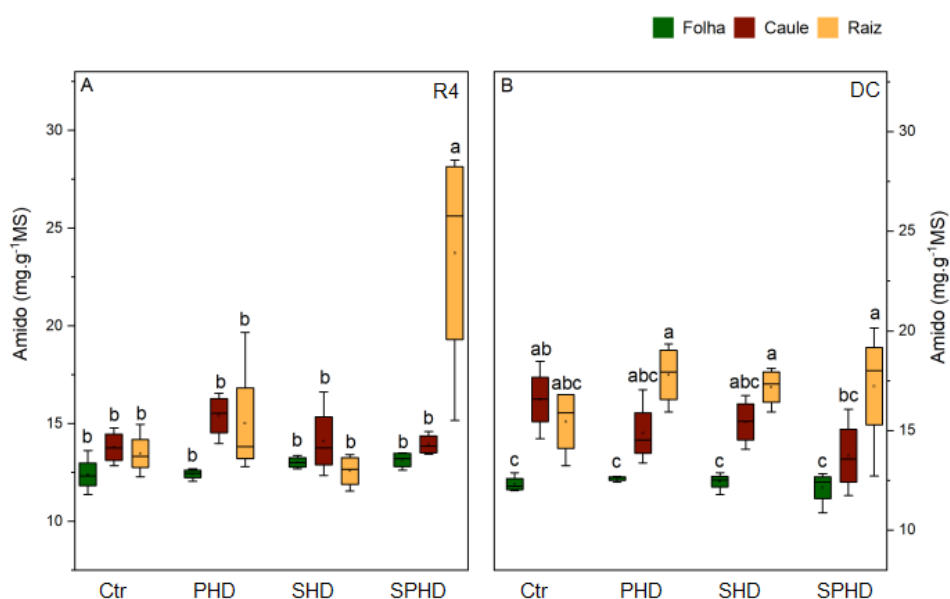
O período de desidratação contínua (plantas sujeitas a um período de 15 dias

sem irrigação) não refletiu mudanças significativas na dinâmica dos AST em nenhum dos tecidos (folha, caule e raiz) e tratamentos analisados (Figura 6B). Sobre tudo, ao analisar os diferentes tecidos do mesmo tratamento, verifica-se que apenas no tratamento Controle (Ctr) o teor de açúcar foi significativamente maior (em cerca de 45,6%) nas raízes em comparação ao caule (Figura 6B).

Teor de Amido

As plantas de *C. pyramidale* condicionadas a ciclos de HD em ambas as fases (na germinação e na fase vegetativa – SPHD) mostraram acumular amido preferencialmente no tecido radicular (Figura 7A). O aumento de amido nesse tecido foi significativamente maior em 76%, 58% e 89% respectivamente em relação aos tratamentos Ctr, PHH e SHD (Figura 7A), ao passo que tanto o caule como no tecido foliar não apresentaram diferenças significativas nas concentrações de amido em todos os tratamentos avaliados (Figura 7A).

Figura 7. Concentração de Amido em diferentes tecidos (folha, caule e raiz) de plantas de *C. pyramidale* após a quarta reidratação - R4 (A) e após a desidratação contínua - DC (B). Ctr (Controle), PHD (ciclos de HD nas plantas), SHD (ciclos de HD nas sementes) e SPHD (ciclos de HD nas sementes e plantas). As letras correspondem as diferenças estatísticas entre os grupos pelo teste de Newman-Keuls, e os os valores sinalizam o valor médio das repetições ($n=4 \pm$ erro padrão).



Durante a desidratação contínua (DC) (Figura 7B), não foram observadas diferenças significativas entre tratamentos e tecidos (Figura 7B). Porém, quando comparados os diferentes tecidos dos mesmos tratamentos, observa-se que o tecido

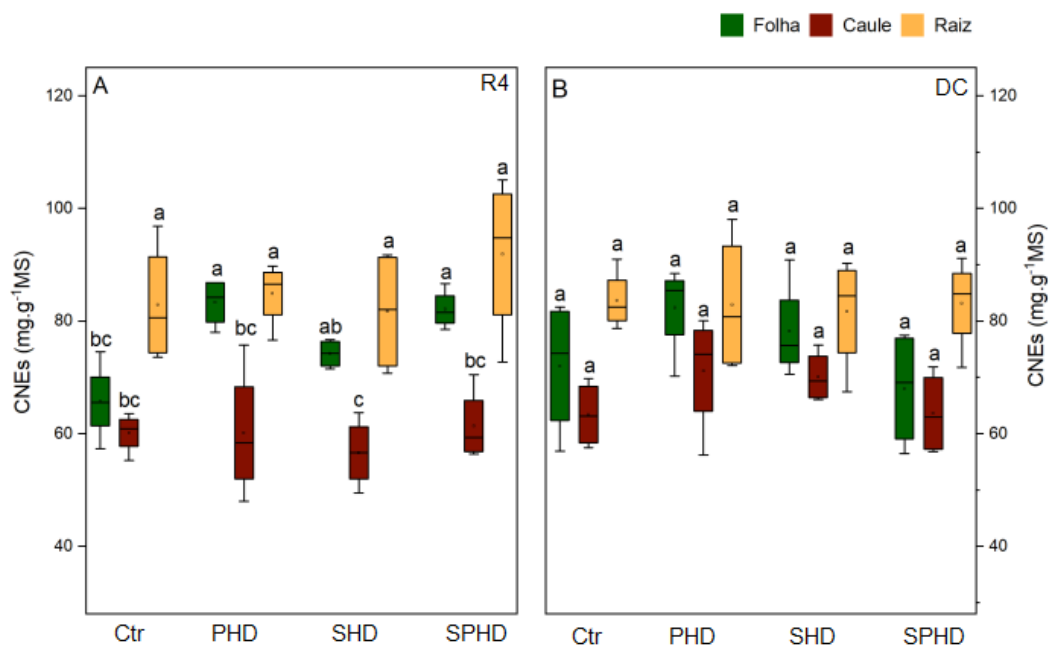
radicular foi o principal órgão de armazenamento de amido, apresentando diferenças significativas em relação às folhas de 15%, 38% e 42% dos tratamentos SHD, PHD e SPHD, respectivamente. Além disso, no tratamento controle (Ctr) de plantas pertencentes ao mesmo grupo, foi observado um aumento significativo de 25% na região do caule em relação às folhas. Também foi notável o aumento (~ 25%) nas concentrações de amido na raiz de plantas SPHD em relação ao caule. Ainda no tratamento SPHD, é possível perceber que a concentração de amido nas raízes teve uma redução de 27% no período R4 em relação ao período DC (Figura 7A-B).

Carboidratos não estruturais (CNEs) total

O conteúdo total de CNEs no caule e raízes durante a quarta reidratação (R4) não diferiu entre os tratamentos (Figura 8A). No entanto, foi notável que as plantas dos tratamentos PHD e SPHD apresentaram um aumento nas folhas significativo de 27% e 24%, respectivamente, em comparação ao mesmo tecido do tratamento Controle (Ctr) (Figura 8A).

O CNEs aumentou nas folhas (26%) e caule (38%) do tratamento controle em comparação com ao tecido radicular. Da mesma forma, os tratamentos SHD, PHD e SPHD mostraram aumentos significativos de 41%, 42,20% e 49,69%, nas raízes, respectivamente, quando comparados com o caule. Além disso, as folhas tiveram um aumento significativo de CNEs em aproximadamente 36%, 31% e 34% em relação ao caule dos seus respectivos grupos. Porém, na no período de desidratação contínua (DC), a partição de carboidratos não estruturais não diferiu estatisticamente entre tecidos e tratamentos (Figura 8B).

Figura 8. Concentração de carboidratos não estruturais (CNEs) em diferentes tecidos (folha, caule e raiz) de plantas de *C. pyramidale* após a quarta reidratação - R4 (A) e após a desidratação contínua - DC (B). Ctr (Controle), PHD (ciclos de HD nas plantas), SHD (ciclos de HD nas sementes) e SPHD (ciclos de HD em sementes e plantas). As letras correspondem as diferenças estatísticas entre os grupos pelo teste de Newman-Keuls, e os os valores sinalizam o valor médio das repetições ($n=4 \pm$ erro padrão).



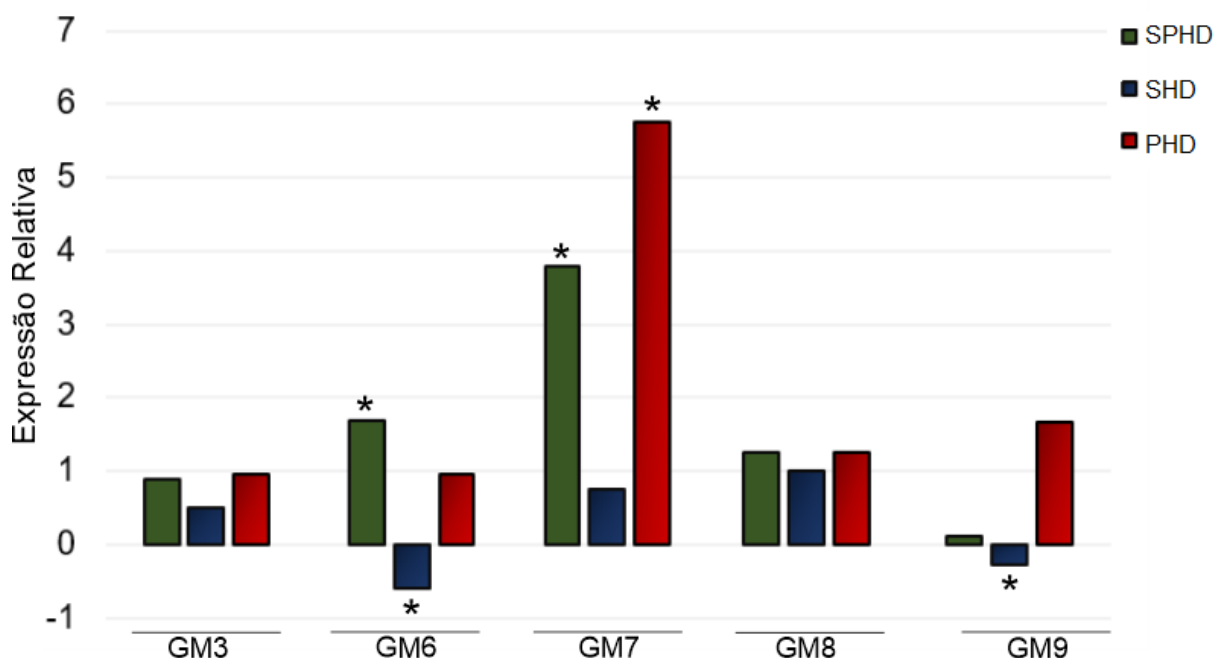
Expressão diferencial dos genes associados à memória hídrica

A análise do transcriptoma de *C. Pyramidale* descrito por Frosi e colaboradores (2021) permitiu a seleção *in silico* de um grupo de transcritos como potenciais alvos para estudos da memória hídrica (aqui denominados genes de memória “GM 1-13”). Dos 13 genes selecionados (Tabela 1S), cinco genes alvos foram eficientes na análise de expressão via RT-qPCR, sendo: Auxin_resp (GM3), E3 ubiquitin-protein ligase RZF1 (GM6); PYR_PYL_RCAR_like (GM7); PLN02467 (GM8); PRK11107 superfamily_GAF/ (GM9) (Figura S1). Os genes *Actin-related protein 3* (ARP3) e *Histone acetyltransferase type B catalytic subunit* (HAG2) foram empregados como normalizadores, sendo também selecionados por Frosi e colaboradores (2021).

A análise de expressão dos genes de memória hídrica foram avaliados no tecido radicular da Catingueira após o período de desidratação hídrica intermitente, especificamente na quarta reidratação (R4). Foram avaliados os tratamentos SHD, PHD e SPHD em relação aos seus respectivos controles e aos genes de referência. (Figura 9; Tabela S2). Dos cinco alvos analisados, dois transcritos (GM6 e GM7) apresentaram nível de expressão significativamente superior (1,7 e 3,8 mais expressos em relação aos controles, respectivamente) no tratamento SPHD, ou seja, aquelas plantas que passaram por ciclos de HD tanto na germinação como na fase

de planta/juvenil (Figura 9). Plantas do tratamento SHD apresentaram repressão significativa dos transcritos GM6 e GM9 (-0.597 e -0.280, respectivamente). Em contrapartida, o transcrito GM7 apresentou expressão significativa (5.763) (Figura 9) em plantas do tratamento PHD. Os transcritos GM3 e GM8 não apresentaram diferenças significativas em todos tratamentos analisados.

Figura 9. Genes de memória diferencialmente expressos no tecido radicular da Catingueira na quarta reidratação (R4) após o período de desidatação intermitente. Os “asteriscos” significam os genes diferencialmente expresso dos tratamentos em relação ao controle (up-regulated ou down-regulated) ($p < 0,05$). PHD (ciclos de HD nas plantas), SHD (ciclos de HD nas sementes) e e SPHD (ciclos de HD nas sementes e plantas) GM: Genes de Memória.



DISCUSSÃO

Padrão de germinação de sementes de C. pyramidale

Estudos sobre espécies nativas e lenhosas em regiões áridas e semiáridas, a exemplo da Caatinga, são relativamente escassos. Nesse contexto, a Catingueira se destaca como uma excelente espécie modelo para pesquisas na ecofisiologia, genética e na biotecnologia de plantas. Assim, compreender a germinação da Catingueira, espécie nativa da Caatinga, é essencial, pois oferece uma visão

aprofundada de como as espécies da Caatinga enfrentam os estresses abióticos.

A curva de embebição de sementes de *C. pyramidale* obtida neste estudo (Figura 3A) exibiu um padrão trifásico, conforme descrito por Bewley e Preto (2013). Numerosos estudos têm demonstrado consistentemente que sementes ortodoxas de plantas lenhosas da Caatinga apresentam germinação trifásica, como cássia-do-nordeste (*Senna spectabilis* var. *excelsa*) (Lima et al., 2018); sansão-do-campo (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth), angico-de-bezerro (*Pityrocarpa moniliformis* Benth.) (Nicolau et al., 2020); angico-branco (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*), tamboril (*E. contortisiliquum* Vell. Morong), amendoim-bravo (*Pterogyne nitens* Tul.) (Nascimento; Dantas; Meiado, 2021); facheiro-de-praia (*Pilosocereus catingicola* (Gürke) Byles & Rowley subsp. *salvadorensis* (Werderm.) Zappi (Lima; Meiado, 2023) e jurema-preta (*Piptadenia moniliformis* Benth. Luckow & R.W. Jobson.) (Júnior et al., 2023).

Nota-se que a fase II da germinação da Catingueira ocorreu em um curto período de tempo, esta característica é uma estratégia comum na maioria das leguminosas presentes na Caatinga (Barbosa, 2003). Pois, o encurtamento da fase II (latência) resulta em maior aproveitamento dos recursos disponíveis no solo, como água e nutrientes, rápido estabelecimento inicial das mudas, além de evitar que sejam capturadas por predadores (Guterman, 1993).

A hidratação descontínua melhora a germinação e confere tolerância à deficiência hídrica em sementes de C. pyramidale

Devido à natureza dinâmica dos ambientes semiáridos, pequenos eventos de precipitação promovem efeitos cumulativos nas características das sementes, que podem gerar mudanças adaptativas ou desencadear *feedback* negativo comprometendo sua viabilidade (Contreras-quiroz et al., 2016; Srivastava; Kumar; Suprasanna, 2021). Segundo Nascimento e colaboradores (2021), sementes 'não condicionadas' quando expostas a condições desfavoráveis tendem não suportar os impactos do ambiente.

De acordo com López-Urrutia e colaboradores (2014), os ciclos de HD estimulam metabólitos, transcritos e reguladores enzimáticos chave que desempenham um papel crucial na 'memória hídrica' das sementes quando submetidas a estresses abióticos. Por exemplo, Chen e Arora (2013) relatam que o *priming* nas sementes desencadeia o acúmulo de proteínas LEA que pode ser um

fator que contribui para a tolerância à seca. E, por sua vez, seus impactos podem persistir durante todo o ciclo de vida da planta (Srivastava; Kumar; Suprasanna, 2020).

Assim, nossos resultados corroboram a hipótese de que a hidratação descontínua em sementes de Catingueira pode ser um dos fatores associados ao aumento da tolerância à dessecação durante a estação seca na Caatinga. Portanto, as evidências apresentadas revelam que o condicionamento de sementes de *C. pyramidale* com 3 ciclos de HD melhorou todos os indicadores de germinação analisados, além de promover germinabilidade em potenciais hídricos elevados, em comparação com sementes não condicionadas. Estes resultados são consistentes com trabalhos pioneiros que validam a importância dos ciclos de HD na resposta fisiológica a condições estressantes (Dubrovsky, 1996; 1998).

Lima e colaboradores (2018), constatou que sementes de *S. spectabilis* condicionadas com 1, 2 e 3 ciclos de HD tiveram sua germinabilidade afetada quando foram considerados diferentes tempos (X, Y e Z) de hidratação. Porém, sementes hidratadas até o tempo Y (16 horas) submetidas a 3 ciclos de HD foram mais tolerantes ao déficit hídrico (Lima et al., 2018). Além disso, Nicolau e colaboradores (2020), observaram que sementes de *Pytiocarpa moniliformis* submetidas a 2 ciclos de HD foram mais permissivas para reagir positivamente ao déficit hídrico severo (-0,8 MPa), sendo favorecidas em sua % de germinação em cerca de 48%, em contraste com aquelas que foram submetidos a 0 e 4 ciclos de HD. Meiado e Lima (2023) avaliaram a expressão da 'memória de hidratação' em sementes de palma forrageira (*Pilosocereus catingicola*). Os autores constataram que à medida que o potencial hídrico se tornava mais negativo, as sementes submetidas a ciclos de HD adquiriam tolerância à seca (Meiado; Lima, 2023).

Em algumas situações, o tempo de hidratação das sementes e o elevado número de ciclos de HD podem ser desfavoráveis aos parâmetros de germabilidade, comprometendo a estabilidade e integridade da membrana plasmática (Dias, 2020). Assim, os ciclos de HD estabelecem ajustes osmóticos nas sementes que desencadeiam a tolerância à dessecação, como visto em nossos resultados. Portanto, entende-se que cada espécie possui sua plasticidade fenotípica e genotípica, bem como a tolerância aos estresses abióticos é modulado por fatores endógenos que podem ser influenciados pelas condições ambientais (Santos; Lima; Meiado, 2023).

Manunção do status hídrico

A manutenção do conteúdo relativo de água foliar (CRA) sugere que as plantas do tratamento SPHD desenvolveram uma possível memória hídrica, cujos tratamentos prévios de ciclos de HD conduziram uma plasticidade fisiológica, podendo estar associada a uma melhor performance no uso da água, como por exemplo, permitindo-lhes enfrentar situações de pouca disponibilidade de água no solo. Em Leite e colaboradores (2023) foram realizadas medições do potencial hídrico foliar em *Mimosa tenuiflora* (Mimosaceae) e *Piptadenia stipulacea* (Mimosaceae) antes do amanhecer (entre 4h e 6h) e ao meio-dia (entre 11h e 13h). Os resultados mostram que essas espécies, pioneiras da Caatinga, apresentam uma elevada capacidade de ajustar o potencial hídrico foliar, reduzindo consideravelmente seu potencial hídrico ao longo do dia e garantindo a sua sobrevivência durante períodos de seca.

Dinâmica dos carboidratos não estruturais em C. pyramidale

Os dados revelam que a passagem das plantas de *C. pyramidale* durante períodos de desidratação hídrica intermitente gerou respostas adaptativas de memória metabólica durante a quarta reidratação. Pois, o teor de açúcares solúveis nas folhas dos tratamentos das plantas condicionadas na fase juvenil aumentou significativamente, além disso o tecido radicular mostrou-se como o principal órgão no acúmulo de açúcares solúveis. Crisp e colaboradores (2016), consideram os períodos de 'reidratação' como pontos de verificação essenciais para a planta tomar a decisão de redefinir as informações de entrada ou investir recursos (resposta de defesa, manutenção, reparação de danos, entre outros) para um condicionamento ideal. Portanto, a dinâmica dos carboidratos não estrutural pode ser um dos fatores associados à resiliência de *C. pyramidale* na Caatinga.

No que diz respeito a Liu e colaboradores (2022), as plantas, ao experimentarem estímulos externos recorrentes de seca, podem melhorar seu desempenho, refletindo diretamente nas respostas metabólicas. Sala e colaboradores (2010) enfatizaram a importância da assimilação de carbono durante a fotossíntese, uma vez que a maior parte do carbono assimilado é armazenada e/ou acumulada na forma de CNEs, reduzindo assim a depleção de C e fornecendo energia para o crescimento e desenvolvimento das plantas durante períodos de seca.

No entanto, durante a desidratação contínua, apenas as plantas controle

apresentaram um aumento significativo nos açúcares solúveis no tecido radicular. Santos e colaboradores (2021), também utilizando *C. pyramidale* como modelo de estudo, tiveram um aumento significativo de açúcares solúveis nas raízes de plantas 'não aclimatadas' durante secas leves, moderadas e severas. Assim, o acúmulo de açúcares solúveis em tecidos lignificados é uma característica comum de *C. pyramidale*.

O amido, porção insolúvel dos CNEs, é um composto classificado como elemento de armazenamento e é encontrado principalmente nas estruturas lignificadas das plantas, como caules e raízes (Omari, 2022). Comparado a todos os tratamentos analisados, o amido nas plantas de *C. pyramidale* do tratamento SPHD estava altamente concentrado na zona radicular, sugerindo a possibilidade de uma marca registrada da memória metabólica.

Além disso, o teor de amido nas raízes sugere um possível aumento na translocação do fotoassimilador, ou seja, a planta começa a abrir seus estômatos e se torna mais ativa, fazendo com que o amido seja translocado para a região radicular. Ainda assim, está claro que durante a desidratação contínua, o amido se degrada e se converte em açúcares solúveis, reduzindo o potencial osmótico do solo. O armazenamento de amido é considerado uma tática vital para prevenir possíveis embolias nos vasos do xilema (Santos et al., 2022), o que poderia indicar um traço característico de espécies lenhosas de climas áridos e semiáridos.

Nas plantas lenhosas, as CNEs são essenciais para reduzir o estresse oxidativo gerado pelo déficit hídrico recorrente (Omari, 2022). Galvez e colaboradores (2011) observaram que o álamo-trémulo (*Populus tremuloides* Michx.) priorizou a sobrevivência das raízes durante o déficit hídrico, concentrando amido em sua região radicular. Wang e colaboradores (2023), validam a importância do sistema radicular como a principal fonte de sumidouro de carbono durante secas severas. Segundo Srivastava (2021), o acúmulo e armazenamento de metabólitos também tem sido um dos mecanismos-chave para elucidar a memória somática nas plantas, reforçando o modo expandido das plantas condicionadas ao fenótipo 'alerta/prontidão'. Liu e colaboradores (2022), relatam que plantas submetidas a ciclos recorrentes de seca podem ter um menor gasto energético devido à provável memória adquirida, de modo que plantas sem *priming* precisariam gastar mais energia para atender às demandas metabólicas durante uma elicitación abiótica.

Receptor PYR/PYL/RCAR_like pode promover resiliência a plantas condicionadas a ciclos de HD de C. pyramidale

Plantas de *C. pyramidale* quando submetidas ao condicionamento na fase juvenil (PHD e SPHD), mostraram ser capazes de induzir genes associados a receptor PYR/PYL/RCAR_like, o qual apresenta um papel importante por captar o ácido abscísico (ABA) e, posterior, modular as respostas frente às flutuações ambientais. O ABA é uma molécula (um hormônio vegetal) de sinalização cuja síntese é induzida por estresse abiótico, como a deficiência hídrica (Cutler et al., 2010; Jahan, et al. 2022). Seus processos figuram entre os mais diversificados no metabolismo vegetal, seja atuando na dinâmica dos CNEs, regulando abertura e fechamento de estômatos, na adaptabilidade às adversidades do ambiente, bem como na expressão de inúmeros genes (Fidler et al., 2022).

Nossos resultados demonstram que a exposição a quatro períodos de desidratação hídrica intermitente a períodos intercalados por períodos de reidratação (R1-4) promoveu uma indução significativa da expressão do transcrito GM7 (associado receptor de ABA da família PYR/PYL/RCAR_like) no tecido radicular da *C. pyramidale*. Este fenômeno sugere que a exposição prévia ao estresse em tela tenha condicionado a planta a responder de modo eficaz durante a reidratação subsequente, possivelmente através da ativação de vias de sinalização que envolvam o ABA, uma vez que os receptores PYR/PYL são fundamentais na regulação das respostas transcricionais do ABA (Gonzalez-Guzman et al., 2012), além de estarem envolvidos na abertura dos estômatos, também estão associados a fatores como o estresse hídrico.

Segundo Guedes e colaboradores (2018), a memória hídrica tem participação na regulação da expressão de genes relacionados ao ABA, influenciando na codificação de proteínas sinalizadoras. Além disso, os ciclos de HD aumentam as concentrações de ABA afetando, assim, a dinâmica da expressão de genes (Marcos et al., 2018), que codificam enzimas que participam da biossíntese de osmoprotetores, promovendo a tolerância durante o déficit hídrico. Durante o estresse hídrico subsequente na soja (*Glycine max* L.), genes sensíveis ao ABA, etileno e do metabolismo secundário foram induzidos (Kim et al., 2020). Na batata (*Solanum tuberosum* L.), o ABA exerceu um efeito positivo nas proteínas PP2C e SnRKs após enfrentarem o déficit hídrico (Chen et al., 2020).

A indução positiva do gene relacionado ao ABA pode demonstrar um mecanismo de memória hídrica pelo qual as plantas submetidas ao déficit hídrico desidratação hídrica intermitente são capazes de responder eficientemente à disponibilidade hídrica. Este mecanismo de condicionamento pode ser um aspecto positivo para a tolerância das plantas, beneficiando a sua resiliência em ambientes como a Caatinga, onde os períodos de baixa precipitação são frequentes.

Por outro lado, o transcrito GM9 (PRK11107_GAF) foi reprimido no tecido radicular de plantas submetidas ao condicionamento apenas na fase germinativa (SHD). Já o transcrito GM6 (CpRZF1) desempenhou um papel fundamental na resposta adaptativa ao estresse hídrico em plantas de *C. pyramidale*. Pois, o aumento significativo na expressão deste gene no tratamento SPHD contribuiu para a sobrevivência e a reidratação das plantas durante as condições de estresse. O RZF1 codifica a subunidade do tipo RING pertencente à família da ubiquitina E3 e o seu papel foi evidenciado na resposta a estresses abióticos (Kim et al., 2017). De acordo com Callis (2014) às respostas mediadas por ubiquitina estão envolvidos desde a regulação de Fatores de Transcrição (FTs), alterações na cromatina até a localização ou estabilidade dos receptores na membrana celular.

Dessa forma, a ausência da expressão do gene CpRZF1 em plantas de *C. pyramidale* do grupo PHD pode indicar que a combinação do ciclos de HD na germinação e desidratação hídrica intermitente nas mudas (SPHD) produz um efeito sinérgico, manifestado pela expressão positiva do transcrito em GM6. A atuação do gene GM6 no grupo de plantas SPHD pode estabelecer uma possível 'marca' de memória transcricional durante a germinação, que é posteriormente recordado e fortalecido nos estágios jovens. Por outro lado, a regulação negativa deste transcrito em plantas submetidas ao condicionamento apenas na fase germinativa (SHD), indica que a sua ativação positiva depende intimamente da exposição prévia ao estresse durante seu desenvolvimento, na fase vegetativa. Dessa maneira, esse gene pode ser considerado um alvo chave em estudos de genes de memória hídrica ou para mecanismos de adaptação frente à seca.

Em Ju e colaboradores (2013), o gene AtRZF1 foi regulado negativamente por desidratação, neste estudo plântulas de *A. thaliana* com 2 semanas de idade foram submetidas a uma solução de manitol (400 mM) e tiveram os níveis transcricionais diminuído 3x mais após 24 horas de estresse osmótico. Nesta análise, o gene RAB18, responsivo ao estresse osmótico, foi empregado como normalizado transcricional (JU

et al., 2013). Em contrapartida, a superexpressão de CpRZF1 em plantas condicionadas (do grupo SPHD) de *C. pyramidale*, indicou que o gene em questão pode ter um papel dinâmico na resposta ao estresse hídrico, que varia conforme o a frequência e intensidade do estresse, além do estágio de desenvolvimento da planta. Durante condições osmóticas (estresse por desidratação) em *A. thaliana*, o AtRZF1 foi responsável por regular positivamente a proteína PCA22, elevando o acúmulo de osmoprotetores, como Prolina (Kim et al., 2017).

Portanto, o gene CpRZF1 também representa um candidato potencial para aplicação em programas de melhoramento genético e estudo de genes de memória associado a estresse por deficiência hídrica.

CONCLUSÃO

Sementes de *C. pyramidale* condicionadas por ciclos de HD tendem a tolerar mais ao déficit hídrico em comparação com sementes sem ciclos de HD. Aqui, consideramos que a tolerância adquirida pela espécie é um dos mecanismos associados à hidratação descontínua, a qual gera efeitos cumulativos em processos fisiológicos. Como resultado, ao serem submetidas um terceiro ciclo de hidratação, as sementes apresentam uma resposta potencializada. Portanto, propagação espaço-temporal da precipitação contribui para a formação dos ciclos de hidratação descontínua nas sementes de plantas em ecossistemas como a Caatinga, que é um dos mecanismos associados à persistência e dinâmica populacional de espécies nativas dessa região.

O conteúdo relativo foliar manteve-se estável durante a desidratação contínua em plantas SPHD, sugerindo que este comportamento pode ser uma das vantagens conferidas pelo condicionamento, proporcionando resiliência hídrica em condições adversas. Além disso, o tecido foliar de *C. pyramidale* foram identificadas como o principal órgão de acúmulo de açúcares solúveis durante a reidratação (R4), enquanto o tecido radicular se destacou como o principal órgão de armazenamento de amido e acúmulo açúcares solúveis, tanto durante a reidratação (R4) e desidratação contínua (DC), respectivamente, em plantas do tratamento SPHD. Assim, a degradação do amido em açúcares simples pode ser um dos fatores associados à resiliência de *C. pyramidale* durante a estação seca. Em relação aos níveis transcricionais, as plantas submetidas a condicionamento em diferentes fases do desenvolvimento tendem a

recrutar transcritos para uma resposta mais efetiva, com o intuito de aliviar os impactos referente a desidratação hídrica intermitente.

Diante desse panorama, como nenhuma cultura de interesse agrônomo atende a todos os parâmetros qualitativos desejáveis, o uso dos ciclos de HD, em um cenário de mudanças climáticas cada vez mais frequentes (com altas temperaturas e períodos de pouca disponibilidade hídrica), pode ser uma estratégia interessante a ser empregada em estudos que visem aumento de tolerância ao déficit hídrico de espécies cultivadas. Nossa hipótese sugere um sistema no qual sementes submetidas a ciclos de HD que germinam em potenciais mais negativos sejam cultivadas no solo e analisadas (em níveis fisiológico, bioquímico e molecular) para verificar o seu potencial de tolerância e os efeitos de memória de curto ou de longo prazo, possam nos propor uma compreensão mais ampla de como a Catingueira torna-se resiliente frente aos estresse abióticos, como seca e salinidade.

AGRADECIMENTOS

Núcleo de Ecologia e Monitoramento Ambiental (NEMA/UNIVASF), o Projeto de Integração do Rio São Francisco com as Bacias Hidrográficas do Nordeste Setentrional (PISF) e o Ministério da Integração e do Desenvolvimento Regional (MIDR) pela disponibilização das sementes pela disponibilização das sementes. A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior) pelo apoio financeiro fornecido para o desenvolvimento desse projeto de pesquisa.

REFERÊNCIAS

- BARRS, H. D.; WEATHERLEY, P. E. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. **Australian Journal of Biological Science**, v. 15, n. 3, p. 413-428, 1962.
- BARBOSA, D. C. A. Estratégias de germinação e crescimento de espécies lenhosas da caatinga com germinação rápida. In: INARA, R. L.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (Org.). **Ecologia e Conservação da Caatinga**. 1ª ed. Recife: Universitária da UFPE, v. 01, p. 625-656, 2003.
- BESSONOVA, V.; YAKOVIEVA-NOSAR, S. Dynamics of non-structural carbohydrates in *Pinus pallasiana* D. Don needles under different forest growth conditions of ravine anti-erosion plantations. **Folia Forestalia Polonica**, v. 64, n. 1, p. 38-48, 2022.
- BEWLEY, J. D.; PRETO, M. **Sementes: fisiologia do desenvolvimento e germinação**. Springer Science & Business Media, 2013.

- BUSTIN, S. A. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.
- CALLIS, J. The ubiquitination machinery of the ubiquitin system. **The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists**, v. 12, 2014.
- CHANG, S.; PURYEAR, J.; CARINEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, 11, p. 113–116, 1993.
- CHEN, Y.; LI, C.; YI, J.; YANG, Y.; LEI, C.; GONG, M. Transcriptome Response to drought, rehydration and re-dehydration in potato. **International Journal of Molecular Science**, v. 21, n. 1, p. 159, 2020.
- CHEN, Y.; LI, C.; YI, J.; YANG, Y.; LEI, C.; GONG, M. Transcriptome response to drought, rehydration and re-dehydration in potato. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 1, p. 159, 2019.
- CHEN, K.; ARORA, R. Priming memory invokes seed stress-tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 94, p. 33-45, 2013.
- CRISP, P. A.; GANGULY, D.; EICHEN, S.; BOREVITZ, J. O.; POGSON, B. J. Reconsidering plant memory: intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. **Science advances**, v. 2, n. 2, p. e1501340, 2016.
- CONTRERAS-QUIROZ; M. D. R.; PANDO-MORENO, M. P.; FLORES, J.; JURADO, R. Effects of wetting and drying cycles on the germination of nine species of the Chihuahuan Desert. **Botanical Sciences**, v. 94, n. 2, p. 221-228, 2016.
- CUTLER, S. R.; RODRIGUEZ, P. L.; FINKELSTEIN, R. R.; ABRAMS, S. R. Absciscic acid: emergence of a core signaling network. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 651-679, 2010.
- DIAS, G. S. **Ciclos de Hidratação e Desidratação em sementes de *Handroanthus heptathyllus* (Vell.) Mattos**. 2020. Dissertação de Mestrado (rograma de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal - Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2020.
- DIETZE, M. C.; SALA, A.; CARBONE, M. S.; CZIMCZIK, C. I.; MANTOOTH, J. A.; RICHARDSON, A. D.; VARGAS, R. Nonstructural carbon in woody plants. **Annual review of plant biology**, v. 65, p. 667-687, 2014.
- DING, Y.; FROMM, M.; AVRAMOVA, Z. Multiple exposures to drought 'train' transcriptional responses in *Arabidopsis*. **Nature Communications**, v. 3, n. 740, 2012.
- DING, Y.; VIRLOUVET, L.; LIU, N.; REITHOVEN, J.; FROMM, M.; AVRAMOVA, Z. Dehydration stress memory genes of *Zea mays*; comparison with *Arabidopsis thaliana*. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 141, 2014.
- DONG, S.; BECKLES, D. M. Dynamic changes in the starch-sugar interconversion within plant source and sink tissues promote a better abiotic stress response. **Journal of plant physiology**, v. 234, p. 80-93, 2019.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-359, 1956.
- DUBROVSKY, J. G. Discontinuous hydration as a facultative requirement for seed germination in two cactus species of the sonoran desert. **Journal of the Torrey Botanical Society**, v. 125, p. 33-39, 1998.
- FIDLER, J.; GRASKA, J.; GIETLER, M.; NYKIEL, M.; PRABUCKA, B.; RYBARCZYK-PLONSKA, A.; MUSZYNSKA, E.; MORKUNAS, I.; LABUDDA, M. PYR/PYL/RCAR Receptors play a vital role in the abscisic-acid-dependent responses of Plants to external or internal stimuli. **Cells**, v. 11, n. 8, p. 1352, 2022.

- FORESTAN, C.; FARINATI, S.; ZAMBELLI, F.; PAVESI, G.; ROSSI, V.; VAROTTO, S. Epigenetic signatures of stress adaptation and flowering regulation in response to extended drought and recovery in *Zea mays*. **Plant Cell Environ**, v. 43, p. 43:55–75, 2020.
- FROSI, G.; FERREIRA-NETO, J. R. C.; BEZERRA-NETO, J. P.; LIMA, L. L.; MORAIS, D. A. L.; PANDOLFI, V.; KIDO, L. C.; MAIA, L. C.; SANTOS, M. G.; BENKOISEPPON, A. M. Reference genes for quantitative real-time PCR normalization of *Cenostigma pyramidale* roots under salt stress and mycorrhizal association. **Genetics and Molecular Biology**, v. 44, p. e20200424, 2021.
- GALVEZ, D. A.; LANDHAUSSER, S. M.; TYREE, M. T. Root carbon reserve dynamics in aspen seedlings: does simulated drought induce reserve limitation?. **Tree Physiology**, v. 31, n. 3, p. 250-257, 2011.
- GUTTERMAN, Y. . **Seed Germination in Desert Plants**. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 1993.
- GUEDES, F. A. F.; NOBRES, P.; FERREIRA, D. C. R.; MENEZES-SILVA, P. E.; RIBEIRO-ALVES, M.; CORREA, R. L.; DAMATTA, F. M.; ALVES-FERREIRA, M. Transcriptional memory contributes to drought tolerance in coffee (*Coffea canephora*) Plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 147, p. 220-233, 2018.
- GONZALEZ-GUZMAN, M.; PIZZIO, G. A.; ANTONI, R.; VERA-SIRERA, F.; MERILO, E.; BASSEL, G. W.; FERNÁNDEZ, M. A.; HOLDSWORTH, M. J.; PEREZ-AMADOR, M. A.; KOLLIST, H.; RODRIGUEZ, P. L. Arabidopsis PYR/PYL/RCAR receptors play a major role in quantitative regulation of stomatal aperture and transcriptional response to abscisic acid. **The Plant Cell**, n. 6, p. 2483-2496, 2014.
- HILKER, M. SCHUMULLING, T. Stress priming, memory, and signalling in plants. **Plant, Cell & Environment**, v. 42, n. 3, p. 753-761, 2019.
- JAHAN, A.; YAMAZAKI, Y.; ISLAM, M.; GHOSH, T. K.; YOSHIMURA, N.; KATO, H.; ISHIZAKI, K.; SHINOZAWA, A.; SAKATA, Y.; TAKEZAWA, D. Differential regulations of abscisic acid-induced desiccation tolerance and vegetative dormancy by group B3 Raf kinases in liverworts. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 952820, 2022.
- JACQUES, C.; SALON, C.; BARNARD, R.; VERNOUD, V.; PRUDENT, M. Drought stress memory at the plant cycle level: a review. **Plants**, v. 10, n. 9, p. 1873, 2021.
- JÚNIOR, J. L. S.; OLIVEIRA, V. S. S.; PIRES, C. A. S.; SILVA, E. C. O hidrocondicionamento afeta a germinação e sobrevivência de *Piptadenia moniliformis*. **Revista Ciência, Tecnologia & Ambiente**, v. 13, n. 1, p. 8-8, 2023.
- JÚNIOR, J. L.; FREITAS, R. S.; SILVA, E. C. Discontinuous hydration improves germination and drought tolerance in *Annona squamosa* seedlings. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, p. e56710313706, 2021.
- JU, H.; MIN, J.; CHUNG, M.; KIM, S. C. The *atrzf1* mutation of the novel RING-type E3 ubiquitin ligase increases proline contents and enhances drought tolerance in *Arabidopsis*. **Plant Science**, v. 203-204, p. 1-7, 2013.
- KIM, Y.; CHAE, S.; OH, N.; NGUYEN, N. H.; CHEONG, J. Recurrent drought conditions enhance the Induction of drought stress memory genes in *Glycine max* L. **Frontiers in genetics**, v. 11, p. 1248, 2020.
- KIM, A.; MIN, J.; LEE, K.; KIM, C. S. PCA22 acts as a suppressor of *atrzf1* to mediate proline accumulation in response to abiotic stress in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 7, p. 1797-1809, 2017.
- LEITE, T. S.; FREITAS, M. O.; DIAS, N. S.; DOMBROSKI, J. L. D.; NOGUEIRA, N. W.

- The interplay between leaf water potential and osmotic adjustment on photosynthetic and growth parameters of tropical dry forest trees. **Journal of Forestry Research**, v. 34, p. 177-186, 2023.
- LI, P.; YANG, H.; WANG, L.; LIU, H.; HUO, H.; ZHANG, C.; LIU, A.; ZHU, A.; HU, J.; LIN, Y.; LIU, L. Physiological and transcriptome analyses reveal short-term responses and formation of memory under drought stress in rice. **Frontiers in genetics**, v. 10, p. 55, 2019
- LIU, H.; ABLE, A.; ABLE, J. Priming crops for the future: rewiring stress memory. **Trends in Plant Sciences**, 2021.
- LIU, N.; FROMM, M.; AVRAMOVA, Z. *H3K27me3* and *H3K4me3* chromatin environment at super-induced dehydration stress memory genes of *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant**, v. 7, n. 3, p. 502-513, 2014.
- LIU, X.; QUAN, W.; BARTELS, D. Stress memory responses and seed priming correlate with drought tolerance in plants: an overview. **Planta**, v. 255, n. 2, p. 1-14, 2022.
- LIMA, A. T. **Memória hídrica de sementes: implicações ecofisiológicas durante a germinação e o desenvolvimento inicial de espécies da Caatinga**. 2019. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2019.
- LIMA, A. T.; CUNHA, P. H. J.; DANTAS, B. F.; MEIADO, M. V. Does discontinuous hydration of *Senna spectabilis* (DC.) H.S. Irwin & Barneby var. *excelsa* (Schrad.) H.S. Irwin & Barneby (Fabaceae) seeds confer tolerance to water stress during seed germination?. **Journal of Seed Science**, v. 40, n. 1, 2018.
- LIMA, A. T.; OLIVEIRA, D. M.; MEIADO, M. V. Effect of hydration and dehydration cycles on *Macroptilium atropurpureum* seeds germination under water deficit conditions. **Communications in Plant Sciences**, v. 8, p. 55-61, 2018.
- LIMA, A. T.; MEIADO, M. V. Discontinuous hydration alters seed germination under stress of two populations of cactus that occur in different ecosystems in Northeast Brazil. **Seed Science Research**, v. 27, n. 4, 2017.
- LIMA, A.; MEIADO, M. V. Changes in seed hydration memory expression in *Pilosocereus cattingicola* (Gürke) Byles & G.D. Rowley subsp. *salvadorensis* (Werderm.) Zappi (Cactaceae) seeds produced during rainy and dry season. **Plant Ecology**, v. 224, n. 8, p. 705-714, 2023.
- LIMA, A. T.; MEIADO, M. V. Effect of hydration and dehydration cycles on *Mimosa tenuiflora* seeds during germination and initial development. **South African Journal of Botany**, v. 116, p. 164-167, 2018.
- LÓPEZ-URRUTIA, E.; MARTÍNEZ-GARCIA, M.; MONSALVO, A.; SALAZAR-ROJAS, V.; MONTOYA, R.; CAMPOS, J. E. Differential RNA- and protein-expression profiles of cactus seeds capable of hydration memory. **Seed Science Research**, v. 24, p. 91-99, 2014.
- LUO, L.; ZHENG, Y.; GAO, Z.; CHEN, Q.; KONG, X.; YANG, Y. Grafting improves drought stress memory by increasing the *P5CS1* gene expression in *Brassica rapa*. **Plant and Soil**, v. 452, p. 61-72, 2020.
- MANAVALAN, L. P.; GUTTIKONDA, S. K.; TRAN, L. S. P.; NGUYEN, H. T. Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean. **Plant and Cell Physiology**, v. 50, n. 7, p. 1260-1276, 2009.
- MARTHANDAN, V.; GEETHA, R.; KUMUTHA, K.; RENGANATHAN, V. G.; KARTHIKEYAN, A.; RAMALINGAM, J. Seed priming: a feasible strategy to enhance drought tolerance in crop plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8258, p. 1-23, 2020.

- MARQUES, F. R. F.; MEIADO, M. V.; CASTRO, N. M. C. R.; CAMPOS, M. L. O.; MENDES, K. R.; SANTOS, O. O.; POMPELLI, M. F. GerminaQuant: a new tool for germination measurements. **Journal of Seed Science**, v. 37, p. 248-255, 2015.
- MARCOS, F. C. C.; SILVEIRA, N. M.; MARCHIORI, P. E. R.; MACHADO, E. C.; SOUZA, G. M.; LANDELL, M. G. A.; RIBEIRO, R. V. Drought tolerance of sugarcane propagules is improved when origin material faces water deficit. **PLoS One**, v. 13, n. 12, p. e0206716, 2018.
- MEIADO, M. V. **Evidências de memória hídrica em sementes da Caatinga**. In: Anais do 64 Congresso Nacional de Botânica: botânica sempre viva. Belo Horizonte, Sociedade Botânica do Brasil. p. 89-94, 2013.
- NASCIMENTO, J. P. B.; DANTAS, B. F.; MEIADO, M. V. Hydropriming changes temperature thresholds for seed germination of tree species from the Caatinga, a Brazilian tropical dry forest. **Journal of seed science**, v. 43, 2021.
- NICOLAU, J. P. B.; SILVA, F. E.; FELIX, F. C.; TORRES, S. B.; PACHECO, M. V.; PEREIRA, M. D. Discontínuos hydration on the germination of *Mimosa caesalpiniiifolia* and *Pityrocarpa moniliformis* seeds under water stress. **Revista Caatinga**, v. 33, p. 555-561, 2020.
- OLIVEIRA, D. M. **Influência da hidratação descontínua de sementes e ciclos de rega em mudas de *Cenostigma pyramidale* (Tul.) E. Gagnon & G.P. Lewis (Fabaceae) em respostas ao déficit hídrico**. 2022. 60 f. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal (PPGBV) - Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, 2022.
- OMARI, B. E. Accumulation versus storage of total non-structural carbohydrates in woody plants. **Tress**, v. 36, n. 3, p. 869-881, 2022.
- PFÄFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 9, p. e36, 2002.
- RAZALI, N. M.; YAP, B. W. Power comparisons of shapiro-wilk, kolmogorov-smirnov, lilliefors and anderson-darling tests. **Journal of statistical modeling and analytics**, v. 2, n. 1, p. 21-33, 2011.
- RASMUSSEN, R. Quantification on the Light Cycler. In: MEUER, S.; WITTEWIT, C.; NAKAGAWARA, K.-I. (Eds.). **Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2001. p. 21-34.
- ROBBINS, S. N.; PHARR, D. Effect of restricted root growth on carbohydrate metabolism and whole plant growth of *Cucumis sativus* L. **Plant Physiol**, v. 87, p. 409-413, 1988.
- SALA, A.; PIPER, F.; HOCH, G. Physiological mechanisms of drought-induced tree mortality are far from being resolved. **The New Phytologist**, v. 186, n. 2, p. 274-281, 2010.
- SADHUKHAN, A.; PRASAD, S. S.; MITRA, J.; SIDDIQUI, N.; SAHOO, L.; KOBAYASHI, Y.; KOYAMA, H. How do plants remember drought?. **Planta**, v. 256, p. 7, 2022.
- SANTOS, M.; BARROS, V.; LIMA, L.; FROSI, G.; SANTOS, M. G. Whole plant water status and non-structural carbohydrates under progressive drought in a Caatinga deciduous woody species. **Trees**, v. 35, p. 1257-1266, 2021.
- SANTOS, M.; NICODEMOS, J.; SANTOS, M. G. Dynamics of nonstructural carbohydrates in a deciduous woody species from tropical dry forests under recurrent water deficit. **Physiologia Plantarum**, v. 174, n. 1, p. e13632, 2022.

- SANTOS, B. S.; LIMA, A. T.; MEIADO, M. V. Interpopulational seed hydration memory does not affect seed germination of *Xiquexique gounellei* (F.A.C.Weber ex K.Schum) Lavar & Calvente subsp. *gounellei* (Cactaceae) under water déficit. **Bradleya**, v. 2023, n. 41, p. 105-116, 2023.
- SARMENTO, E. C. S.; OLIVEIRA, F. S.; CAVRAL, F. A. S.; OLIVEIRA, D. F.; DUTRA, A. S. Physiological potential of sorghum seeds under discontinuous hydration and water deficiency conditions. **Revista de Ciência Agronômica**, v. 51, n. 4, 2020.
- SANTOS JÚNIOR, J. L.; FREITAS, R. S.; SILVA, E. C. Discontinuous hydration improves germination and drought tolerance in *Annona squamosa* seedlings. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, p. e56710313706, 2021.
- SINTAHA, M.; MAN, C.; YUNG, W.; DUAN, S.; LI, M.; LAM, H. Drought stress priming improved the drought tolerance of soybean. **Plants**, v. 11, n. 21, p. 2954, 2022.
- SRIVASTAVA, A. K.; KUMAR, J. S.; SUPRASANNA, P. Seed 'primeomics': plants memorize their germination under stress. **Biological Reviews**, v. 96, n. 5, p. 1723-1743, 2021.
- THAPA, G.; DEY, M.; SAHOO, L.; PANDA, S. K. An insight into the drought stress induced alterations in plants. **Biologia Plantarum**, v. 55, p. 603-613, 2011.
- THALMANN, M.; SANTELIA, D. Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. **New Phytologist**, v. 214, n. 3, p. 943-951, 2017.
- THELLIER, M.; LUTTGE, U. Plant memory: a tentative model. **Plant Biology**, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2013.
- UNTERGASSER, A. U.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.; LEUNISSEN, K. A. M. *Primer3Plus*, an enhanced web interface to *Primer3*. **Nucleic acids research**, v. 35, n. 2, p. W71-W74, 2007.
- VENTOURIS, Y. E.; TANI, E.; AVRAMIDOU, E. V.; ABRAHAM, E. M.; CHORIANOPOULOU, S. N.; VLACHOSTERGIOS, D. N.; PAPADOPOULOS, G.; KAPAZOGLOU, A. Recurrent water déficit and epigenetic memory in *Medicago sativa* L. varieties. **Applied Sciences**, v. 10, n. 9, p. 3110, 2020.
- VILLELA, F. A.; FILHO, L. D. SEQUEIRA, E. L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de Polietileno Glicol 6.000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n. 11/12, p. 1957-1968, 1991.
- VIRLOUVET, L.; AVENSON, T. J.; DU, Q.; ZHANG, C.; LIU, N.; FROMM, M.; AVRAMOVA, Z. RUSSO, S. E. Dehydration stress memory: gene networks linked to physiological responses during repeated stresses of *Zea mays*. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1058, 2018.
- VILELA, L. M. B.; SANTOS-SILVA, C. A.; FILHO, R. S. R.; ARAÚJO, S. S.; FERREIRA-NETO, J. R. C.; OLIVEIRA, W. D.; AMORIM, L. L. B.; PANDOLFI, V.; BENKO-ISEPPON, M. B. *Cenostigma pyramidale*: ethnomedicinal properties and perspectives on a legume tree highly adapted to semiarid 'Caatinga' region. In: **Ethnopharmacology of Wild Plants**. **CRC Press**, p. 218-233, 2021.
- ZUO, D.; AHAMMED, G. J.; GUO, D. Plant transcriptional memory and associated mechanism of abiotic stress tolerance. **Plant Physiology and Biochemistry**, p. 107917, 2023.
- WANG, Y.; HANG, X.; AI, W.; ZHAN, H.; MA, S.; LU, X. Non-structural carbohydrates and growth adaptation strategies of *Quercus mongolica* Fisch. Ex Ledeb. seedlings under drought Stress. **Forests**, v. 14, n. 2, p. 404, 2023.
- WANG, X.; CHEN, J.; GE, J.; HUANG, M.; CAI, J.; ZHOU, Q.; DAI, T.; MUR, L. A. J.; JIANG, D. The different root apex zones contribute to drought priming induced tolerance to a reoccurring drought stress in wheat. **The Crop Journal**, v. 9, n. 5,

p. 1088-1097, 2021.

WOJTYLA, L.; PALUCH-LUBAWA, E.; NOWICKA-SOBIESZCZUK, E.; GARNZARSKA, M. Drought stress memory and subsequent drought stress tolerance in plants. **Academic Press**, p. 115-131, 2020.

YE, J.; COULOURIS, G.; ZARETSKAYA, I.; CUTCUTACHE, I.; ROZEN, S.; MADDEN, T. L. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC bioinformatics**, v. 13, p. 1-11, 2012.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Pares de *primers* de genes de referência candidatos (CRGs) e dos transcritos alvos (genes de memória) desenhados, sintetizados e testados em tecidos radiculares de *C. pyramidale* sob condição de estresse hídrico no tecido radicular, conforme a literatura e identificados no transcriptoma de *C. pyramidale*. GM: Gene de memória; Tm: Temperatura de *melting*; G/C (%): percentual de nucleotídeos Guanina (G) e Citosina (C); pb: pares; E %: Eficiência; N/E: Não eficiente.

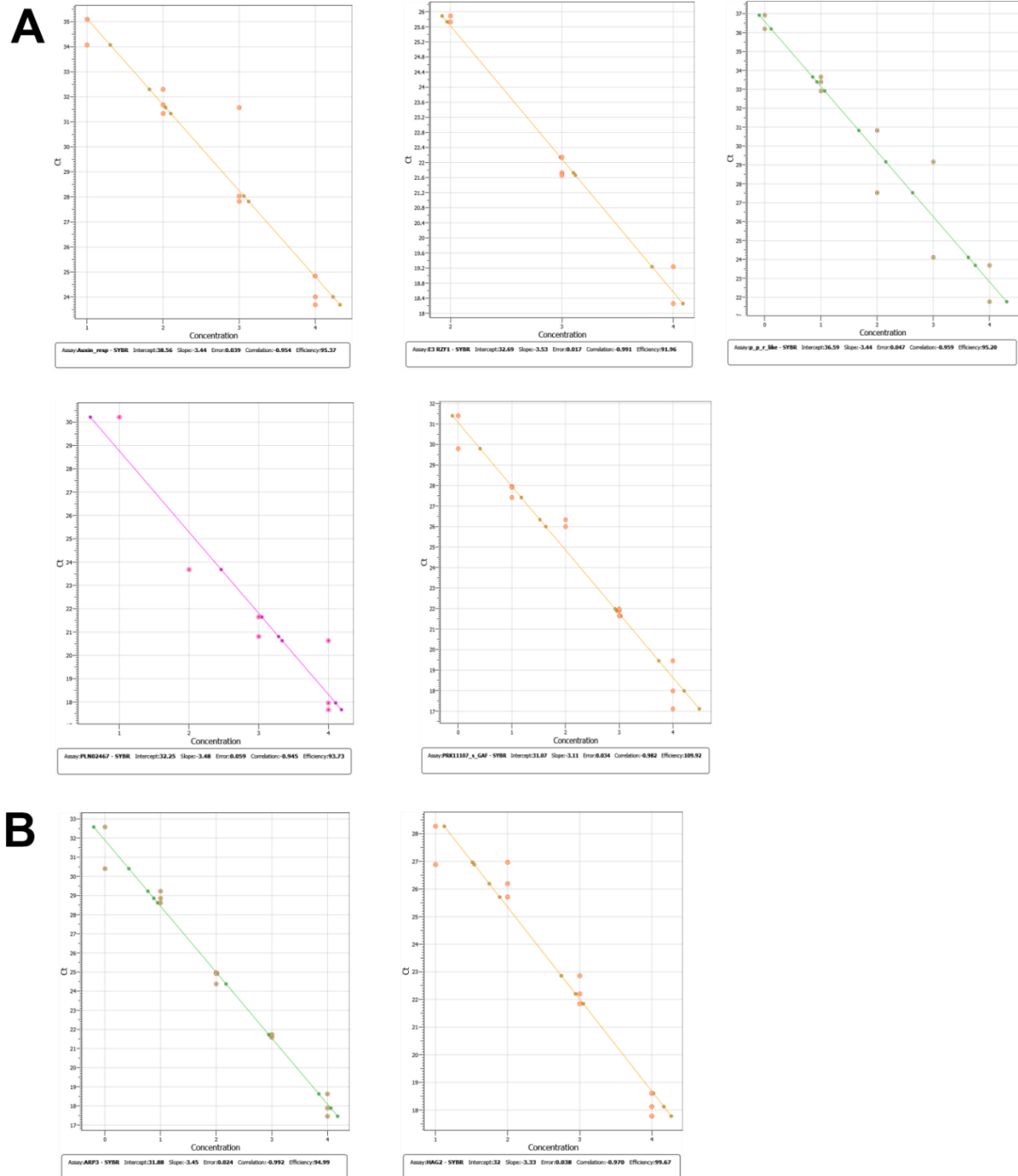
Gene	Anotação	Sequência (5'- 3')	Tm (°C)	G/C (%)	Amplicon (pb)	Referência	Espécie	E %
GENES DE REFERÊNCIA								
ARP3	Actin-related protein 3	(F) AATTCAGCTCAGCCATCCTTT	60.2	42.9	131	Frosi et al. (2021)	C. pyramidale	94.99
		(R) CCAGCCTCACTTTGATTGTTC	59.7	47.6				
HAG2	Histone acetyltransferase type B catalytic subunit	(F) GCATGAGACGAGGAGAGTTTG	60.0	52.4	108	Frosi et al. (2021)	C. pyramidale	99.67
		(R) CACTTCGCCTGCTTAATTTTG	59.9	42.9				
SAC1	Suppressor of Actin	(F) CCAGTCCAGGTCCTTCACATA	60.0	52.4	101	Frosi et al. (2021)	C. pyramidale	N/E
		(R) TGAAGAGAATGGTTGGTACGG	60.0	47.6				
MYB4	Transcription repressor MYB4	(F) TCACCGAAAGAGAAGCAGTGT	60.0	47.6	184	Frosi et al. (2021)	C. pyramidale	N/E
		(R) AGTCCTATGGCTTGCCTGATT	60.1	47.6				
RSH1	Relat/SPOT homolog1	(F) TGACCTCAGCCATGATACCTC	60.1	42.4	168	Frosi et al. (2021)	C. pyramidale	N/E
		(R) ATGTTGCGAAGATGATCCAAG	60.1	42.9				
VFB1	Vier F-box protein1 (At1g47056)	(F) TCAGCATCACCCACTGTATCA	60.1	47.6	169	Frosi et al. (2021)	C. pyramidale	N/E
		(R) GTATTGCCGATGAAGGTTTGA	60.0	42.9				
ALVOS								
GM1	Caleosin	(F) ACGTTGCTTTCTTCGACAGG	60,4	50	145	Este estudo	C. pyramidale	N/E
		(R) GGGCGAGTTTTCTGACTGAG	60	55				
GM2	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate	(F) CCCCCTTCTCAGAAAACAAC	58,6	50	112	Este estudo	C. pyramidale	N/E
		(R)AACTCAATGCAGGAAACACG	58,8	45				
GM3	Auxin_resp	(F) AATCCGGTGACTGGTGCTAC	60	55	65	Este estudo	C. pyramidale	95.37
		(R)TCGTCCTGGGAAAATGAATC	59,9	45				
GM4	GH3 superfamily	(F) TGGGAAATCAGTGGAGAAGC	60,2	50	147	Este estudo		N/E

GM5	Serine/threonine-protein kinase SAPK2	(R)TGTTCCCCTCCTGACAACTC	60,1	55	103	Este estudo	<i>C. pyramidale</i>	N/E
		(F) TCTGCATAAAGGGGGTTTTC	59	45				
		(R)CATATCGATCGCTGTCATGC	60,2	50				
GM6	E3 ubiquitin-protein ligase <i>Cenostigma pyramidale</i> RZF1	(F) CGGTCTTGAGCAGTTGATTC	58,4	50	88	Este estudo	<i>C. pyramidale</i>	91.96
		(R)CCCTTCGATGGCAGATTTTC	60,4	52,6				
GM7	PYR_PYL_RCAR_like	(F) CCTCTCTTCCGATGAACTGC	60	55	83	Este estudo	<i>C. pyramidale</i>	95.20
		(R)GTCAGTGGCTGGGTTGAATC	60,5	55				
GM8	PLN02467	(F) GTTTGGAGCTGGCTGATGTC	60,8	55	158	Este estudo	<i>C. pyramidale</i>	93.73
		(R)AATCTTGCTCCCAGTTGCTG	60,4	50				
GM9	PRK11107 superfamily / GAF	(F) CAGGCCTCAAGGTTCTTGTC	59,8	55	172	Este estudo	<i>C. pyramidale</i>	109.92
		(R)TCTATTCCCGAACACACATCC	59,8	47,6				
GM10	ANKYR	(F) GCGATTAACAAGGCTGGAG	58,5	52,6	172	Este estudo	<i>C. pyramidale</i>	N/E
		(R)GCACGTCATGCCTTATGTCAC	61,5	52,4				
GM11	RING-Ubox_PUB	(F) GATCGGGACTCGTCCATTAG	59,5	55	151	Este estudo	<i>C. pyramidale</i>	N/E
		(R)CAAAAGATGCTTCCCTTTTCG	59,8	45				
GM12	GST_N_Tau	(F) TGTTCCGGGATGAGAGCTAGG	60,4	55	90	Este estudo	<i>C. pyramidale</i>	N/E
		(R)GCAGAGGGCTCTTGTTTCATC	60	55				
GM13	Transp_inhibit	(F) GTTGCTGCCACACAACACTGAC	60,4	55	95	Este estudo	<i>C. pyramidale</i>	N/E
		(R)GGTCTAGCCATTGCCAAAAG	59,7	50				

Tabela S2. Expressão diferencial RT-qPCR da região radicular de *C. pyramidale* durante a reidratação. Ctr (Controle); PHD (Plantas submetidas aos ciclos de HD), SHD (Sementes submetidas aos ciclos de HD) e SPHD (Sementes e Plantas submetidas aos ciclos de HD); E (%): Porcentagem de Eficiência; DR: Downregulation/regulação negativa; UP: Upregulation/regulação positiva; NS: Não significativo/Not significant; R: Correlation; S: Slope; ED*: Expressão Diferencial; NS: Não significativo; UP: up-regulated/regulação positiva; DOWN: down-regulated/regulação negativa.

Tratamentos	Gene	Anotação	E (%)	R	S	Y Intercept	ED*
Alvos							
Ctr versus PHD	GM3	Auxin_resp	95.37	-0.954	-3.44	38.56	0.9537 (NS)
	GM6	E3 ubiquitin-protein ligase CpRZF1	91.96	-0.991	-3.53	32.69	0.966 (NS)
	GM7	PYR_PYL_RCAR_like	95.20	-0.959	-3.44	36.59	5.763 (UP)*
	GM8	PLN02467	93.73	-0.945	-3.48	32.25	1.265 (NS)
	GM9	PRK11107_GAF	109.92	-0.983	-3.11	31.07	1.665 (NS)
Ctr versus SHD	GM3	Auxin_resp	95.37	-0.954	-3.44	38.56	0.499 (NS)
	GM6	E3 ubiquitin-protein ligase CpRZF1	91.96	-0.991	-3.53	32.69	-0.597 (DOWN)*
	GM7	PYR_PYL_RCAR_like	95.20	-0.959	-3.44	36.59	0.745 (NS)
	GM8	PLN02467	93.73	-0.945	-3.48	32.25	1.003 (NS)
	GM9	PRK11107_GAF	109.92	-0.983	-3.11	31.07	-0.280 (DOWN)*
Ctr versus SPHD	GM3	Auxin_resp	95.37	-0.954	-3.44	38.56	0.894 (NS)
	GM6	E3 ubiquitin-protein ligase CpRZF1	91.96	-0.991	-3.53	32.69	1.695 (UP)*
	GM7	PYR_PYL_RCAR_like	95.20	-0.959	-3.44	36.59	3.788 (UP)*
	GM8	PLN02467	93.73	-0.945	-3.48	32.25	1.264 (NS)
	GM9	PRK11107_GAF	109.92	-0.983	-3.11	31.07	0.1099 (NS)
Gene de Referência							
	HAG2	Histone acetyltransferase type B catalytic subunit	99.67	-0.970	-3.33	32	-
	ARP3	Actin-related protein 3	94.99	-3.45	-0.992	31.88	-

Figura S1. Curvas de eficiência absoluta para os genes de alvos (A) e os genes de referência (B) oriundas das reações de RT-qPCR.



5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ Sementes de Catingueira submetidas à ciclos HD responderam mais eficiente nos parâmetros de germinação, em relação às sementes que não passaram ciclos HD. Sugerindo que os ciclos HD ser uma prática recomendada para melhorar a qualidade e a eficiência da germinação de sementes de espécies adaptadas a regiões caracterizadas por períodos de pouca disponibilidade hídrica, como a Caatinga, favorecendo a persistência e dinâmica populacional das espécies.
- ✓ Destaca-se a capacidade notável de manutenção do conteúdo relativo foliar ao longo de 15 dias (desidratação contínua) em plantas que receberam ciclos HD durante a germinação e fase vegetativa, sugerindo um papel potencial do condicionamento dessas espécies na tolerância ao deficit hídrico;
- ✓ A folha é o principal tecido responsável pelo acúmulo de açúcares solúveis durante a reidratação (R4), enquanto a raiz desempenha o papel central no armazenamento de amido durante R4 e desidratação contínua em *C. pyramidale*.
- ✓ Três transcritos associados à memória do estresse hídrico *C. pyramidale* foram superexpressos após o condicionamento HD, mostrando que o condicionamento prévio de estresse por desidratação foi importante para uma resposta menos prejudicial para a planta quando imposta ao mesmo estresse futuro.

SÚMULA CURRICULAR

PAULO VITOR GALDINO DA SILVA (CV: <http://lattes.cnpq.br/8634356371128001>)
Graduação em Ciências Biológicas (2018) pela Universidade Federal de Pernambuco-UFPE. Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – PPGCB

- ✓ "I Ciclo de Seminários do LGBV – 2023", realizado no Departamento de Genética, CB, UFPE. Monitor/Avaliador do Trabalho: '*Advances in the use of plants as potential biofactories in the production of antimicrobial peptides*', 2023.
- ✓ Apresentação do trabalho: Análise da expressão de genes de memória ao estresse por ciclos de hidratação e desidratação em *Cenostigma pyramidale* (Tul.) E. Gagnon & G.P. Lewis'. EVENTO: I Encontro do PPGCB: A ciência como uma ferramenta da AGENDA 2030 para o desenvolvimento sustentável”(2022).
- ✓ IV Simpósio de Genética e Biotecnologia da UFRPE (2022)
- ✓ Participação ouvinte - Palestra 'Pesquisas no French Plant Genomic Resources Centre do National Research Institute for Agriculture, Food and Environment (INRAE, França)', 2022.
- ✓ Membro de Comissão organizadora: I Encontro do PPGCB: A ciência como uma ferramenta da AGENDA 2030 para o desenvolvimento sustentável”. (UFPE, 2022).
- ✓ Análise de expressão gênica por PCR em tempo real. (Carga horária 20h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE (2021).
- ✓ Agricultura de A a Z | O uso de biológicos na agricultura. 2022. (Congresso).
- ✓ XXIII Encontro de Genética do Nordeste. 2021. (Encontro).
- ✓ Metodologias Híbridas. Associação de Docentes da UFPE Iniciação de Docentes da UFPE, ADUFEPE, Brasil, 2021.
- ✓ Análise de expressão gênica por PCR em tempo real. Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil, 2021.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AULER, R. A.; SOUZA, G. M.; ENGELA, M. R. G.; AMARAL, M. N. A.; ROSSATTO, T.; SILVA, M. G. Z.; FURLAN, C. M.; MASERTI, B.; BRAGA, E. J. B. Stress memory of physiological, biochemical and metabolomic responses in two different rice genotypes under drought stress: The scale matters. **Plant Science**, v. 311, p. 110994, 2021.
- ABID, M.; HAKEEM, A.; SHAO, Y.; LIU, Y.; ZAHOOOR, R.; FAN, Y.; SUYU, J.; ATA-UL-KARIM, S. T.; TIAN, Z.; JIANG, D.; SNIDER, J. L.; DAI, T. Seed osmopriming invokes stress memory against post-germinative drought stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Environmental and Experimental Botany**, v. 145, p. 12-20, 2018.
- ABUD, H. F.; GONÇALVES, N. R.; REIS, R. G. E.; GALLÃO, M. I.; INNECCO, R. Morfologia de sementes e plântulas de cártamos. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 2, p. 259-265, 2010.
- AFZAL, I.; RAUF, S.; BASRA, S. M. A.; MURTAZA, G. Halopriming improves vigor, metabolism of reserves and ionic contents in wheat seedlings under salt stress. **Plant Soil Environ**, v. 54, n. 9, p. 382-388, 2008.
- ALMEIDA, S. A.; GUARIZ, H. R.; PINTO, M. A. B.; ALMEIDA, M. F. Germination of creole maize and fava bean seeds under salt stress. **Revista Caatinga**, v. 33, n. 3, 2020.
- ALVARADO, V., & BRADFORD, K. J. A hydrothermal time model explains the cardinal temperatures for seed germination. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, n. 8, 1061-1069, 2002.
- ANTUNES, C. G. C.; CASTRO, R. D.; NETO, V. G.; MARQUES, A. C. S. S.; TAKAHASHI, D.; FERNANEZ, L. G.; CRUZ, C. R. P.; TOOROP, P.; AFLITOS, S. A.; HILHORST, H. W. M.; LIGTERINK, W. Osmopriming-associated genes in *Poincianella pyramidalis*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 183, p. 104345, 2021.
- ARAÚJO, E. L.; CANUTO, V. T. B.; LEITE, F. V. A.; LIMA, V. C.; CANUTO, N. N. **Germinação e protocolos de dormência de plantas do semiárido nordestino**. In: GIULIETTI, A.M.; QUEIROZ, L.P. (Eds.). Recursos genéticos do semiárido nordestino. v.5. Recife, Instituto de Milênio do Semiárido. 2006.
- ARUN, M. N.; HEBBAR, S. S.; BHANUPRAKASH, SENTHIVEL, T.; NAIR, A. K.; PADMAVATHI, G.; PANDEY, P.; SINGH, A. Seed priming: the way forward to mitigate abiotic stress in crops. **Plant Stress Physiology - Perspectives in Agriculture**, p. 1-30, 2022.
- BAILEY-SERRES, J.; PARKER, J. E.; AINSWORTH, E. A.; OLDROYD, G. E. D.; SCHROEDER, J. I. Genetic strategies for improving crop yields. **Nature**, v. 575, n. 7781, 109-118, 2019.
- BEWLEY, J. D.; PRETO, M. **Sementes: fisiologia do desenvolvimento e germinação**. Springer Science & Business Media, 2013.
- BONFIM, R. S.; LOPES, P. M.; ARAÚJO, S. G.; FURTADO, M. D. G.; SOUZA, R. R.; BECKMAN-CAVALCANTE, M. Z. Caracterização de sementes de *Allamanda puberula* A. DC. e produção de mudas. **Ornamental Horticulture**, v. 27, n. 3, 2021.
- CARRERA-CASTAÑO, G.; CABRERA-CALLEJA, J.; PERNAS, M.; GÓMEZ, L.; OÑTE-SÁNCHEZ, L. An updated overview on the regulation of seed germination. **Plants**, v. 9, n. 6, p. 703, 2020.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**.

- 5.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2012. 590p.
- CHEN, J.; ZHONG, Y.; QI, X. LncRNA TCONS_00021861 is functionally associated with drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) via competing endogenous RNA regulation. **BMC Plant Biology**, v. 21, p. 410.62, 2021.
- CHEN, Y.; LI, C.; YI, J.; YANG, Y.; LEI, C.; GONG, M. Transcriptome response to drought, rehydration and re-dehydration in potato. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 1, p. 159, 2020.
- CRISP, P. A.; GANGULY, D.; EICHTEIN, S.; BOREVITZ, J. O.; POGSON, B. J. Reconsidering plant memory: intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. **Science advances**, v. 2, n. 2, p. e1501340, 2016.
- DAI, A. Increasing drought under global warming in observations and models. **Nature climate change**, v. 3, n. 1, p. 52-58, 2013.
- DANTAS, B. F.; MOURA, M. S. B.; PELACANI, C. R.; ANGELOTTI, F.; TAURA, T. A.; OLIVEIRA, G. M.; BISPO, J. S.; MATIAS, J. R.; SILVA, F. F. S.; PRITCHARD, H. W.; SEAL, C. E. Rainfall, not soil temperature, will limit the seed germination of dry forest species with climate change. *Oecologia*, v. 192, n. 2, p. 529-541, 2020.
- DANTAS, B. F.; CORREIA, J. S.; MARINHO, L. B.; ARAGÃO, C. A. Alterações bioquímicas durante a embebição de sementes de catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.). **Revista Brasileira de Sementes**, n. 30, v. 1, 2008.
- Da SILVA, J. M. C.; LEAL, I. R.; TABARELLI, M. **Caatinga: The Largest Tropical Dry Forest Region in South America**. Springer, 2018a.
- DING, Y.; FROMM, M.; AVRAMOVA, Z. Multiple exposures to drought 'train' transcriptional responses in *Arabidopsis*. **Nature Communications**, v. 3, n. 740, 2012.
- DING, Y.; LIU, N.; VIRLOUVET, L.; RIETHOVEN, J.; FROMM, M.; AVRAMOVA, Z. Four distinct types of dehydration stress memory genes in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Plant Biology**, v. 13, n. 229, 2013.
- DING, Y.; FROMM, M.; AVRAMOVA, Z. Multiple exposures to drought 'train' transcriptional responses in *Arabidopsis*. **Nature Communications**, v. 3, n. 740, 2012.
- DING, Y.; VIRLOUVET, L.; LIU, N.; REITHOVEN, J.; FROMM, M.; AVRAMOVA, Z. Dehydration stress memory genes of *Zea mays*; comparison with *Arabidopsis thaliana*. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 141, 2014.
- DUBROVSKY, J. G. Discontinuous hydration as a facultative requirement for seed germination in Two cactus species of the sonoran desert. **Journal of the Torrey Botanical Society**, v. 125, p. 33-39, 1998.
- EL-SANATAWY, A. M.; AHS-SHORMILLESY, S. M.; QABIL, N.; AWAD, M. F.; MANSOUR, E. Seed halo-priming improves seedling vigor, grain yield, and water use efficiency of maize under varying irrigation regimes. **Water**, v. 13, n. 15, p. 2115, 2021.
- FAROOQ, M.; ROMDHANE, L.; REHMAN, A.; AL-ALAWI, A. K. M.; AL-BUSAIDI, W. M.; ASAD, S. A.; LEE, D. Integration of seed priming and biochar application improves drought tolerance in cowpea. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 40, p. 1972-1980, 2021a.
- FAROOQ, M.; ALMAMARI, S. A. D.; AL-BUSAIDI, W. M.; WAHID, A.; AL-GHAMDI, S. S. Morphological, physiological and biochemical aspects of zinc seed priming-induced drought tolerance in faba bean. **Scientia Horticulturae**, V. 281, P. 109894, 2021b.
- FAROOQ, M.; USMAN, M.; NADEEM, F.; REHMAN, H.; WAHID, A.; BASRA, S. M.; SIDDIQUE, K. H. M. Seed priming in field crops: potential benefits, adoption and

- challenges. **Crop & Pasture Science**, v. 70, p. 731-771, 2019.
- FLETA-SORIANO, E.; PINTÓ-MARIJUAN, M.; BOSCH-MUNNÉ, S. Evidence of Drought Stress Memory in the Facultative CAM, *Aptenia cordifolia*: Possible Role of Phytohormones. **PLoS One**, v. 10, n. 8, e0135391, 2015.
- FERNANDES, M. F.; CARDOSO, D.; QUEIROZ, L. P. An updated plant checklist of the Brazilian Caatinga Seasonally Dry Forests and woodlands reveals high species Richness and Endemism. **Journal of Arid Environments**, v. 174, p. 1-8, 2020.
- FUENTE, J. L. L.; ZUNZUNEGUI, M.; BARRADAS, M. C. D. Physiological responses to water stress and stress memory in *Argania spinosa*. **Plant Stress**, v. 7, p. 100133, 2023.
- FREITAS, R. S.; MEIADO, M. V.; SILVA, E. C. Seed discontinuous hydration does not benefit germination, but improves drought tolerance of *Triplaris gardneriana* seedlings. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, v. 43, n. 1, 2021.
- GALVIZ, Y. C. F.; RIBEIRO R. V.; SOUZA G. M. Yes, plants do have memory. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 32, p.195–202, 2020.
- GALVIZ Y.; SOUZA G.M.; LÜTTGE, U. The biological concept of stress revisited: relations of stress and memory of plants as a matter of space–time. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 34, p. 239–264, 2022.
- GOWDIN, J.; FARRONA, S. Plant epigenetic stress memory induced by drought: a physiological and molecular perspective. **Plant epigenetics and epigenomics: methods and protocols**, p. 243-259, 2020.
- GUEDES, F. A. F.; NOBRES, P.; FERREIRA, D. C. R.; MENEZES-SILVA, P. E.; RIBEIRO-ALVES, M.; CORREA, R. L.; DAMATTA, F. M.; ALVES-FERREIRA, M. Transcriptional memory contributes to drought tolerance in coffee (*Coffea canephora*) plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 147, p. 220-233, 2018.
- GUEDES, F. A. F.; MENEZES-SILVA, P. E.; DAMTTA, F. M.; ALVES-FERREIRA, M. Using transcriptomics to assess plant stress memory. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 31, p. 47-58, 2019.
- HEYDECKER, W.; HIGGINS, J.; GULLIVER, R. Accelerated germination by osmotic seed treatment. **Nature**, v. 246, p. 42-44, 1973.
- HILKER, M. SCHUMULLING, T. Stress priming, memory, and signalling in plants. **Plant, Cell & Environment**, v. 42, n. 3, p. 753-761, 2019.
- HILKER, M.; SCHWACHTJE, J.; BAIER, M.; BALAZADEH, S.; BAURLE, I.; GEISELHARDT, S.; HINCHA, D. K.; KUNZE, R.; MUELLER-ROEBER, B.; ROLLING, M. C.; ROLFF, J.; ROMEIS, T.; SCHMULLING, T.; STEPPUHN, A.; DONGEN, J. V.; WHITCOMB, S. J.; WURST, S.; ZUTHER, E.; KOPKA, J. Priming and memory of stress responses in organisms lacking a nervous system. **Biological Reviews**, v. 91, n. 4, p. 1118-1133, 2016.
- HOSSAIN, M. A.; LIU, F.; BURRITT, D. J.; FUJITA, M.; HUANG, B. **Priming-mediated stress and cross-stress tolerance in crop plants**. Academic Press, 2020.
- HOSSEINI, M. S.; ZAHEDI, S. M.; HOVEIZEH, N. F.; LI, L.; RAFIEE, M.; FAROOQ, M. Improving seed germination and seedling growth of guava under heat and osmotic stresses by chemical and hormonal seed treatments. **Bragantia**, v. 79, n. 4, p. 512-524, 2020.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2019. **Biomass e sistema costeiro-marinho do Brasil: compatível com a escala 1:250.000**. Rio de Janeiro, Coordenação de Recursos Naturais e Estudos Ambientais. 168 p. (Relatórios metodológicos, v. 45).

- IBRAHIM, E. A. (2016). Seed priming to alleviate salinity stress in germinating seeds. **Journal of plant physiology**, 192, 38-46.
- JACQUES, C.; SALON, C.; BARNARD, R.; VERNOUD, V.; PRUDENT, M. Drought stress memory at the plant cycle level: a review. **Plants**, v. 10, n. 9, p. 1873, 2021.
- JOHNSON, R.; PUTHUR, J. Seed priming as a cost effective technique for developing plants with cross tolerance to salinity stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.162, p. 248-257, 2021.
- JÚNIOR, J. L.; FREITAS, R. S.; SILVA, E. C. Discontinuous hydration improves germination and drought tolerance in *Annona squamosa* seedlings. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, p. e56710313706, 2021.
- KAMBONA, C. M.; KOUA, P. A.; LÉON, J.; BALLVORA, A. Stress memory and its regulation in plants experiencing recurrent drought conditions. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 136, n. 2, p. 26, 2023.
- KNIGHT, H.; BRANDT, S.; KNIGHT. A history of stress alters drought calcium signalling pathways in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 16, n. 6, p. 681-687, 1998.
- KHAJEH-HOSSEINI, M.; POWELL, A. A.; BINGHAM, I. J. The interaction between salinity stress and seed vigour during germination of soyabean seeds. **Seed Science and technology**, v. 31, n. 3, p. 715-725, 2003.
- KHALID, M. F.; HUSSAIAN, S.; ANJUM, M. A.; EJAZ, S.; AHMAD, M.; JAN, M.; ZAFAR, S.; ZAKIR, I.; ALI, M. A.; AHMAD, N.; RAO, M. J.; AHMAD, S. Hydropriming for plant growth and stress tolerance. In: HASANUZZAMAN, M.; FOTOPOULOS, V (Org.). **Priming and pretreatment of Seeds and Seedlings: implication in plant stress tolerance and enhancing productivity in crop plants**. Springer, Singapore, p. 1-10, 2019.
- KIM, J.; TO, T. K.; ISHIDA, J.; MATSUI, A.; KIMURA, H.; SEKI, M. Transition of chromatin status during the process of recovery from drought stress in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, v. 53, n. 5, p. 847-856, 2012.
- KIM, Y.; CHAE, S.; OH, N.; NGUYEN, N. H.; CHEONG, J. Recurrent drought conditions enhance the Induction of drought stress memory genes in *Glycine max* L. **Frontiers in genetics**, v. 11, p. 1248, 2020.
- LAW, J. A.; JACOBSEN, S. E. Establishing, maintaining, and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, p. 204–220, 2010.
- LAMICHHANE, J. R.; DEBAEKE, P.; STEINBERG, C.; YOU, M. P.; BARBETTI, M. J.; AUBERTOT, J. N. Abiotic and biotic factors affecting crop seed germination and seedling emergence: a conceptual framework. **Plant and Soil**, v. 432, p. 1-28, 2018.
- LÄMKE J.; BÄURLE I. Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants. **Genome Biology**, v. 18, n. 1, p. 11, 2017.
- LECHOWSKA, K.; KUBALA, S.; WOJTYLA, L.; NOWACZYK, G.; QUINET, M.; LUTTS, S.; GARNCZARSKA, M. New insight on water status in germinating seeds in relation to priming-improved germination. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, 2019.
- LEMMENS, E.; DELEU, L. J.; BRIER, N.; MAN, W. L.; PROFT M.; PRINSEN E.; DELCOUR, J. A. The Impact of Hydro-Priming and Osmo-Priming on Seedling characteristics, plant hormone concentrations, activity of selected hydrolytic enzymes, and cell wall and phytate hydrolysis in sprouted Wheat (*Triticum aestivum* L.). **ACS Omega**, v. 4, n. 26, 2019.

- LI, P.; YANG, H.; WANG, L.; LIU, H.; HUO, H.; ZHANG, C.; LIU, A.; ZHU, A.; HU, J.; LIN, Y.; LIU, L. Physiological and transcriptome analyses reveal short-term responses and formation of memory under drought stress in rice. **Frontiers in genetics**, v. 10, p. 55, 2019.
- LIU, N.; FROMM, M.; AVRAMOVA, Z. *H3K27me3* and *H3K4me3* chromatin environment at super-induced de hydration stress memory genes of *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant**, v. 7, p. 502-513, 2014.
- LIU, H.; ABLE, A.; ABLE, J. Priming crops for the future: rewiring stress memory. **Trends in Plant Sciences**, 2021.
- LIU, X.; QUAN, W.; BARTELS, D. Stress memory responses and seed priming correlate with drought tolerance in plants: an overview. **Planta**, v. 255, n. 2, p. 1-14, 2022.
- LIMA, A. T. **Memória hídrica de sementes: implicações ecofisiológicas durante a germinação e o desenvolvimento inicial de espécies da Caatinga**. 2019. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2019.
- LIMA, A. T.; MEIADO, M. V. Discontinuous hydration alters seed germination under stress of two populations of cactus that occur in different ecosystems in Northeast Brazil. **Seed Science Research**, v. 27, n. 4, 2017.
- LIMA, A. T.; CUNHA, P. H. J.; DANTAS, B. F.; MEIADO, M. V. Does discontinuous hydration of *Senna spectabilis* (DC.) H.S. Irwin & Barneby var. *excelsa* (Schrad.) H.S. Irwin & Barneby (Fabaceae) seeds confer tolerance to water stress during seed germination? **Journal of Seed Science**, v. 40, n. 1, 2018.
- LÓPEZ-URRUTIA, E.; MARTÍNEZ-GARCÍA, M.; MONSALVO-REYES, A.; SALAZAR-ROJAS, V.; MONTOYA, R.; CAMPOS, J. E. Differential RNA- and protein-expression profiles of cactus seeds capable of hydration memory. **Seed Science Research**, v. 24, p. 91–99, 2014
- LUO, L.; ZHENG, Y.; GAO, Z.; CHEN, Q.; KONG, X.; YANG, Y. Grafting improves drought stress memory by increasing the *P5CS1* gene expression in *Brassica rapa*. **Plant and Soil**, v. 452, p. 61-72, 2020.
- MATIAS, J. R.; TORRES, S. B.; FREIRE, J. N. T.; ALENCAR, S. D. S.; DANTAS, B. F. Germinação de sementes de *Cenostigma pyramidale* sob diferentes temperaturas e salinidades. **Informativo ABRATES**, v. 8, n. 1, p. 115-118. 2018.
- MARTHANDAN, V.; GEETHA, R.; KUMUTHA, K.; RENGANATHAN, V. G.; KARTHIKEYAN, A.; RAMALINGAM, J. Seed priming: a feasible strategy to enhance drought tolerance in crop plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8258, p. 1-23, 2020.
- MAHMOOD, A.; TURGAY, O. C.; FAROOQ, M.; HAYATM, R. Seed biopriming with plant growth promoting rhizobacteria: a review. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 8, 2016.
- MAJDA, C.; KHALID, D.; AZIZ, A.; RACHID, B.; BADR, A.; LOTFI, A.; MOHAMED, B. Nutri-priming as an efficient means to improve the agronomic performance of molybdenum in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Science of The Total Environment**, v. 661, p. 654-663, 2019.
- MANTOAN, L. P. B.; CORRÊA, C. V.; RAINHO, C. A.; ALMEIDA, L. F. R. Rapid dehydration induces long-term water deficit memory in sorghum seedlings: advantages and consequences. **Environmental and Experimental Botany**, v. 180, p. 104252, 2020.
- MANCUSO, S. **Evolução das plantas: um novo modelo para o futuro**. São Paulo: Ubu Editora, cap. 1, p. 2019.

- MARCOS, F. C. C.; SILVEIRA, N. M.; MARCHIORI, P. E. R.; MACHADO, E. C.; SOUZA, G. M.; LANDELL, M. G. A.; RIBEIRO, R. V. Drought tolerance of sugarcane propagules is improved when origin material faces water deficit. **PLoS One**, v. 13, n. 12, p. e0206716, 2018a.
- MARCOS, F. C. C.; SILVEIRA, N. M.; MOKOCHINSKI, J. B.; SAWAYA, A. C. H. F.; MARCHIORI, P. E. R.; MACHADO, E. C.; SOUZA, G. M.; LANDELL, M. G. A.; RIBEIRO, R. V. Drought tolerance of sugarcane is improved by previous exposure to water deficit. **Journal of Plant Physiology**, v. 223, p. 9-18, 2018b.
- MAYER, B. F.; CHARRON, J. Transcriptional memories mediate the plasticity of cold stress responses to enable morphological acclimation in *Brachypodium distachyon*. **New Phytologist**, v. 229, p. 1615-1634, 2021.
- MENCONI, M.; SGHERRI, C. L. M.; PINZINO, C.; NAVARI-LZZO, F. Activated oxygen production and detoxification in wheat plants subjected to a water deficit programme. **Journal of Experimental Botany**, v. 46, n. 9, p. 1123-1130, 1995.
- MEIADO, M. V. **Evidências de memória hídrica em sementes da Caatinga**. In: Anais do 64 Congresso Nacional de Botânica: botânica sempre viva. Belo Horizonte, Sociedade Botânica do Brasil. p. 89-94, 2013.
- MEIADO, M. V.; SILVA, F. F. S.; BARBOSA, D. C. A.; FILHO, J. A. S. Diásporos da caatinga: uma revisão. **Informativo Abrates**, v. 24, n. 3, p. 39-43, 2014.
- MEIADO, M. V. Banco de sementes no solo da Caatinga, uma Floresta Tropical Seca no Nordeste do Brasil. **Informativo Abrates**, v. 3, pág. 39-43, 2014.
- MEIADO, M. V.; SILVA, F. D.; BARBOSA, D. C. A.; SIQUEIRA-FILHO, J. A. Diaspore of the caatinga: a review. **Flora of the Caatingas of the São Francisco River: Natural History and Conservation**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio Editorial, p. 306-365. 2012.
- MEIADO, M.V.; ROJAS-ARÉCHIGA, M.; SIQUEIRA-FILHO, J.A.; LEAL, I.R. Effects of light and temperature on seed germination of cacti of Brazilian ecosystems. **Plant Species Biology**, v.31, n.2, p.87-97, 2016.
- MICHMIZOS, D.; HILIOTI, Z. A roadmap towards a functional paradigm for learning & memory in plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 232, p. 209-215, 2019.
- MORO, A. V. I.; BRAVO, S. J.; ABDALA, N. R.; BORGHETTI, F.; CHAIB, A. M.; GALETTO. Heat shock effects on germination and seed survival of five woody species from the Chaco region. **Flora**, p. 151751, 2021.
- NASCIMENTO, J. P. B.; MEIADO, M. V.; SIQUEIRA-FILHO, J. A. Seed germination of three endangered subspecies of *Discocactus* Pfeiff. (Cactaceae) in response to environmental factors. **Journal of Seed Science**, v.40, n.3, p.253-262, 2018.
- NASCIMENTO, J. P. B.; DANTAS, B. F.; MEIADO, M. V. Hydropriming changes temperature thresholds for seed germination of tree species from the Caatinga, a Brazilian tropical dry forest. **Journal of seed science**, v. 43, 2021.
- NASCIMENTO, J. P. B.; MEIADO, M. V. Hidratação descontínua de sementes em regiões semiáridas e suas implicações ecológicas: uma revisão com foco na floresta tropical seca brasileira. **Editora Artemis**, v. 5, 2021.
- NICOLAU, J, P. B.; SILVA, F. E.; FELIX, F. C.; TORRES, S. B.; PACHECO, M. V.; PEREIRA, M. D. Discontínuos hydration on the germination of *Mimosa caesalpiniiifolia* and *Pityrocarpa moniliformis* seeds under water stress. **Revista Caatinga**, v. 33, p. 555-561, 2020.
- NOGUEIRA, N., FREITAS, R., LEAL, C., & TORRES, S. Estresse salino na emergência e desenvolvimento inicial de plântulas de jurema-branca. **Advances in Forestry Science**, v. 7, n. 3, p. 1081-1087, 2020.
- OMARI, B. E. Accumulation versus storage of total non-structural carbohydrates in

- woody plants. **Tress**, v. 36, n. 3, p. 869-881, 2022.
- PANDITA, V. K.; ANAND, A.; NAGARAJAN, S.; SETH, R.; SINHA, S. N. Solid matrix priming improves seed emergence and crop performance in okra. **Seed Science and Technology**, v. 38, n. 3, p. 665-674, 2010.
- PAPADOPOULOU, A.; MATSI, T.; KAMOU, N.; AVDOULI, D.; MELLIDOU, I.; KARAMANOLI, K. Decoding the potential of a new *Pseudomonas putida* strain for inducing drought tolerance of tomato (*Solanum lycopersicum*) plants through seed biopriming. **Journal of Plant Physiology**, v. 271, p. 153658, 2022.
- PENFIELD, S.; MACGREGOR, D. R. Effects of environmental variation during seed production on seed dormancy and germination. **Journal of experimental botany**, v. 68, n. 4, p. 819-825, 2017.
- PARISE, A. G.; TOLEDO, G. R. A.; OLIVEIRA, T. F. C.; SOUZA, G. M.; CASTIELLO, U.; GAGLIANO, M.; MARDER, M. Do plants pay attention? A possible phenomenological-empirical approach. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 173, p. 11-23, 2022.
- QUEIROZ, L. P. **Leguminosas da Caatinga**. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009.
- RAMÍREZ, D. A.; ROLANDO, J. L.; YACTAYO, W.; MONNEVEUX, P.; MARES, V.; QUIROZ, R. Improving potato drought tolerance through the induction of long-term water stress memory. **Plant Science**, v. 238, p. 26-32, 2015.
- RHAMAN, M. S.; RAUF, F.; TANIA, S. S.; KHATUN, M. Seed priming methods: application in field crops and future perspectives. **Asian Journal of Research in Crop Science**, v. 5, n. 2, p. 8-19, 2020.
- RHAMAN, M. S.; IMRAN, S.; RAUF, F.; KHATUN, M.; BASKIN, C. C.; MURATA, Y.; HASANUZZAMAN, M. Seed priming with phytohormones: an effective approach for the mitigation of abiotic stress. **Plants (Basel)**, v. 10, n. 1, 2021.
- RIBEIRO, R. V.; VITTI, K. A.; MARCOS, F. C. C.; SOUZA, G. M.; PISSOLATO, M. D.; ALMEIDA, L. F. R.; MACHADO, E. C. Proposal of an index of stability for evaluating plant drought memory: A case study in sugarcane. **Journal of Plant Physiology**, v. 260, p. 153397, 2021.
- ROSSATTO, T.; SOUZA, G. M.; AMARAL, M. N.; AULER, P. A.; PÉREZ-ALONSO, M. M.; POLLMANN, S.; BRAGA, E. J. B. Cross-stress memory: Salt priming at vegetative growth stages improves tolerance to drought stress during grain-filling in rice plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 206, p. 105187, 2023.
- SANI, E.; HERZYK, P.; PERRELLA, G.; COLOT, V.; AMTMANN, A. Hyperosmotic priming of *Arabidopsis* seedlings establishes a long-term somatic memory accompanied by specific changes of the epigenome. **Genome Biology**, v. 14, n. 59, 2013.
- SANTOS, T. B.; RIBAS, A. F.; SOUZA, S. G. H.; BUDZINSKI, I. G. F.; DOMINGUES, D. S. Physiological responses to drought, salinity, and heat stress in plants: a review. **Stresses**, v. 2, n. 1, p. 113-135, 2022.
- SANTOS, B. S.; LIMA, A. T.; MEIADO, M. V. Interpopulational seed hydration memory does not affect seed germination of *Xiquexique gounellei* (F.A.C.Weber ex K.Schum) Lavar & Calvente subsp. *gounellei* (Cactaceae) under water déficit. **Bradleya**, v. 2023, n. 41, p. 105-116, 2023.
- SANTOS, K. C.; DANTAS, B. F. Influência da hidratação descontínua em sementes armazenadas de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. Zucc. **Revista Agronomia Brasileira**, v. 5, 2021.
- SANTOS, A. P.; MEIADO, M. V. A hidratação descontínua em sementes favorece a

- produção de mudas de *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae)? **Agroforestalis News**, v. 1, n. 1, 2016.
- SANTOS, G.; ZONETTI, P. C. Influência da temperatura na germinação e desenvolvimento do Girassol (*Helianthus annuus* L.). **Iniciação Científica Cesumar**, v. 11, n. 1, p. 23-27, 2009.
- SADHUKHAN, A.; PRASAD, S. S.; MITRA, J.; NADEEM, S.; SAHOO, L.; KOBAYASHI, Y.; KOYAMA, H. How do plants
- SARMENTO, E. C. S.; OLIVEIRA, F. S.; CABRAL, F. A. S.; OLIVEIRA, D. F.; DUTRA, A. S. Potencial fisiológico de sementes de sorgo sob condições de hidratação descontínua e déficit hídrico. **Revista Ciência Agronômica**, v. 51, 2020.
- SHAHVERDI, M. A.; OMIDI, H.; TABATABAEI, S. J. Effect of nutri-priming on germination indices and physiological characteristics of stevia seedling under salinity stress. **Journal of Seed Science**, v. 39, p. 353-362, 2017.
- SHER, A.; SARWAR, T.; NAWAZ, A.; IJAZ, M.; SATTAR, A.; AHMAD, S. Methods of seed priming. **Priming and Pretreatment of Seeds and Seedlings: Implication in Plant Stress Tolerance and Enhancing Productivity in Crop Plants**, p. 1-10, 2019.
- SRIVASTAVA, A. K.; KUMAR, J. S.; SUPRASANNA, P. Seed 'primeomics': plants memorize their germination under stress. **Biological Reviews**, v. 96, n. 5, p. 1723-1743, 2021.
- SILVA, F. F. S.; OLIVEIRA, G. M.; NASCIMENTO, M. A.; ANGELOTTI, F.; MOURA, M. S. B.; DANTAS, B. F. Rainfall events, high CO₂ concentration, and germination of seeds in Caatinga. **Journal of Environmental Analysis and Progress**, v. 02, n. 03, p. 258-265, 2017.
- SILVA, A. R.; LEÃO-ARAÚJO, E. F.; REZENDA, B. R.; SANTOS, W. V.; SANTANA, H. A.; SILVA, S. C. M.; FERNANDES, N. A.; COSTA, D. S.; MESQUITA, J. C. P. Modeling the three phases of the soaking kinetics of seeds. **Agronomy Journal**, v. 110, n. 1, p. 164-170, 2018.
- SUN, R. Z.; LIU, J.; WANG, Y. Y.; DENG, X. DNA methylation-mediated modulation of rapid desiccation tolerance acquisition and dehydration stress memory in the resurrection plant *Boea hygrometrica*. **PLoS Genetics**, v. 17, n. 4, p. e1009549, 2021.
- TANKARI, Moussa et al. Drought priming improved water status, photosynthesis and water productivity of cowpea during post-anthesis drought stress. **Agricultural Water Management**, v. 245, p. 106565, 2021.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- TAYLOR, A. G.; HARMAN, G. E. Concepts and technologies of selected seed treatments. **Annual review of phytopathology**, v. 28, n. 1, p. 321-339, 1990.
- THIEBAUT, F.; HEMERLY, A. S.; PERREIRA, P. C. G. A role for epigenetic regulation in the adaptation and stress responses of non-model plants. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 246, 2019.
- THELLIER, M.; LUTTGE, U. Plant memory: a tentative model. **Plant Biology**, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2013.
- VICENTE-SERRANO, S. M.; QUIRING, S. M.; PEÑA-GALLARDO, M.; YUAN, S.; DOMÍNGUEZ-CASTRO, F. A review of environmental droughts: Increased risk under global warming?. **Earth-Science Rev**, v. 201, p. 102953, 2020.
- VILELA, L. M. B.; SANTOS-SILVA, C. A.; FILHO, R. S. R.; ARAÚJO, S. S.; FERREIRA-NETO, J. R. C.; OLIVEIRA, W. D.; AMORIM, L. L. B.; PANDOLFI, V.; BENKO-ISEPPON, M. B. *Cenostigma pyramidale*: ethnomedicinal properties

- and perspectives on a legume tree highly adapted to semiarid 'Caatinga' region. In: **Ethnopharmacology of Wild Plants**. CRC Press, p. 218-233, 2021.
- VIRLOUVET, L.; AVENSON, T. J.; DU, Q.; ZHANG, C.; LIU, N.; FROMM, M.; AVRAMOVA, Z. RUSSO, S. E. Dehydration stress memory: gene networks linked to physiological responses during repeated stresses of *Zea mays*. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1058, 2018.
- VIRLOUVET, L.; FROMM, M. Physiological and transcriptional memory in guard cells during repetitive dehydration stress. **New Phytologist**, v. 205, n. 2, p. 596-607, 2015.
- ZANDALINAS, S. I.; FICHAMAN, Y.; DEVIREDDY, A. R.; SENGUPTA, S.; AZAD, R. K.; MITTLER, R. Systemic signaling during abiotic stress combination in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 24, p. 13810-13820, 2020.
- ZUO, D.; AHAMMED, G. J.; GUO, D. Plant transcriptional memory and associated mechanism of abiotic stress tolerance. **Plant Physiology and Biochemistry**, p. 107917, 2023.
- XU, L.; CHEN, N.; ZHANG, X. Global drought trends under 1.5 and 2 °C warming. **International Journal of Climatology**, v. 39, n. 4, p. 2375-2385, 2019.
- WALTER, J.; JENTSCH, A.; BEIERKUHNLEIN, C.; KREYLING, J. Ecological stress memory and cross stress tolerance in plants in the face of climate extremes. **Environmental and Experimental Botany**, v. 94, p. 3-8, 2013.
- WANG, X.; CHEN, J.; GE, J.; HUANG, M.; CAI, J.; ZHOU, Q.; DAI, T.; MUR, L. A. J.; JIANG, D. The different root apex zones contribute to drought *priming* induced tolerance to a reoccurring drought stress in wheat. *The Crop Journal*, v. 9, p. 1088-1097, 2021.
- WOJTYLA, L.; PALUCH-LUBAWA, E.; NOWICKA-SOBIESZCZUK, E.; GARNZARSKA, M. Drought stress memory and subsequent drought stress tolerance in plants. **Academic Press**, p. 115-131, 2020.
- ZHENG, X.; CHEN, L.; XIA, H.; WEI, H.; LOU, Q.; LI, M.; LI, T.; LUO, L. Transgenerational epimutations induced by multi-generation drought imposition mediate rice plant's adaptation to drought condition. **Relatório Científicos**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.

