



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA

RICARDO LEONI GONÇALVES BASTOS

**EFICIÊNCIA DO USO DA ÁGUA EM PLANTAS TRANSGÊNICAS DE *Nicotiana*
tabacum L. COM ATIVIDADE SACAROLÍTICA ALTERADA ESPECIFICAMENTE
EM CÉLULAS GUARDAS**

FORTALEZA
2020

RICARDO LEONI GONÇALVES BASTOS

EFICIÊNCIA DO USO DA ÁGUA EM PLANTAS TRANSGÊNICAS DE *Nicotiana
tabacum* L. COM ATIVIDADE SACAROLÍTICA ALTERADA ESPECIFICAMENTE EM
CÉLULAS GUARDAS

Monografia apresentada ao curso de
Agronomia da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial à obtenção do título de
Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Prof. Dr. Danilo de Menezes
Daloso.

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- B33e Bastos, Ricardo Leoni Gonçalves.
Eficiência do uso da água em plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum* L. com atividade sacarolítica alterada especificamente em células guardas / Ricardo Leoni Gonçalves Bastos. – 2020.
49 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Agronomia, Fortaleza, 2020.
Orientação: Prof. Dr. Danilo de Menezes Daloso.
1. Eficiência do uso da água. 2. Estômatos. 3. Regulação estomática. 4. Sacarose. 5. Células guarda. I. Título.

CDD 630

RICARDO LEONI GONÇALVES BASTOS

EFICIÊNCIA DO USO DA ÁGUA EM PLANTAS TRANSGÊNICAS DE *Nicotiana
tabacum* L. COM ATIVIDADE SACAROLÍTICA ALTERADA ESPECIFICAMENTE EM
CÉLULAS GUARDAS

Monografia apresentada ao Curso de
Agronomia da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial à obtenção do título de
Engenheiro Agrônomo.

Aprovada em: 09/10/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Danilo de Menezes Daloso (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Claudivan Feitosa de Lacerda
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Stelamaris de Oliveira Paula Marinho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

A minha mãe Francisca Maria, por todo o amor,
carinho e educação.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer ao Grande Arquiteto do Universo, por cada degrau alcançado nesta minha jornada, por sempre me proteger e nortear nos desafios enfrentados rumo a realização desse sonho.

A minha mãe, Francisca Maria de Sousa Carvalho, pelo amor incondicional, carinho e afeto, que me apoiou quando eu mais precisei, torceu e celebrou com as minhas vitórias e sempre acreditou em mim, mesmo eu descrendo. Ao meu pai, Elias Gonçalves Bastos Filho, pelo incentivo a nunca desistir e sempre levantar de cabeça erguida.

À Universidade Federal do Ceará, por ter me concedido bolsas de auxílio estudantil, pela oportunidade de conhecer um mundo novo, por conhecer grandes mestres, e por fim por me formar um profissional com consciência dos meus deveres.

Ao órgão de fomento CNPq pelas bolsas de iniciação científica que recebi durante toda a graduação, bem como pelos recursos que destinaram para a realização das pesquisas as quais estive envolvido.

Ao Professor Danilo de Menezes Daloso, pela excelente orientação, amizade, apoio, paciência e ajuda em todas as etapas desse trabalho. Muito do profissional que almejo me tornar se inspirará em sua carreira e seu esforço.

Ao Professor Thales Vinicius de Araújo Viana, pela amizade e confiança, que mesmo sem me conhecer direito acreditou no meu trabalho, me incentivou a liderar e montar experimentos sempre com foco na excelência.

Aos professores Daniel Albiero, Marcelo Guimarães, Márcio Cleber, Alan Bernard, Isabel Cristina pela confiança, conselhos e ensinamentos passados quando estive sobre suas orientações, bem como pela oportunidade de atuar em seus grupos de pesquisa e monitorias.

A minha namorada, Valéria Barbosa Pinto, pelo amor, carinho, compreensão, apoio e companheirismo nessa jornada que foi bem cansativa mais gratificante.

A Nicole Pinheiro Porto da Costa, que além de braço direito no Labplant é uma amiga. Nick, obrigado pelos momentos de descontração, conversas, apoio e carinho.

A minha amiga, Daniela Andreska da Silva, pela amizade e carinho em todos esses anos de convívio, por sempre acreditar no meu potencial e torcer pelo meu sucesso.

Ao meu amigo e pai postiço, Mário Gustavo de Araújo Carvalho, pela parceria, carinho e cuidado comigo e por sempre torcer pelo meu crescimento profissional. Sou eternamente grato por ter me recebido em sua casa e me incentivado a não desistir.

Aos amigos Mayara, Matheus, Isabelle, Arthur, Letícia, Kézia pela amizade, convívio, companheirismo nos trabalhos, apoio, momentos de descontração, troca de conhecimentos e por me aturarem todos esses anos.

Aos meus grandes amigos Petrus, Wallison e Izael pela força, amizade, incentivo e principalmente por nunca terem duvidado do meu potencial.

Ao Francisco Bruno pela paciência, companheirismo e ensinamentos durante e após a realização do experimento.

A todos os colegas do Labplant, que me auxiliaram no progresso das pesquisas, pelo convívio, carinho, experiência profissional e amizade adquiridas.

Aos professores da graduação que no geral contribuíram para minha formação, com ensinamentos, cobranças, auxílio e incentivo. Vocês são minhas referências acadêmicas!

Aos participantes da banca examinadora Claudivan Lacerda Feitosa e Stelamaris de Oliveira Paula Marinho pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

A todos, que de certa forma, contribuíram para o meu desenvolvimento técnico, científico e pessoal, o meu “Muito Obrigado”.

“A eficiência é a essência da sobrevivência”

Adriano Moitinho Pinto.

RESUMO

Os estômatos são pequenas estruturas epidérmicas foliares constituídos de duas células-guarda (CG) que circundam e regulam a abertura e o fechamento do poro estomático. Os movimentos estomáticos regulam o influxo de CO₂ atmosférico para a fotossíntese e o efluxo de água via transpiração, sendo assim importantes para regulação da eficiência do uso da água (EUA) em plantas. Resultados recentes sugerem que a degradação da sacarose é um importante processo durante a abertura estomática. Assim, a manipulação genética do metabolismo da sacarose em CG torna-se uma ferramenta potencial para otimizar a EUA em plantas. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a EUA em plantas de tabaco tipo selvagem (WT) e linhagens transgênicas (L3, L11 e L13) com diminuição da expressão do gene *sacarose sintase 3* de batata (*StSUS3*) sob controle do promotor KST1, que governa a expressão especificamente em CG. Os resultados demonstraram que, em condições irrigadas, as plantas transgênicas apresentaram reduções de até 44% na transpiração da planta inteira quando comparadas às plantas selvagens, além de reduções significativas na condutância estomática (g_s) e aumento da EUA. Adicionalmente, foi observado uma redução do acúmulo de biomassa total nas plantas transgênicas, embora essas plantas tenham apresentado maior alocação de recursos para a parte aérea, culminando em um aumento do índice de colheita em uma das linhagens transgênicas. Tomados em conjunto, os resultados demonstram que a alteração na expressão do gene *StSUS3* modifica substancialmente o padrão de transpiração da planta podendo atuar como uma opção eficaz para aumentar a EUA em plantas.

Palavras-chave: Estômatos. Eficiência do uso da água. Regulação estomática. Sacarose. Células guarda. Gene *StSUS3*.

ABSTRACT

Stomata are small structures in the leaf epidermal, composed of two guard cells (CG) that surround and regulate the opening and closing of the stomatal pore. Stomatal movements regulate the atmospheric CO₂ influx for photosynthesis and the efflux of water via transpiration, being thus important for regulation the water use efficiency (EUA) in plants. Recent results suggest that sucrose degradation is an important process during stomatal opening. Thus, the genetic manipulation of sucrose metabolism in CG is a potential tool to optimize the EUA in plants. In this context, the present work aimed to evaluate the EUA in tobacco plants wild type (WT) and transgenic strains (L3, L11 and L13) with decreased expression of potato *sucrose synthase 3* (*StSUS3*) under the control of the stomatal-specific KST1 promoter. The results showed that under irrigated conditions, transgenic plants showed reductions of up to 44% in the whole plant transpiration when compared to wild plants, in addition to significant reductions in stomatal conductance (g_s) and increased EUA. Furthermore, a reduction in the accumulation of total biomass was observed in transgenic plants, although these plants showed greater allocation of resources to the aerial part, culminating in an increase in the harvest rate in one of the transgenic strains. Taken together, the results demonstrate that the change in the expression of the *StSUS3* gene substantially modifies the transpiration pattern of the plant and can act as an effective option to increase the EUA in plants.

Keywords: Stomata. Water use efficiency. Stomatal regulation. Sucrose. Guard cells. Gene *StSUS3*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação de pequenas estruturas epidérmicas foliares (estômatos)	23
Figura 2 – (A) Germinação de sementes transgênicas em placa de petri em meio MS e adição de 50µM de Kanamycin®. (B) Cultivo de plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> L. tipo selvagem (WT) e linhagens transgênicas (L3, L11 e L13) em casa de vegetação	25
Figura 3 – Expressão genética em folhas e fragmentos epidérmicos de CG de plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> L. tipo selvagem (WT) e linhagens transgênicas (L3, L11 e L13) crescidas em casa de vegetação	28
Figura 4 – Curvas de respostas fotossintéticas à luz (A-PAR) e CO ₂ (A-C _i) de folhas totalmente expandidas em plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> L. tipo selvagem (WT) e linhagens transgênicas (L3, L11 e L13) crescidas em casa de vegetação. (A) A-PAR. (B) A-C _i . A regressão linear foi determinada por meio da equação $A = a(1 - e^{-bx}) + c$	29
Figura 5 – Efeito da alteração do gene <i>SUS3</i> sobre parâmetros de trocas gasosas em condições de 400ppm de CO ₂ e 1000 mol fótons m ⁻² s ⁻¹ de plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> L. tipo selvagem (WT) e linhagens transgênicas (L3, L11 e L13) crescidas em casa de vegetação. (A-F) Taxa fotossintética líquida (A), taxa de transpiração (E), condutância estomática (g _s), eficiência do uso da água intrínseca ou (A/g _s), respiração no escuro (R _d), eficiência de carboxilação (A/C _i)	30
Figura 6 – Condições climáticas da casa de vegetação ao longo dos dias de análise	31
Figura 7 – Efeito da alteração do gene <i>SUS3</i> sobre transpiração da planta inteira de plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> L. tipo selvagem (WT) e linhagens transgênicas (L3, L11 e L13) crescidas em casa de vegetação. (A) Transpiração da planta inteira (TPI). (B) % de TPI em relação a WT. (C) TPI acumulada em 11 dias. (D) TPI por área foliar. (E) % de TPI por área foliar em relação a WT. (F) TPI por área foliar acumulada em 11 dias.....	31

Figura 8 – Efeito da alteração do gene <i>SUS3</i> sobre o curso diário da transpiração da planta inteira de plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> L. tipo selvagem (WT) e linhagens transgênicas (L3, L11 e L13) em diferentes intervalos de tempo crescidas em casa de vegetação. (A) Transpiração total da planta como perda de água. (B) % de transpiração total da planta como perda de água em relação a WT	33
Figura 9 – (A) densidade estomática e (B) perda de massa fresca em folhas destacadas de plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> L. tipo selvagem (WT) e linhagens transgênicas (L3, L11 e L13) crescidas em casa de vegetação	34
Figura 10 – Efeito da alteração do gene <i>SUS3</i> sobre a área foliar total de plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> L. tipo selvagem (WT) e linhagens transgênicas (L3, L11 e L13) crescidas em casa de vegetação. (A) Área foliar total. (B) % de área foliar em relação a WT	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito da alteração do gene *SUS3* sobre parâmetros de crescimento em plantas de *Nicotiana tabacum* L. tipo selvagem (WT) e linhagens transgênicas (L3, L11 e L13) crescidas em casa de vegetação

..... 34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CG	Células guarda
DBBM	Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
DNA	Deoxyribonucleic acid
EUA	Eficiência do uso da água
EP	Erro padrão
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FUNCEME	Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos
GEE	Gases de efeito estufa
INV	Invertase
IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change
LabPlant	Laboratório de Metabolismo de Plantas
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OGM	Organismos geneticamente modificados
PCR	Polymerase chain reaction
PNUMA	Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente
ppm	Partes por milhão
SUS	Sacarose sintase
UNCCD	United Nations Convention to Combat Desertification
UNESCO	United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization
UFC	Universidade Federal do Ceará
WMO	World Meteorological Organization
WWAP	World Water Assessment Programme
WWC	World Water Council

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
μ	Micro (um milionésimo)
±	Mais ou menos
°	Grau
<	Menor que
®	Marca Registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Mudanças climáticas	17
2.1.1 Mudanças climáticas no Brasil e no Nordeste	18
2.2 Estresse hídrico na agricultura	19
2.3 Eficiência do uso da água (EUA)	20
2.4 Transformação genética e sua contribuição para agricultura	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Localização do experimento	24
3.2 Material vegetal e condições de crescimento	24
3.3 Determinação dos parâmetros biométricos	25
3.4 Transpiração da planta inteira	26
3.5 Análise de trocas gasosas	26
3.6 Densidade estomática e perda de peso fresco em folhas destacadas	27
3.7 Eficiência do uso da água (EUA)	27
3.8 Análise estatística	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5 CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

O efeito estufa é um fenômeno natural e essencial para a existência da vida na terra, entretanto, o seu aumento sem controle tem gerado cenários futuros preocupantes (GRANDIS; GODOI; BUCKERIDGE, 2010; SOLOMON *et al.*, 2007). Dados do Painel Intergovernamental sobre Mudanças climáticas (IPCC) mostram que, com o aumento contínuo das emissões de gases causadores do efeito estufa, é possível observar e prever uma expressiva elevação da temperatura média global (IPCC, 2014). Tais efeitos relacionados às mudanças climáticas já apresentam impactos deletérios em sistemas físicos e biológicos, causando inúmeras consequências na produção agrícola mundial (CHIEW *et al.*, 2009; IPCC, 2007; 2015). Além do aquecimento, as mudanças no clima também se relacionam à distribuição da precipitação, que tende a ser mais escassa em regiões nas quais já apresentam baixa oferta hídrica (SOUSA, 2015). Estima-se que até 70% de toda água doce disponível, sendo própria para consumo humano, é destinada para a agricultura e 22% para indústria (JOHN; MARCONDES, 2010). Além disso, é previsto um aumento de 17% no consumo de água para a agricultura até 2025 (PENNISI, 2008). Diante do exposto, o uso excessivo de água doce associada à baixa disponibilidade hídrica encontrada em grande parte dos ecossistemas gera preocupação sobre o uso sustentável desse recurso. Como forma de contornar esse problema, atualmente a gestão da água nos cultivos agrícolas objetiva alcançar altas produtividades associadas ao aumento da eficiência do uso da água (EUA) pela planta (AZEVEDO *et al.*, 2016; GOMES *et al.*, 2012; MANIVANNAN *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2012). EUA refere-se à razão entre a produção de biomassa acumulada pela quantidade de água aplicada ou evapotranspirada por uma cultura (DUARTE *et al.*, 2012; MACHADO *et al.*, 2010). Infelizmente, o manejo inadequado de água em ambientes com baixa disponibilidade hídrica é uma realidade encontrada em diversas localidades, como nas regiões semiáridas do Nordeste brasileiro. No caso destas regiões tropicais semiáridas, a escassez hídrica associada a altas taxas evapotranspiratórias resulta no aumento da demanda de água pelas plantas. Nesse contexto, a obtenção de variedades agrícolas com menor demanda de água e mais tolerantes ao déficit hídrico se apresenta como uma importante estratégia para propiciar e/ou otimizar a produção nestes locais.

O entendimento dos mecanismos que regulam a EUA envolve, obrigatoriamente, os movimentos estomáticos, uma vez que a entrada de CO₂ para a fotossíntese e a saída de água via transpiração ocorre através dos estômatos (PEREIRA-NETO *et al.*, 2002). Estômatos

são estruturas presentes na epiderme das folhas, constituídos de duas células-guarda (CG) que envolvem um poro, cuja abertura é ativamente regulada através de mudanças no acúmulo de diferentes osmólitos nessas células (DALOSO; DOS ANJOS; FERNIE, 2016). As CG são altamente especializadas, integrando sinais endógenos e ambientais de forma a regular a abertura e fechamento estomático (LAWSON *et al.*, 2014; MATTHEWS; VIALET-CHABRAND; LAWSON, 2017). Além disso, os movimentos estomáticos estão ligados à atividade fotossintética das células do mesófilo, no qual o transporte de sacarose para as CG parece ser fundamental para a regulação desses movimentos (LIMA *et al.*, 2018). A regulação da abertura estomática é um dos mecanismos de aclimação da planta ao estresse, sobretudo em condições de restrições hídricas, em que o fechamento estomático é uma resposta primordial para minimizar a perda excessiva de água (GALMÉS; MEDRANO; FLEXAS, 2007), sendo, assim, um dos reguladores chave da EUA (BRODRIBB; SUSSMILCH; MCADAM, 2020).

Vários estudos relatam a importância do metabolismo de carboidratos para regulação do movimento estomático (revisado recentemente em DALOSO; DOS ANJOS; FERNIE, 2016; GRANOT; KELLY, 2019; LIMA *et al.*, 2018). Inicialmente, a sacarose foi proposta de atuar como um osmólito dentro das CG, em que o seu acúmulo seria um mecanismo que manteria a abertura estomática em períodos do dia em que a concentração de K^+ é baixa (AMODEO; TALBOTT; ZEIGER, 1996). No entanto, resultados mais recentes questionam essa proposta e sugerem que a degradação de sacarose no interior das CG seja um importante mecanismo durante a abertura estomática, indicando que a sacarose teria um papel prioritariamente energético (ANTUNES *et al.*, 2012, 2017; DALOSO; DOS ANJOS; FERNIE, 2016; DALOSO *et al.*, 2015, 2016, 2017; FLÜTSCH *et al.*, 2020; KELLY *et al.*, 2013; LUGASSI *et al.*, 2015). De acordo com esta ideia, plantas transgênicas superexpressando invertase (*INV*), sacarose sintase (*SUS*) ou hexoquinase especificamente nas CG apresentam alterações na condutância estomática (g_s) e/ou EUA (ANTUNES *et al.*, 2012; DALOSO *et al.*, 2016; KELLY *et al.*, 2013; LUGASSI *et al.*, 2015; NI, 2012). Assim, o metabolismo da sacarose parece ser um importante alvo para manipulação genética com intuito de alterar os movimentos estomáticos e, por consequência, a EUA e/ou tolerância à seca.

A sacarose é essencial para o ciclo de vida vegetal e é produzida principalmente pela fotossíntese nas folhas (WANG *et al.*, 2015), sendo na maioria das espécies, o principal metabólito translocado em toda a planta (DALOSO *et al.*, 2016). A quebra da sacarose pode ocorrer no citosol pela operação de duas enzimas, a invertase (*INV*) e pela sacarose sintase (*SUS*) (TANG; LÜSCHER; STURM, 1999) que é considerada uma enzima-chave no

metabolismo da sacarose, pois converte sacarose e UDP em frutose e UDP-glicose (BAROJA FERNANDEZ *et al.*, 2009). Estudos anteriores demonstraram que as isoformas da *SUS* são codificadas por uma pequena família multigênica e que o número difere entre as espécies vegetais (WANG *et al.*, 2009; 2015). Por exemplo, em *Arabidopsis*, arroz e seringueira seis isoformas da *SUS* foram documentadas (BAUD; VAULTIER; ROCHAT, 2004; HIROSE; SCOFIELD; TERAO, 2008; XIAO *et al.*, 2014), enquanto que sete genes foram identificados em algodão (CHEN *et al.*, 2012) e tabaco (WANG *et al.*, 2015). Em batata, têm-se três isoformas da *SUS* (*SUS1*, *SUS2* e *SUS3*) que são codificadas por diferentes genes e possivelmente reguladas distintamente (ANTUNES, 2005). Algumas das isoformas têm sua expressão aumentadas em condições de estresse, como por exemplo em condições de seca, em que folhas de batata, apenas a isoforma 3 da *SUS* teve sua expressão aumentada em até 70% (LOUREIRO, 1999; MEYER, 2003). Em *Arabidopsis*, a *SUS3* é altamente expressa em células guarda (BIENIAWSKA *et al.*, 2007) quando comparada com as folhas (BATES *et al.*, 2012), enquanto que na batata a expressão da *SUS3* é regulada em fragmentos epidérmicos enriquecidos por células guarda em condições de seca (KOPKA *et al.*, 1997). Dessa forma, a *SUS* foi utilizada como alvo de mutações no metabolismo da sacarose por ser mais energeticamente favorável a célula na geração de ATP que a enzima invertase, e a isoforma 3 da *SUS* foi escolhida por ser mais abundante em células guarda de batata e *arabidopsis*, como também por ser mais expressa e ativa em folhas expandidas e em células guarda (MEYER; LOUREIRO, 2003).

Diante do supra exposto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar plantas transgênicas de tabaco com decréscimo na expressão da isoforma *StSUS3* de batata sob controle do promotor KST1, que governa a expressão especificamente em CG (KOPKA *et al.*, 1997; PLESCH; EHRHARDT; MUELLER-ROEBER, 2001). Visto que plantas transgênicas com maior capacidade para degradar sacarose nas CG exibiram maiores taxas de g_s (ANTUNES *et al.*, 2012; DALOSO *et al.*, 2016; NI, 2012), nós hipotetizamos que o silenciamento do gene *StSUS3* especificamente em CG resulta em reduções nas taxas de g_s e, possivelmente, maior EUA.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mudanças climáticas

O efeito estufa é um fenômeno natural e essencial para a existência da vida na Terra, pois os gases de efeito estufa (GEE i.e. vapor de água, dióxido de carbono, óxido nitroso, metano, ozônio etc.) estão presentes em baixas concentrações na atmosfera e são responsáveis pela manutenção da temperatura média global entre 16-18°C (IPCC, 2014; WMO, 2014). Entretanto, as mudanças climáticas causadas pela intensificação antrópica da emissão dos GEE, têm gerado cenários futuros preocupantes (GRANDIS; GODOI; BUCKERIDGE, 2010; SOLOMON *et al.*, 2007). Dados do Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas mostram níveis elevados de aquecimento no planeta devido ao aumento contínuo das emissões de GEE (IPCC, 2014). Durante o último século, foi registrado um aumento de cerca de 0.74°C na temperatura média global (NEVES, 2013) e segundo as projeções do quarto relatório de avaliação das mudanças do clima do planeta (IPCC-AR4), a relação da concentração de CO₂ na atmosfera aumentou globalmente cerca de 36% ao longo dos últimos 250 anos. No cenário mais otimista, é previsto que esta concentração poderá atingir entre 730 e 1020 ppm até o final do século XXI acarretando uma elevação de até 1.8°C (faixa provável de 1.1°C a 2.9°C) na temperatura global (IPCC, 2007). Além do aquecimento, as mudanças climáticas previstas não se restringem apenas ao aumento da temperatura e da concentração do CO₂ atmosférico, mas também a uma redução na oferta hídrica (IPCC, 2014; MARENGO; TORRES; ALVES, 2017). Dessa forma, mudanças nos padrões de precipitação e temperatura ameaçam a produção agrícola e aumentam a vulnerabilidade das pessoas que dependem da agricultura, podendo se tornar mais grave em regiões onde a agricultura de sequeiro (LIPPER *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, os efeitos das mudanças climáticas sobre a produção vegetal, os ecossistemas e a saúde humana se tornaram uma preocupação mundial. As mudanças climáticas afetam todos os sistemas globais podendo ocasionar, por exemplo, intensificação das chuvas e secas, aceleração do derretimento de geleiras, aumento dos níveis dos oceanos e alteração da circulação oceânica causando graves prejuízos na produção agrícola e maior proliferação de pragas e doenças (ADAMS *et al.*, 2003; CHIEW *et al.*, 2009; IPCC, 2007; 2015). Não obstante, estudos mostram que 40% das terras do nosso planeta são consideradas áridas e secas, e que este percentual pode se expandir ao longo das próximas décadas

(UNCCD, 2011; 2016). A preocupação aumenta quando evidências apontam a existência de poucas terras agrícolas disponíveis no mundo (FAO, 2013) e que é projetado um aumento de até 50% na demanda de água (incluindo todos os seus usos) (DAMANIA *et al.*, 2017) e de 70% de alimentos até 2050 (OCDE; FAO, 2010; WWC, 2015). Além disso, as mudanças climáticas podem afetar expressivamente o planeta, com maior rigor nos países menos desenvolvidos situados na região tropical, especialmente, em relação aos extremos climáticos (VALVERDE; MARENGO, 2014). Nesse contexto, Reboita *et al.* (2014) destacam que o Brasil pode se tornar vulnerável às mudanças climáticas atuais e, mais ainda, às que se projetam para o futuro.

2.1.1 Mudanças climáticas no Brasil e no Nordeste

As mudanças climáticas estão alterando as médias anuais de precipitação de muitos países, influenciando diretamente os sistemas hidrológicos e ampliando os eventos de seca e inundações (IPCC, 2014; MARENGO; TORRES; ALVES, 2017). No Brasil, as médias anuais de precipitação estão se alterando de forma extrema, principalmente em uma grande extensão de zonas semiáridas, onde a seca já é habitual (FUNCEME, 2017; BRASIL/MIN/SUDENE, 2018). As regiões semiáridas se configuram como as mais vulneráveis do país às mudanças e à variabilidade do clima, principalmente aquelas associadas às secas e enchentes, pois estes eventos geram diversos impactos negativos sobre a população e suas atividades econômicas (BILAR *et al.*, 2015). Segundo Marengo (2007), o impacto das mudanças climáticas sobre os recursos hídricos no Brasil deverá ser mais intenso no Nordeste, onde a escassez de água já é um grande problema. Com base no quinto relatório de avaliação das mudanças climáticas do planeta (IPCC-AR5), divulgado pelo IPCC em 2014, o painel brasileiro de mudanças climáticas (PBMC) elaborou o primeiro relatório de avaliação nacional, no qual relata que as projeções para as regiões onde predomina o bioma da Caatinga, são de aumento gradual da temperatura entre 1.5° a 2.5°C e diminuição entre 25 e 35% nos padrões de chuva no período de 2041-2070 (PBMC, 2014). Dessa forma, as mudanças climáticas em curso podem afetar o regime de chuvas e agravar a tendência de desertificação e inviabilização da produção agrícola nessas regiões. Além disso, a variabilidade climática e os eventos extremos exacerbam a insegurança alimentar mundial, mas principalmente em áreas que já são vulneráveis à fome e à desnutrição (WHEELER; BRAUN, 2013).

A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), e a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), relatam que até 2050 será necessário um aumento de 70% na produção de alimentos (OCDE; FAO, 2010; WWC, 2015). Segundo essas instituições, o Brasil é o país com o maior potencial de contribuição no preenchimento dessa demanda adicional de alimentos (OECD; FAO, 2010). Além do aumento na demanda de alimentos, foi projetado um possível aumento de até 50% na demanda de água, principalmente para a agricultura (DAMANIA *et al.*, 2017). Dessa forma, os atuais sistemas produtivos terão que aumentar sua eficiência para garantir o crescimento da produção e se adaptar às alterações climáticas, juntamente com a preservação dos ecossistemas.

2.2 Estresse hídrico na agricultura

A água é o bem mais precioso que a humanidade dispõe, sendo essencial para a manutenção da vida, pois constitui a matriz onde ocorre a maioria dos processos bioquímicos essenciais e é a base para o crescimento celular vegetal (LEHNINGER, 2006; REBOUÇAS, 2003). Entre os diversos fatores que determinam a produtividade agrícola, a água é o fator mais limitante, pois nota-se que em uma escala global a produtividade das culturas em ecossistemas naturais é muito mais influenciada por esse fator do que pela soma de todos os demais fatores bióticos e abióticos (MATOS *et al.*, 2019). Além disso, a sua disponibilidade é determinante na distribuição das espécies nas diferentes zonas climáticas do globo (MORANDO *et al.*, 2014). Por exemplo, em regiões com água em abundância, como nas florestas tropicais úmidas, existe grande diversidade biológica, e em áreas de escassez, como os desertos, tem-se a menor proliferação de vida (PIMENTEL, 2004).

As perspectivas para os próximos anos, no que se refere à água e alimentos, não são favoráveis e nem tão pouco otimistas. Segundo dados da United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (UNESCO), a demanda de água para produção de alimentos deve crescer 50% até 2030 e 70% até 2050 (UNESCO, 2016; 2019). Este cenário é decorrente do crescimento populacional e econômico que tende a provocar um aumento no consumo de água em todos os cenários (PNUMA, 2004). Entretanto, apesar de dados mostrarem um aumento na demanda de água para todos os setores, incluindo a agricultura, dados de mudanças climáticas mostram uma redução na oferta hídrica com o passar dos anos (IPCC, 2014; MARENGO; TORRES; ALVES, 2017), devido principalmente ao aumento dos

períodos de seca em inúmeras regiões do planeta (MATOS *et al.*, 2014), sobretudo nas zonas áridas e semiáridas. Dessa forma, o semiárido brasileiro poderá se tornar uma das regiões mais afetadas pelas mudanças climáticas devido à redução da disponibilidade de recursos hídricos (IPCC, 2007).

Dentre os estresses abióticos que acometem as plantas, o estresse hídrico causado pela seca é o mais importante, pois é responsável por limitar o crescimento e a produtividade (ASGHER *et al.*, 2017; HUSSAIN *et al.*, 2018; MENG *et al.*, 2016), provocando perdas na produção de alimentos e conferindo uma das mais importantes limitações para a expansão das áreas agrícolas em todo o mundo (BOYER, 1982; CHAVES; OLIVEIRA, 2004). Atualmente, o déficit hídrico afeta cerca de 25% das terras agrícolas em todo o mundo (ABIDO; ZSOMBIK, 2018), e segundo dados do World Water Assessment Programme (WWAP) o planeta pode enfrentar um déficit hídrico de 40% até 2030, caso não haja uma melhora drástica na gestão hídrica (WWAP, 2015).

O déficit hídrico pode ser definido como deficiência de água, observado a partir de uma redução da disponibilidade de água no solo e através de respostas morfológicas, fisiológicas e bioquímicas das plantas (IHUOMA; MADRAMOOTOO, 2017). Esta condição compromete praticamente todos os aspectos relacionados ao crescimento e desenvolvimento das plantas. Segundo TEJEDA (2019), o déficit hídrico altera muitos processos fisiológicos, como transpiração, fotossíntese, crescimento de folhas e raízes e desenvolvimento do sistema reprodutivo. Também pode ocasionar decréscimo da área foliar, fechamento dos estômatos, aceleração da senescência e abscisão foliar (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Nos últimos anos, a ocorrência frequente de eventos de seca somados a um aumento da conscientização a respeito do uso da água, tem aumentado a pressão sobre o uso sustentável desse recurso. Entretanto, em algumas regiões do mundo, como as regiões semiáridas, o manejo da irrigação se tornou pouco viável, sendo necessário o uso dos recursos hídricos disponíveis de forma racional, por exemplo com a maximização da eficiência do uso da água (EUA).

2.3 Eficiência do uso da água (EUA)

A eficiência do uso da água (EUA) pode ser definida como a relação entre a produção de biomassa pela quantidade de água aplicada ou evapotranspirada por uma cultura (DUARTE *et al.*, 2012; MACHADO *et al.*, 2010; STONE, 2005). Fisiologicamente, tal termo

é definido como a razão entre o ganho de carbono assimilado pela quantidade de água transpirada. Assim, culturas mais eficientes no uso da água produzem mais matéria seca por grama de água transpirada (BAPTISTA *et al.*, 2001; PROCÓPIO *et al.*, 2004). O uso mais eficiente da água está diretamente associado à abertura estomática, pois, enquanto a planta absorve CO₂ para a fotossíntese, a água é perdida para o ambiente por evapotranspiração, seguindo uma corrente de potenciais hídricos (PEREIRA-NETTO *et al.*, 2002). Portanto, o controle estomático é uma propriedade fisiológica importante, por meio da qual as plantas limitam a perda de água, reduzindo a condutância estomática e as trocas gasosas como forma de resposta a fatores ambientais e endógenos (PAIVA *et al.*, 2005). Segundo Taiz e Zeiger (2013), a deficiência hídrica reduz o potencial hídrico das plantas, diminuindo a condutância e a transpiração foliar, o que resulta em um aumento da temperatura foliar e redução na produção de fotoassimilados, causando diminuição no crescimento e na produtividade da cultura (LOCATELLI *et al.*, 2016). Assim, a necessidade de otimização do uso da água se faz presente nos sistemas produtivos, seja pela adoção de culturas menos exigentes do ponto de vista hídrico, pelo manejo da água e/ou por aumento da tolerância e eficiência do uso da água (MORISON *et al.*, 2008). A EUA está normalmente associada a mecanismos de tolerância das plantas à seca, além de poder ser utilizada como parâmetro na seleção de variedades mais tolerantes (IGBADUN *et al.*, 2006; KO; PICCINNI, 2009; MORANDO *et al.*, 2014). Dessarte, diante do cenário de escassez de água potável e déficit hídrico na agricultura, o melhoramento através das transformações genéticas ocupa um papel importante na busca de soluções para atenuar os problemas, atuais e futuros.

O melhoramento genético, seja ele convencional ou o realizado por meio da engenharia genética, tem resultado em enormes ganhos de produtividade e aumento de tolerância a estresses bióticos e abióticos (SOUZA NETO, 2017). De acordo com TESTER e LANGRIDE (2010), a engenharia genética tem atribuído às culturas características que vão além da barreira natural do melhoramento convencional, por meio da introdução de genes alvos, propiciando a obtenção de organismos geneticamente modificados (OGM) que são menos exigentes e mais tolerantes a condições ambientais adversas. Assim, para aperfeiçoar a eficiência do uso da água na agricultura, as transformações genéticas podem atuar no desenvolvimento de espécies tolerantes a seca.

2.4 Transformação genética e sua contribuição para agricultura

O déficit hídrico é reconhecido como o estresse ambiental que mais afeta a produção agrícola a nível mundial. Além disso, modelos matemáticos preveem que os eventos de seca se tornarão mais frequentes e severos devido às mudanças climáticas (ROSENZWEIG *et al.*, 2014; SCHWALM *et al.*, 2017; WALTER *et al.*, 2011). Diante disso, o desenvolvimento de variedades de plantas com menor demanda de água e/ou no desenvolvimento de variedades com maior tolerância à seca (ALEXANDRATOS; BRUINSMA, 2012; LONG *et al.*, 2016) são estratégias promissoras contra a deficiência hídrica e levanta a importância do conhecimento detalhado sobre os mecanismos que regulam os processos transpiratórios, como o controle dos movimentos estomáticos (LAWSON; BLATT, 2014). Nesse sentido, o controle dos movimentos estomáticos se destaca como um dos principais alvos biotecnológicos para a otimização da EUA em plantas (DALOSO *et al.*, 2017; FLEXAS *et al.*, 2014; FLEXAS, 2016; GAGO *et al.*, 2014; LAWSON; BLATT, 2014; NUNES-NESI *et al.*, 2016).

A regulação dos movimentos estomáticos é um dos mecanismos de aclimação da planta ao estresse, sobretudo em condições de restrições hídricas, em que o fechamento estomático é uma resposta primordial para minimizar a perda excessiva de água (GALMÉS; MEDRANO; FLEXAS, 2007). Como EUA está diretamente associada ao processo de abertura e fechamento estomático, é possível supor que os estômatos atuem como reguladores desse processo (BRODRIBB; SUSSMILCH; MCADAM, 2020). Estudos recentes sugerem que a manipulação genética do metabolismo de células-guardas pode ser potencialmente usada para aumentar a tolerância à seca (GAGO *et al.*, 2014; LAWSON; BLATT, 2014; MEDEIROS *et al.*, 2015).

Os estômatos são estruturas epidérmicas foliares constituídas de um poro circundado por duas células-guarda (CG), cuja abertura é ativamente regulada através de mudanças no acúmulo de diferentes osmólitos nessas células (Figura 1). As CG são altamente especializadas, integrando sinais endógenos e ambientais para regular a abertura estomática (LAWSON *et al.*, 2014; MATTHEWS; VIALET-CHABRAND; LAWSON, 2017). Os movimentos estomáticos estão ligados à atividade fotossintética do mesófilo, no qual o transporte de sacarose para as CG parece ser fundamental para a regulação desses movimentos.

A sacarose foi inicialmente proposta em atuar como um osmólito dentro das CG, no qual o seu acúmulo seria um mecanismo para manter a abertura estomática em períodos do dia em que a concentração de K^+ é baixa (AMODEO; TALBOTT; ZEIGER, 1996). Entretanto, resultados recentes questionam essa teoria e sugerem que a degradação de

sacarose em CG seja um mecanismo importante durante a abertura estomática, indicando que esse açúcar teria um papel prioritariamente energético para a regulação das CG (ANTUNES *et al.*, 2017; DALOSO *et al.*, 2015, 2016, 2017; FLÜTSCH *et al.*, 2020; KELLY *et al.*, 2019). Assim, de acordo com esta ideia, plantas transgênicas superexpressando invertase (*INV*), sacarose sintase (*SUS*) ou hexoquinase especificamente nas CG apresentam alterações na condutância estomática (g_s) e/ou EUA (ANTUNES *et al.*, 2012; DALOSO *et al.*, 2016; KELLY *et al.*, 2013; LUGASSI *et al.*, 2015; NI, 2012).

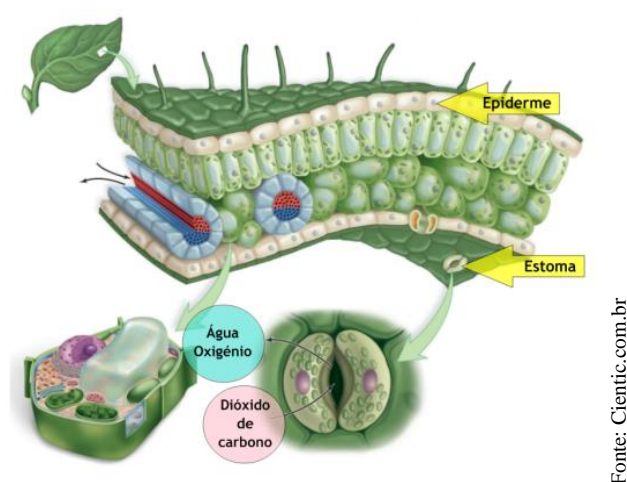


Figura 1. Representação de pequenas estruturas epidérmicas foliares (estômatos).

A Engenharia genética através da manipulação do transporte e/ou atividade de enzimas relacionadas com o metabolismo da sacarose em CG, por exemplo, tem auxiliado na obtenção de plantas com maior crescimento e/ou maior eficiência do uso da água (ANTUNES *et al.*, 2012, 2017; ARAÚJO *et al.*, 2011; DALOSO *et al.*, 2016; KELLY *et al.*, 2013; LUGASSI *et al.*, 2015; MEDEIROS *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2014). Dentre os genótipos já caracterizados, destacam-se linhagens transgênicas de batata com o aumento na expressão dos genes que codificam as enzimas sacarose sintase (*SUS*) e invertase (*INV*) (ANTUNES *et al.*, 2012; DALOSO *et al.*, 2016), e com a diminuição da expressão do transportador de sacarose (*SUT1*) (ANTUNES *et al.*, 2017). Importante ressaltar que essas linhagens transgênicas foram transformadas sob controle do promotor *KST1*, que governa a expressão especificamente em CG (KOPKA *et al.*, 1997; PLESCH; EHRHARDT; MUELLER-ROEBER, 2001) e, que tem como objetivo evitar quaisquer efeitos pleiotrópicos causados por distúrbios no metabolismo da sacarose ao longo do corpo da planta (KELLY *et al.*, 2017). Dessa forma, a manipulação do metabolismo da sacarose parece ser um importante alvo na obtenção de plantas que apresentem maior EUA e/ou tolerância ao déficit hídrico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação pertencente ao Laboratório de Metabolismo de Plantas (LabPlant) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) da Universidade Federal do Ceará (UFC), localizado no município de Fortaleza, Ceará, Brasil. A instalação faz parte da Unidade Operativa de Risco Biológico da UFC, autorizadas pela Comissão Interna de Biossegurança para trabalhar em regime de contenção com organismos geneticamente modificados (OGMs) de risco classe I.

3.2 Material vegetal e condições de crescimento

Foram utilizadas plantas de *Nicotiana tabacum* L. cv. Havana 425 do tipo selvagem (WT) e transgênicas anti-senso para o gene da *sacarose sintase 3 (SUS3)* de batata (STU24088) sob controle do promotor KST1 (X79779) que governa a expressão quase que exclusivamente em CG (KELLY *et al.*, 2017). A transformação foi realizada por clonagem do gene *SUS3* da batata (*StSUS3*) (STU24088) no vetor pBinK conforme descrito em Freire (2020). A construção gênica foi inserida em *Agrobacterium tumefaciens* (extirpe GV 3101) por eletroporação e utilizada para transformar as plantas de tabaco pela técnica de co-cultivo de discos foliares. A transformação foi confirmada via PCR do gene marcador *NPTII* que confere resistência à canamicina.

As sementes transgênicas das linhagens L3, L11 e L13 da geração T3 foram obtidas e germinadas *in vitro*. Todas as sementes foram descontaminadas por agitação em etanol a 70% por 1 min e lavadas com água destilada estéril. Em seguida, tratadas com hipoclorito de sódio a 0.2% por 5 min e lavadas duas vezes com água destilada estéril. Após a esterilização, as sementes foram então germinadas em placas de Petri contendo o meio Murashige e Skoog (MS) (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com adição de 50µM de Kanamycin® para as linhagens transgênicas (Figura 2A). As sementes foram cultivadas *in vitro* por 30 dias em condições de câmara de crescimento (16 h de fotoperíodo, 100 µmol de fótons m⁻² s⁻¹, 25 ± 1 ° C e umidade relativa de 53 ± 5%).

As mudas selvagens e transgênicas com resistência à canamicina, foram transferidas para vasos de 0,1 litros com substrato composto por uma mistura de vermiculita,

areia e solo vegetal (1:1:1) e mantidas bem irrigadas por 15 dias em casa de vegetação com fotoperíodo natural de 12 horas de luz (máximo de $500 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $30 \pm 4 \text{ }^\circ \text{C}$ e umidade relativa de $62 \pm 10\%$). Em seguida, as plantas foram transferidas para vasos de 5 litros contendo o mesmo substrato mencionado anteriormente. Todas as plantas foram irrigadas com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) três vezes por semana e cultivados por 60 dias (Figura 2B).



Figura 2. (A) Germinação de sementes transgênicas em placa de petri em meio MS e adição de $50\mu\text{M}$ de Kanamycin®. (B) Cultivo de plantas de *Nicotiana tabacum* L. tipo selvagem (WT) e linhagens transgênicas (L3, L11 e L13) em casa de vegetação.

3.3 Determinação dos parâmetros biométricos

A área foliar (AF) foi estimada através de um modelo descrito por Antunes *et al.* (2008). Este modelo foi adaptado ao tabaco através da equação: $AF = 0.70014 * W * L$. Apenas as folhas com comprimento superior a 5 cm, de todos os genótipos, foram medidas. O modelo adaptado para estimar a AF do tabaco leva em consideração o comprimento (L) e a largura máxima (W) das folhas, obtidas pela medição da ponta da folha até o ponto de interseção do pecíolo ao longo da nervura central, e pela medição no ponto mais largo perpendicular à nervura central, respectivamente. As medidas de AF foram registradas em três momentos durante o experimento, enquanto os dias entre as medições foram estimados por regressão linear ($r^2 > 0.98$). A AF (cm^2) foi utilizada para calcular a área foliar específica ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ folha seca), bem como para estimar a transpiração da planta inteira por área foliar ($\text{g H}_2\text{O d}^{-1} \text{m}^{-2}$). No final do experimento, determinou-se o número total de folhas (> 5 cm de comprimento), comprimento do caule e o peso seco (MS) de folhas, caules e raízes, secando-os a $80 \text{ }^\circ \text{C}$ por sete dias. Esses parâmetros foram usados para determinar biomassa seca total (folha + caule + raízes), índice de colheita (MS folha / biomassa total), MS parte aérea (MS folha + MS caule), MS parte aérea / MS raiz, MS folhas / MS raiz e área foliar / MS raízes

($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$). A taxa de crescimento relativo (TCR, $\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$) foi obtida pela equação: $\text{TCR} = \ln(\text{peso final}) - \ln(\text{peso inicial}) / \text{dia final} - \text{dia inicial}$.

3.4 Transpiração da planta inteira (TPI)

A transpiração da planta inteira foi determinada usando a metodologia gravimétrica (CAVATTE *et al.*, 2012; DALOSO *et al.*, 2016). Para o experimento, vasos contendo apenas substrato foram utilizados para estimar a evaporação direta do solo. Todos os vasos foram irrigados com água no início da noite anterior ao experimento, sendo que em alguns dias (3, 6 e 11) a irrigação não foi realizada. Os vasos foram pesados antes do amanhecer (06:00 h) e no final do dia (17:00h). A transpiração diária da planta ($\text{g H}_2\text{O d}^{-1} \text{planta}^{-1}$) foi obtida pela diferença entre os dois pesos (no amanhecer e no final do dia) subtraindo a evaporação dos vasos sem planta. A transpiração foi registrada entre diferentes intervalos de tempo de um curso diário, bem como diariamente por onze dias.

3.5 Análise de trocas gasosas

As análises dos parâmetros fotossintéticos foram realizadas sob condições normais (400 ppm de CO_2 e $1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), conforme metodologia descrita por Daloso *et al.* (2016). A caracterização das trocas gasosas foi realizada em folhas completamente expandidas de plantas WT e linhagens transg\u00eanicas com 45 dias de idade utilizando um analisador de gases infravermelho (IRGA, Li-Cor - Li6400 XT, Lincoln, NE, EUA). Os par\u00e2metros de taxa fotossint\u00e9tica l\u00edquida (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), condut\u00e2ncia estom\u00e1tica (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$), concentra\u00e7\u00e3o interna de CO_2 (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$), taxa de transpira\u00e7\u00e3o (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e respira\u00e7\u00e3o no escuro (R_d , $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foram realizados em todos os gen\u00f3tipos. As curvas de respostas fotossint\u00e9ticas \u00e0 luz (A -PAR) e CO_2 (A - C_i) tamb\u00e9m foram realizadas em folhas completamente expandidas de todos os gen\u00f3tipos. As curvas A -PAR foram medidas usando 400 ppm de CO_2 , temperatura a 28°C e variando a intensidade de luz em ordem: 2000, 1500, 1000, 800, 600, 400, 200, 100, 50 e $0 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, usando 10% de luz azul. As curvas A - C_i foram feitas a 28°C , $1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e variando a concentra\u00e7\u00e3o de CO_2 em ordem: 400, 300, 200, 100, 50, 400, 500, 700, 1000, 1200 e 400 ppm de CO_2 . Um aumento exponencial de tr\u00eas componentes para a equa\u00e7\u00e3o m\u00e1xima foi usado para ajustar as curvas fotossint\u00e9ticas: $A = a(1 - e^{-bx}) + c$, onde A = taxa

fotossintética, $x = \text{PAR}$, e a , b , c são parâmetros estimados por regressão linear (WATLING; PRESS; QUICK, 2000).

3.6 Densidade estomática e perda de peso fresco em folhas destacadas

A densidade estomática (número de estômatos por mm^2) foi determinada a partir de imagens da região mediana da folha, nas superfícies adaxial e abaxial, conforme Daloso *et al.* (2016). A perda de peso fresco em folhas destacadas foi realizada destacando-se as folhas e pesando-as a cada 10 minutos durante 2 horas em balança de precisão. Ao final das duas horas foi obtida a perda de água (em %) para cada genótipo. Ambos os parâmetros foram determinados em plantas com 45 dias de idade.

3.7 Eficiência do uso da água (EUA)

A EUA intrínseca ($i\text{EUA}$, A/g_s , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) e EUA instantânea (EUA_i , A/E , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) foram calculadas utilizando dados coletados para curvas de luz com valores de estado estacionário constante para A , g_s e E a $1000 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e 400 ppm de CO_2 . Os dados de MS folhas e biomassa total no primeiro dia de transpiração diária da planta foram utilizados para estimar EUA ao longo do tempo ($s\text{EUA}$ - razão entre a quantidade de biomassa total acumulada por unidade de água transpirada) (g MS kg^{-1} de H_2O transpirada) e o rendimento EUA ($y\text{EUA}$ - razão entre o rendimento da colheita de folhas por água transpirada ao longo do tempo) ($\text{g MS folhas kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ transpirada). Para ambos os parâmetros, dados de AF foram usados para estimar a MS foliar e biomassa total do primeiro dia de experimento por regressão linear ($r^2 > 0.82$ para folhas e $r^2 > 0.95$ para biomassa total).

3.8 Análise estatística

Todos os dados foram expressos como a média de quatro ou cinco repetições \pm erro padrão (EP). As linhagens transgênicas foram comparadas estatisticamente com a WT usando o teste t de Student com 5% de probabilidade ($P < 0.05$). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, EUA) ou SIGMAPLOT 14 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, foram obtidas plantas de tabaco anti-senso para o gene *StSUS3* sob controle do promotor KST1. Após a confirmação da inserção do transgene, através de PCR em DNA genômico, diferentes análises foram realizadas, como germinação em meio com Kanamicina®, temperatura da folha e transpiração. Com base nos resultados preliminares dessas análises (dados não mostrados), três linhagens transgênicas (L3, L11 e L13) foram selecionadas para posteriores caracterizações fisiológicas. Inicialmente, foram realizados experimentos para determinar os parâmetros de trocas gasosas, seguido da transpiração da planta inteira e análises de crescimento. A análise qRT-PCR mostrou que a expressão da isoforma 3 da *SUS* diminuiu quase 40% nas células guarda das linhagens transgênicas L3 e L13, enquanto que não foi observado diferença estatística entre a L11 e a WT (Figura 3). Por outro lado, a expressão gênica nas folhas as linhagens transgênicas não apresentaram diferenças estatísticas da WT, fortalecendo a ideia de que o promotor KST1 conduz a expressão especificamente em CG.

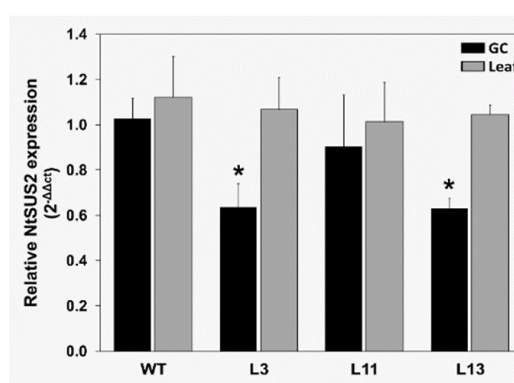


Figura 3. Expressão gênica em folhas e fragmentos epidérmicos de CG de plantas de *Nicotiana tabacum* L. tipo selvagem (WT) e linhagens transgênicas (L3, L11 e L13) crescidas em casa de vegetação. Os dados são mostrados como expressão relativa normalizada para expressão de WT. Os asteriscos (*) indicam diferença significativa a 5% em relação a WT pelo teste t de Student ($P < 0.05$) ($n = 3 \pm EP$).

As curvas de resposta fotossintéticas à luz (A -PAR) e CO_2 (A - C_i) foram inicialmente utilizadas para caracterizar a capacidade fotossintética das linhagens transgênicas em resposta a diferentes intensidades de luz e concentrações de CO_2 . Os resultados mostram que apenas a linhagem L3 apresentou menores valores de A quando comparada a WT (Figuras 4 A, B).

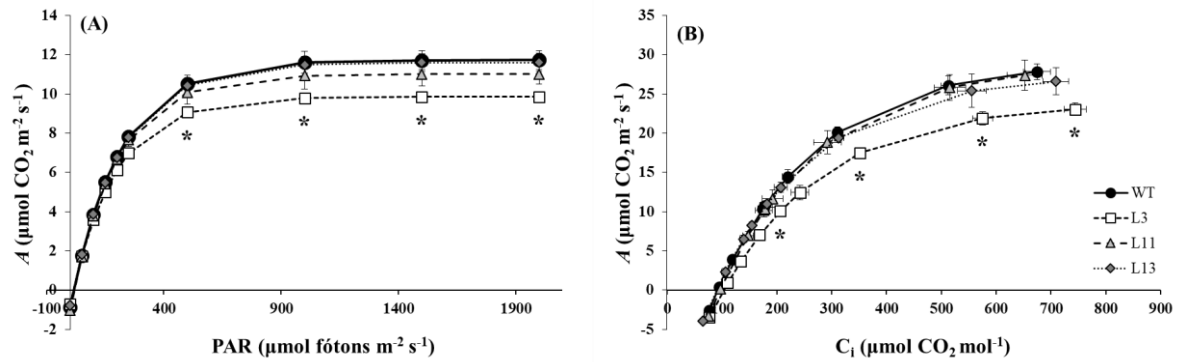


Figura 4. Curvas de respostas fotossintéticas à luz (A-PAR) e CO_2 (A- C_i) de folhas totalmente expandidas em plantas de *Nicotiana tabacum* L. tipo selvagem (WT) e linhagens transgênicas (L3, L11 e L13) crescidas em casa de vegetação. (A) A-PAR. (B) A- C_i . A regressão linear foi determinada por meio da equação $A = a(1 - e^{-bx}) + c$. Os asteriscos (*) indicam diferença significativa a 5% em relação a WT pelo teste t de Student ($P < 0.05$) ($n = 4 \pm \text{EP}$).

Os dados revelaram também que as plantas das linhagens L3, L11 e L13 exibiram reduções significativas na fotossíntese (A) e na condutância estomática (g_s) quando comparadas a WT sob 400 ppm de CO_2 e $1000 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Figuras 5 A, C). Importante ressaltar que ocorreu uma redução mais significativa ($P < 0.01$) na fotossíntese da L3 que das demais (Figura 5A), e que foi a única linhagem que apresentou menor A nas curvas a A-PAR e A- C_i (Figuras 4). Estudos recentes destacam que a superexpressão do gene *StSUS3* altera a g_s , impactando substancialmente a A (DALOSO *et al.*, 2016). Não foi observado efeito significativo das linhagens em relação a WT nos parâmetros taxa de transpiração (E) e respiração no escuro (R_d), enquanto que foi observado uma redução na eficiência de carboxilação (A/ C_i) nas plantas da linhagem L3 (Figuras 5 B, E, F). Esse comportamento está relacionado com a redução na fotossíntese, que resulta em uma redução na carboxilação e conseqüentemente um acúmulo de CO_2 .

Quando a transpiração é diminuída pela redução da g_s , geralmente ocorre a diminuição também da fotossíntese (ARAUJO *et al.*, 2011; FLEXAS *et al.*, 2013; FRANKS *et al.*, 2015). Neste experimento as tendências foram semelhantes, ocorreu a diminuição da g_s e A, mas a E não apresentou diferença estatística entre linhagens transgênicas e WT. Segundo Lugassi *et al.* (2015), a transpiração varia de acordo com as condições ambientais em torno das folhas. Assim, a análise de trocas gasosas pode não ser o suficiente para fornecer uma imagem clara do fenótipo transgênico, visto que a medição da transpiração da folha foi realizada em atmosfera controlada dentro da câmara do IRGA. Dessa forma, a metodologia gravimétrica foi utilizada para investigar a transpiração da planta inteira (TPI) em condições de casa de vegetação (Figura 6).

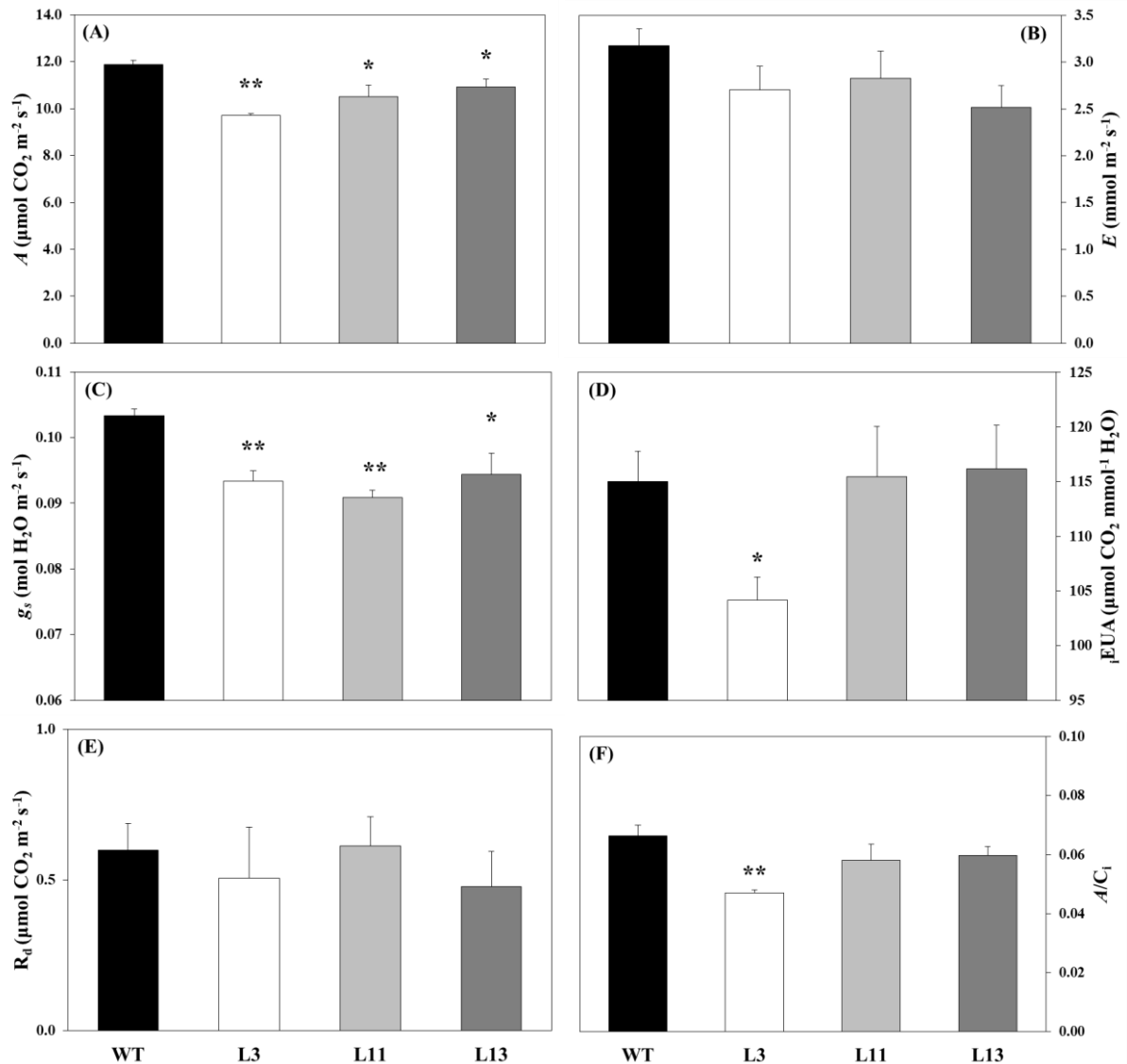


Figura 5. Efeito da alteração do gene *SUS3* sobre parâmetros de trocas gasosas em condições de 400 ppm de CO_2 e $1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de plantas de *Nicotiana tabacum* L. tipo selvagem (WT) e linhagens transg\u00eanicas (L3, L11 e L13) crescidas em casa de vegeta\u00e7\u00e3o. (A-F) Taxa fotossint\u00e9tica líquida (A), taxa de transpira\u00e7\u00e3o (E), condut\u00e2ncia estom\u00e1tica (g_s), efici\u00eancia do uso da \u00e1gua intr\u00ednseca ou (A/g_s), respira\u00e7\u00e3o no escuro (R_d), efici\u00eancia de carboxila\u00e7\u00e3o (A/C_i). Os asteriscos (*) indicam diferen\u00e7a significativa a 5% em rela\u00e7\u00e3o a WT pelo teste t de Student ($P < 0.05$) ($n = 5 \pm \text{EP}$). Dois asteriscos indicam diferen\u00e7a significativa a 1% ($P < 0.01$).

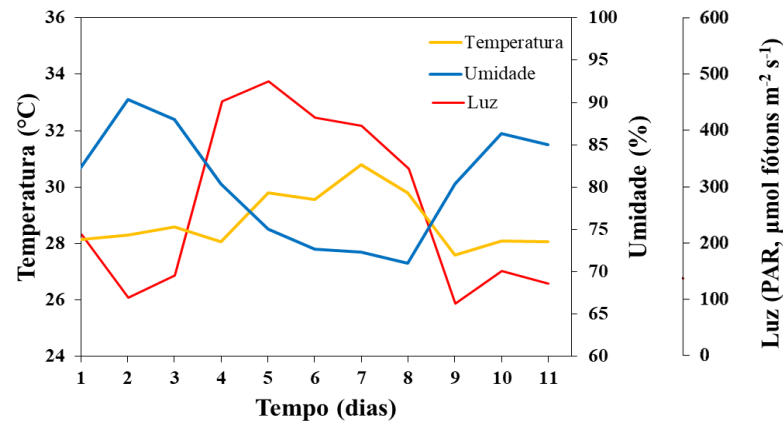
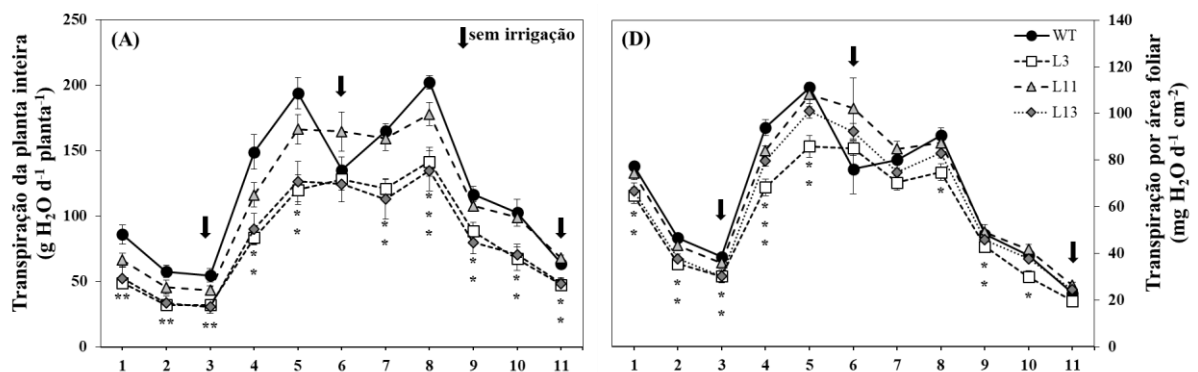


Figura 6. Condições climáticas da casa de vegetação ao longo dos dias de análise.

O efeito do silenciamento do gene *SUS3* especificamente em CG, reduziu drasticamente a transpiração da planta inteira das linhagens L3 e L13 ao longo dos dias (Figuras 7 A, B, C), e durante o curso diário (Figuras 8), inclusive quando expresso em relação à área foliar (Figuras 7 D, E, F). As linhagens transgênicas L3 e L13 apresentaram reduções ($P < 0.05$) de até 44% da transpiração da planta inteira quando comparadas a WT ao longo do experimento (Figura 7 A, B). Resultados similares foram encontrados em plantas transgênicas de tabaco anti-senso para o transportador *SUT1* em CG e tomate superexpressando *AtHXK1* especificamente em CG, em que as linhagens transgênicas transpiraram menos que a WT durante todo o experimento (ANTUNES *et al.*, 2017; KELLY *et al.*, 2019).

Nos dias 3, 6 e 11, as plantas não foram irrigadas, e no dia 6 foi observado uma forte redução da transpiração da planta inteira na WT, enquanto que as linhagens transgênicas continuaram estáveis (Figura 7A). Observou-se que no dia 6, a linhagem L11 manteve maior transpiração da planta inteira em relação a WT. Entretanto, neste dia, o percentual de transpiração da planta inteira não foi estatisticamente significativo entre a WT e as linhagens transgênicas (Figura 7B).



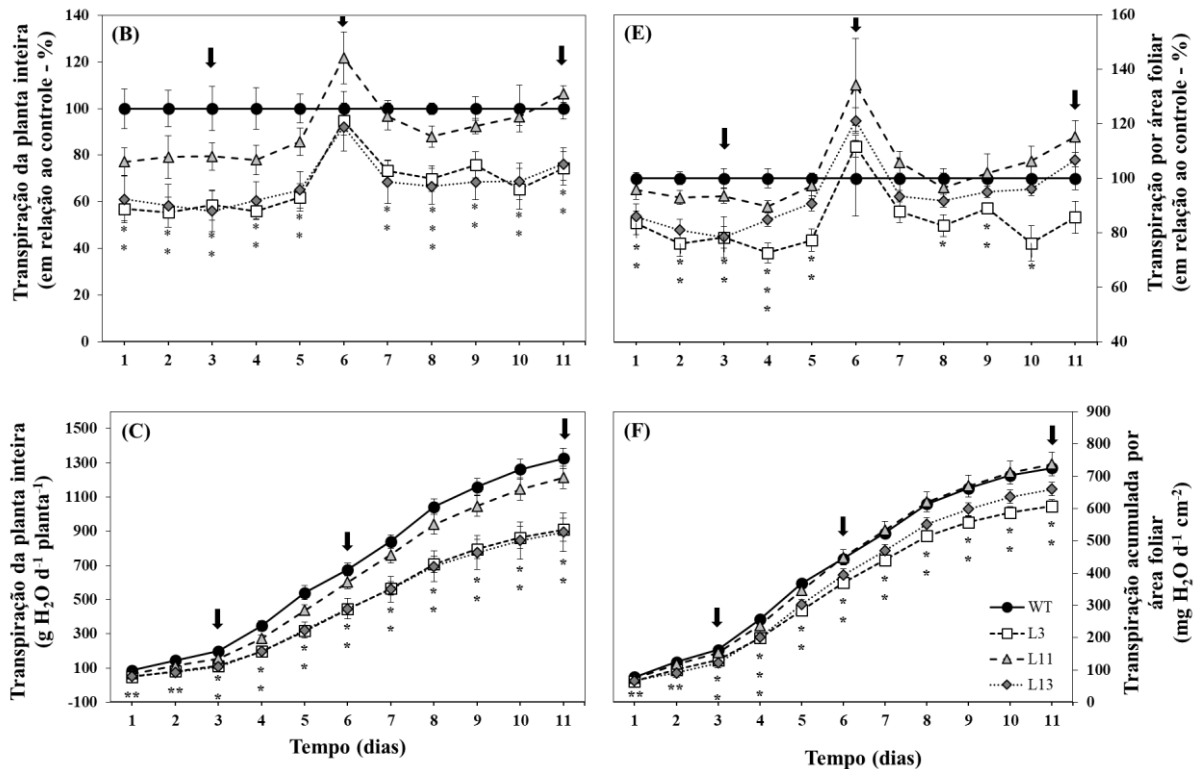


Figura 7. Efeito da alteração do gene *SUS3* sobre transpiração da planta inteira de plantas de *Nicotiana tabacum* L. tipo selvagem (WT) e linhagens transgênicas (L3, L11 e L13) crescidas em casa de vegetação. (A) Transpiração da planta inteira (TPI). (B) % de TPI em relação a WT. (C) TPI acumulada em 11 dias. (D) TPI por área foliar. (E) % de TPI por área foliar em relação a WT. (F) TPI por área foliar acumulada em 11 dias. Os asteriscos (*) indicam diferença significativa em relação a WT pelo teste t de Student ($P < 0.05$) ($n = 5 \pm EP$). Dois ou mais asteriscos significam que mais de uma linhagem transgênica apresentou diferença significativa em relação ao WT.

Considerando a transpiração acumulada da planta inteira, as linhagens L3 e L13 transpiraram menos (~32%) que a WT (Figura 7C), o que significa que elas conservaram respectivamente 416 e 433 g H₂O planta⁻¹ ao final de 11 dias de experimento. Este resultado difere do encontrado por Daloso *et al.* (2016) em que as linhagens transgênicas de tabaco L18 e L37 superexpressando o gene *SUS3* apresentaram maior perda de água acumulada que as plantas selvagens (WT). A área foliar é um parâmetro que exerce grande influência sobre a transpiração da planta inteira (NILSON; ASSMANN, 2006). Dessa forma, a TPI também foi determinada por área foliar. Inicialmente, as linhagens L3 e L13 apresentaram menor TPI/AF quando comparadas a WT (28% e 22%, respectivamente) pelo teste t de Student a 5% (Figuras 7D, E), acarretando em uma menor perda acumulada de água por unidade de área foliar (Figura 7F); logo as diferenças no TPI não estão, associadas à área foliar. Vale ressaltar, que apenas no dia 4 do experimento, a linhagem L11 mostrou diferença significativa em relação a WT (Figura 7F). Ao longo de um curso diário (dia 5 do experimento), a transpiração da planta

inteira também apresentou variações. Tanto a linhagem L3 quanto L13 apresentaram reduções da TPI em todos os intervalos de tempo analisados (Figura 8A). As maiores diferenças foram observadas nas primeiras horas do dia (Figura 8B). Tomados em conjunto, os resultados obtidos sobre transpiração da planta inteira demonstram que o silenciamento do gene *SUS3* em células guardas levou a uma redução substancial na TPI.

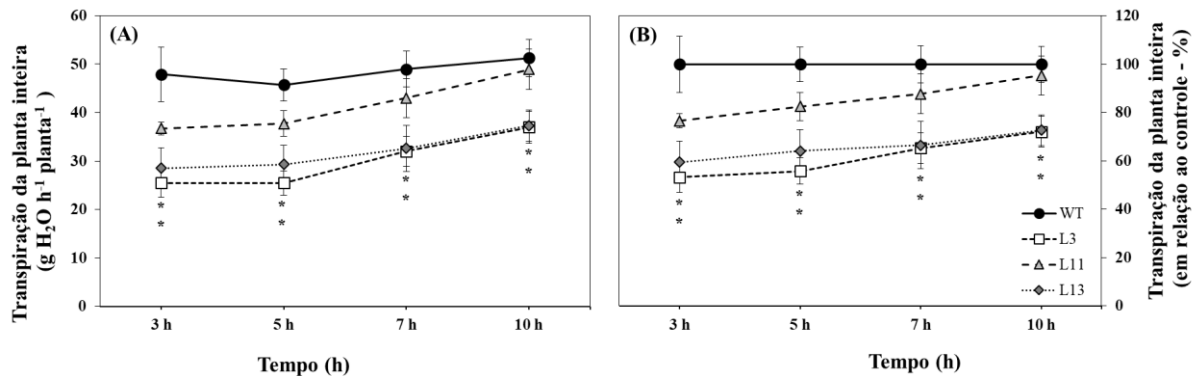


Figura 8. Efeito da alteração do gene *SUS3* sobre o curso diário da transpiração da planta inteira de plantas de *Nicotiana tabacum* L. tipo selvagem (WT) e linhagens transgênicas (L3, L11 e L13) em diferentes intervalos de tempo crescidas em casa de vegetação. (A) Transpiração total da planta como perda de água. (B) % de transpiração total da planta como perda de água em relação a WT. Os asteriscos (*) indicam diferença significativa em relação a WT pelo teste t de Student ($P < 0.05$) ($n = 5 \pm EP$). Dois ou mais asteriscos significam que mais de uma linhagem transgênica apresentou diferença significativa em relação ao WT.

A taxa de transpiração também está diretamente relacionada com a densidade estomática (NILSON; ASSMANN, 2006), em que folhas com maior densidade estomática apresentam maior taxa de transpiração (YU *et al.*, 2008). Entretanto, não houve diferenças estatísticas entre as linhagens transgênicas e WT em densidade estomática das superfícies adaxial e abaxial (Figura 9A) bem como na perda de massa fresca (H₂O) em folhas destacadas (Figura 9B). Assim, as diferenças estatísticas encontradas na transpiração não estão relacionadas a diferenças em densidade estomática bem como em perturbações no processo de fechamento estomático. Esses dados amparados pelos obtidos na análise de trocas gasosas sugerem que a alteração do gene *SUS3* não interferiu no processo de fechamento estomático e nem em seu desenvolvimento.

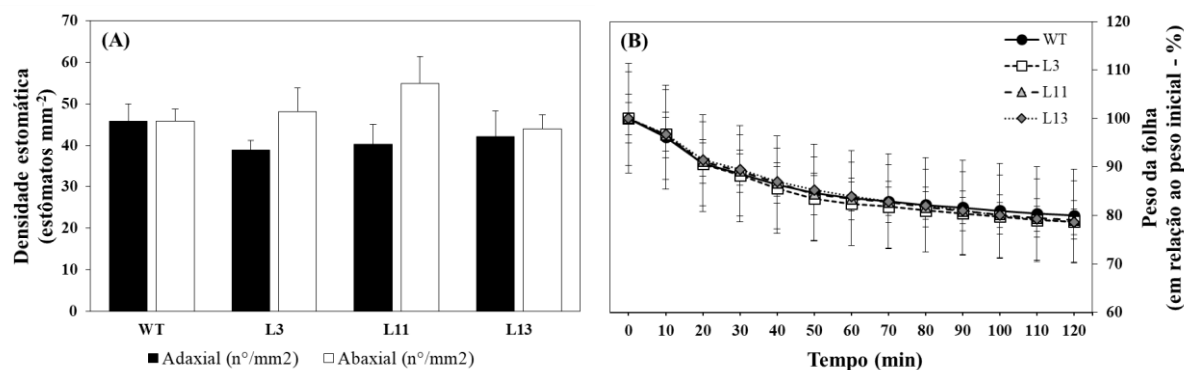


Figura 9. (A) densidade estomática e (B) perda de massa fresca em folhas destacadas de plantas de *Nicotiana tabacum* L. tipo selvagem (WT) e linhagens transgênicas (L3, L11 e L13) crescidas em casa de vegetação. Os asteriscos (*) indicam diferença significativa em relação a WT pelo teste t de Student ($P < 0.05$) ($n = 5 \pm EP$).

Os parâmetros de crescimento de plantas selvagens de *Nicotiana tabacum* (WT) e transgênicas anti-senso para o gene *SUS3* estão presentes na Tabela 1. Esses parâmetros foram medidos ao final do experimento de transpiração da planta inteira. As linhagens L3 e L13 apresentaram reduções significativas na MS raiz e na biomassa seca total, quando comparadas às plantas WT. Entretanto, apenas a L13 apresentou redução significativa para MS folhas, e L3 para MS caule. Como esperado, a linhagem transgênica com menor aérea foliar total (L13) apresentou menor acúmulo de biomassa total. Entretanto, apenas a linhagem transgênica L3 apresentou maior realocação de recursos para parte aérea, em que foi observado um maior índice de colheita, MS parte aérea/MS raiz e MS folhas/MS raiz. Os demais parâmetros não apresentaram diferença estatística da WT (Tabela 1). Daloso *et al.* (2016) estudando a superexpressão do gene *StSUS3* em plantas transgênicas de tabaco (L18 e L37) observaram que as linhagens transgênicas apresentaram um aumento na biomassa seca total, na MS de folhas e MS caule. Entretanto não apresentaram diferenças estatísticas no NF, MS folhas/MS raiz e MS parte área/MS raiz. No que se refere a área foliar no decorrer dos 11 dias do experimento de TPI, as linhagens L3 e L13 apresentaram reduções significativas do primeiro ao quarto dia, entretanto, apenas a L13 permaneceu menor até o final do experimento (Figuras 10 A, B).

Tabela 1. Efeito da alteração do gene *SUS3* sobre parâmetros de crescimento em plantas de *Nicotiana tabacum* L. tipo selvagem (WT) e linhagens transgênicas (L3, L11 e L13) crescidas em condições de casa de vegetação. Valores em negrito e sublinhados indicam diferença significativa em relação a WT pelo teste t de Student: $P < 0.05$ ($n = 5 \pm EP$).

Parâmetros	WT	E.P.	L3	E.P.	L11	E.P.	L13	E.P.
MS folhas (g)	5.93	0.5	4.50	0.4	5.48	0.4	<u>4.29</u>	0.5

MS caule (g)	3.01	0.3	2.02	0.1	2.79	0.3	2.33	0.3
MS raiz (g)	2.69	0.5	1.19	0.2	2.07	0.2	1.39	0.2
Biomassa seca total (g)	11.64	1.2	7.71	0.7	10.34	0.7	8.01	0.9
MS parte aérea (g)	8.95	0.8	6.52	0.5	8.27	0.6	6.62	0.7
MS parte aérea/MS raiz (g g ⁻¹)	3.69	0.6	5.68	0.6	4.13	0.4	4.97	0.3
MS folha/MS raiz (g g ⁻¹)	2.44	0.4	3.91	0.4	2.73	0.3	3.22	0.3
Índice de colheita (g g ⁻¹)	0.52	0.0	0.58	0.0	0.53	0.0	0.54	0.0
Área foliar total (cm ²)	2791.72	118.5	2422.40	183.9	2596.96	175.5	2004.09	227.4
Área foliar específica (cm ² g ⁻¹ folha seca)	487.53	52.0	541.39	18.8	473.93	10.5	468.3	13.9
Área foliar/MS raiz (cm ² g ⁻¹)	1257.81	340.2	2136.12	265.9	1292.05	111.2	1498.65	93.4
NF (>5 cm de comprimento)	13.4	0.4	14.75	0.9	13.2	0.2	13.6	1.0
Comprimento do caule (cm)	45.6	1.9	41.88	1.2	45.5	1.8	43.7	2.1
TCR (g g ⁻¹ dia ⁻¹)	0.07	0.0	0.05	0.0	0.07	0.0	0.07	0.0
Transpiração* (g)	1326.50	59.7	910.25	67.9	1214.30	66.7	893.90	111.5
EUA ₁ (μmol mmol ⁻¹)	3.80	0.2	3.70	0.3	3.81	0.2	4.41	0.4
_y EUA (g MS folhas kg ⁻¹)	2.86	0.1	3.47	0.1	3.14	0.3	3.49	0.2
_{s1} EUA (g MS kg ⁻¹)	4.41	0.5	3.74	0.3	4.51	0.2	4.02	0.4
_i EUA (μmol mmol ⁻¹)	115.01	2.7	104.15	2.1	115.45	6.0	116.20	5.7

*Não foi computada a água transpirada entre 17:00h e 06:00h nos dias do experimento de transpiração da planta inteira. Acumulado em 11 dias de experimento. MS: peso seco; NF: número de folhas; TCR: taxa de crescimento relativo; EUA₁: eficiência do uso da água instantânea; _yEUA: rendimento na eficiência do uso da água; _{s1}EUA: eficiência no uso da água ao longo do tempo; _iEUA: eficiência do uso da água intrínseca.

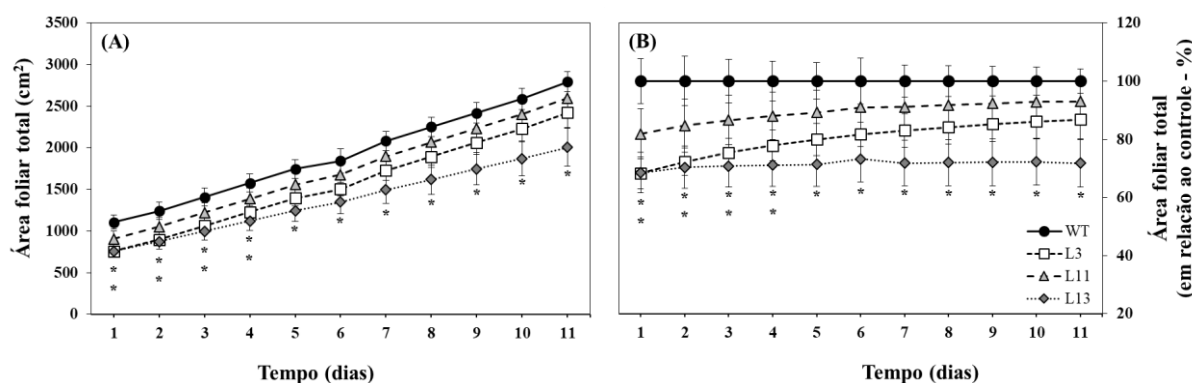


Figura 10. Efeito da alteração do gene *SUS3* sobre a área foliar total de plantas de *Nicotiana tabacum* L. tipo selvagem (WT) e linhagens transgênicas (L3, L11 e L13) crescidas em casa de vegetação. (A) Área foliar total. (B) % de área foliar em relação a WT. Os asteriscos (*)

indicam diferença significativa em relação a WT pelo teste t de Student ($P < 0.05$) ($n = 5 \pm EP$). Dois asteriscos significam que mais de uma linhagem transgênica apresentou diferença significativa em relação ao WT.

Nossos resultados mostram que as plantas transgênicas com menores taxas de transpiração, têm menor crescimento da raiz e priorizam a alocação de recursos para a parte aérea. Plantas anti-senso para o transportador *SUT1* especificamente em células guardas (ANTUNES *et al.*, 2017) mostraram que o silenciamento deste transportador reduziu o influxo de sacarose para as células guarda, com redução na transpiração e aumento no acúmulo de biomassa e EUA, mostrando que o influxo de sacarose para dentro destas células é importante para abrir os estômatos. Por outro lado, plantas superexpressando o gene *SUS3* especificamente em células guarda apresentaram maiores taxas de transpiração da planta inteira e maior acúmulo de biomassa (DALOSO *et al.*, 2016). Assim, abertura e o fechamento do poro estomático é, portanto, um ponto chave na regulação tanto da transpiração quanto da fotossíntese (JONES, 1998; KIM *et al.*, 2010) e afeta diretamente a eficiência do uso da água (EUA) das plantas, principalmente em condições de déficit hídrico (ANTUNES *et al.*, 2012; FERERES *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2014).

O efeito da alteração do gene *SUS3* em células guarda gerou impacto significativo sobre a EUA. No que se refere a δ EUA, a linhagem L13, se manteve semelhante a WT, evidenciado pela redução da g_s sem grandes prejuízos em A . Entretanto, apenas a linhagem L3 obteve diferença significativa, apresentando desempenho inferior a todos os genótipos, com δ EUA $10.86 \mu\text{mol mmol}^{-1}$ menor que a WT (Figura 5D). Todas as linhagens transgênicas estudadas obtiveram maior γ EUA que a WT, entretanto, apenas a linhagem L3 apresentou diferença significativa com 3.47 g kg^{-1} , apesar de apresentar baixo δ EUA (Tabela 1). Devido à redução na perda de água por transpiração e na biomassa seca total (Tabela 1), as plantas transgênicas não apresentaram diferença significativas em relação a WT na s_1 EUA e EUA_1 . O efeito não significativo na EUA instantânea é resultado da redução em A sem efeito significativo na E . Estudos avaliando a diminuição na expressão do transportador de sacarose *SUT1* em CG de tabaco apresentaram reduções na A , g_s e E , de modo que obtiveram uma melhora de 15% na EUA_1 e 39% no γ EUA relação a WT sem efeitos significativos na s_1 EUA (ANTUNES *et al.*, 2017). Tomados em conjunto, estes resultados mostram que a manipulação do metabolismo de CGs pode ser explorado como forma de otimizar a EUA.

5 CONCLUSÃO

A caracterização das plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum* L. anti-senso para o gene *SUS3* especificamente em células guarda mostrou que a manipulação genética deste gene altera substancialmente a regulação dos movimentos estomáticos, resultando em plantas com redução da g_s e transpiração da planta inteira com relativo pouco prejuízo em A , reforçado pelo aumento da γ EUA e a manutenção da δ EUA em pelo menos uma linhagem transgênica (L13). Tomados em conjunto, esses resultados indicam a possibilidade de considerar que a manipulação do metabolismo das células guardas pode ser uma opção eficaz para aumentar a EUA em condições hídricas controladas de forma a diminuir o uso excessivo de água pela cultura sem grandes perdas na produtividade.

REFERÊNCIAS

- ABIDO, W. A. E.; ZSOMBIK, L. Effect of water stress on germination of some Hungarian wheat landraces varieties. **Acta Ecologica Sinica**. China, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2018.03.004>
- ADAMS, R. M. *et al.* Climate Variability and Climate Change: Implications for Agriculture. **Advances in the Economics of Environmental Resources**, v. 3, p. 115-148, 2003.
- ALEXANDRATOS, N.; BRUINSMA, J. World agriculture towards 2015/2030: The 2012 Revision. **ESA Working Paper Food and Agriculture Organization of the United Nations**. 12-3, 147, 2012.
- AMODEO, G.; TALBOTT, L. D.; ZEIGER, E. Use of potassium and sucrose by onion guard cells during a daily cycle of osmoregulation. **Plant and Cell Physiology**, v. 37, n. 5, p. 575-579, 1996. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a028983>
- ANTUNES, W. C. *et al.* Allometric models for non-destructive leaf area estimation in coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*). **Annal of Applied Biology**, v. 153, n. 1, p. 33-40, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2008.00235.x>
- ANTUNES, Werner Camargos. **Alterações fisiológicas em plantas de batata com metabolismo alterado de sacarose**. 2005. 73f. Dissertação (Mestrado em Magister Scientiae) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2005.
- ANTUNES, W. C. *et al.* Changes in stomatal function and water use efficiency in potato plants with altered sucrolytic activity. **Plant, Cell and Environmental**, v. 35, n. 4, p. 747-759, 2012. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02448.x>
- ANTUNES, W. C. *et al.* Guard cell-specific down-regulation of the sucrose transporter SUT1 leads to improved water use efficiency and reveals the interplay between carbohydrate metabolism and K⁺ accumulation in the regulation of stomatal opening. **Environmental and Experimental Botany**, v. 135, p. 73-85, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.12.004>
- ARAÚJO, W. L. *et al.* Antisense inhibition of the iron-sulphur subunit of succinate dehydrogenase enhances photosynthesis and growth in tomato via an organic acid mediated effect on stomatal aperture. **The Plant Cell**, v. 23, n. 2, p. 600-27, 2011. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.081224>
- ASGHER, M. *et al.* Nitric oxide signaling and its crosstalk with other plant growth regulators in plant responses to abiotic stress. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 3, p. 2273-2285, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7947-8>
- AZEVEDO, B. M. *et al.* Production and yield response factor of sunflower under different irrigation depths. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.20, n. 5, p.427-433, 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v20n5p427-433>

BAUD, S.; VAULTIER, M. –N.; ROCHAT, C. Structure and expression. Profile of the sucrose synthase multigene Family in Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 396, p. 397-409, 2004. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh047>

BAPTISTA, J. M. *et al.* **Programa nacional para o uso eficiente da água**. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia, 2001. 212 p.

BAROJA-FERNÁNDEZ, E. *et al.* Sucrose synthase activity in the sus1/sus2/sus3/sus4 Arabidopsis mutant is sufficient to support normal cellulose and starch production. **PNAS**, v. 109, n. 1, p. 321-326, 2012. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117099109>

BATES, G. W. *et al.* A comparative Study of the Arabidopsis thaliana Guard-Cell Transcriptome and Its Modulation by Sucrose. **PLOS ONE**, v. 7, n. 11, p. 1-20, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049641>

BIENIAWSKA, Z. *et al.* Analysis of the sucrose synthase gene Family in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 49, n. 5, p. 810-828, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.03011.x>

BILAR, A. B. C. *et al.* Mudanças climáticas e migrações: reflexões acerca dos deslocamentos de nordestinos e haitianos no território brasileiro. **Revista de Geografia Física**, v. 8, n. 6, p. 1673-1691, 2015.

BOYER, J. S. Plant productivity and environment. **Science**, v. 218, p. 218:443, 1982. <https://doi.org/10.1126/science.218.4571.443>

BRASIL. Centro Nacional de Monitoramento e Alertas de Desastres Naturais no Brasil. **Relatório da Situação Atual da Seca no Semiárido e Impactos: Ano hidrológico 2014-2015**. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Informação, CEMADEN/MCTI, 2015. Disponível em: <http://www.cemaden.gov.br/secaeimpactos/boletim-mensal-monitoramento-impactos-seca-setembro-2015.php>. Acessado em: 25 jun. 2020.

BRASIL. **Governo amplia semiárido para apoiar mais municípios que sofrem com seca**. Ministério da Integração Nacional, 24 nov. 2017. Disponível em: <http://www.integracao.gov.br/ultimas-noticias/7047-governo-amplia-semiarido-para-apoiar-mais-municipios-que-sofrem-com-seca>. Acessado em: 25 jun. 2020.

BRASIL. Nova delimitação Semiárido. Ministério da Integração Nacional, nov. 2017. Disponível em: http://www.sudene.gov.br/images/arquivos/semiarido/arquivos/Rela%C3%A7%C3%A3o_de_Munic%C3%ADpios_Semi%C3%A1rido.pdf. Acessado em: 25 jun. 2020.

BRODRIBB, T. J.; SUSSMILCH, F.; MCADAM, S. A. M. From reproduction to production stomata are the master regulators. **Plant Journal**, v. 101, p. 756-767, 2020.

CAVATTE, P. C. *et al.* Could shading reduce the negative impacts of drought on coffee? A morphophysiological analysis. **Physiologia plantarum**, v. 144, p. 111-122, 2012.

CHAVES, M. M.; OLIVEIRA, M. M. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 407, p. 2365 – 2384, 2004.

CHEN, A. *et al.* Analyses of the sucrose synthase gene family in cotton: structure, phylogeny and expression patterns. **BMC Plant Biology**, v. 12, n. 85, p. 1-17, 2012. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-85>

CHIEW, F. H. S. *et al.* Estimating climate change impact on runoff across southeast Australia: Method, results, and implications of the modeling method. **Water Resources Research**, v. 45, n. 10, p. 1-17, 2009. <https://doi.org/10.1029/2008WR007338>

CONDON, A. G. *et al.* Breeding for high water-use efficiency. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 407, p. 2447-2460, 2004.

DALOSO, D. M.; ANJOS, L.; FERNIE, A. R. Roles of sucrose in guard cell regulation. **New Phytologist**, v. 211, n. 3, p. 809–818, 2016. <https://doi.org/10.1111/nph.13950>

DALOSO, D. M. *et al.* Tobacco guard cells fix CO₂ by both Rubisco and PEPcase while sucrose acts as a substrate during light-induced stomatal opening. **Plant Cell and Environmental**, v. 38, n. 11, p. 2353–2371, 2015. <https://doi.org/10.1111/pce.12555>

DALOSO, D. M. *et al.* Metabolism within the specialized guard cells of plants. **New Phytologist**, v. 216, n. 4, p. 1018–1033, 2017. <https://doi.org/10.1111/nph.14823>

DALOSO, D. M. *et al.* Guard cell-specific upregulation of sucrose synthase 3 reveals that the role of sucrose in stomatal function is primarily energetic. **New Phytologist**, v. 209, n. 4, p. 1470–1483, 2016. <https://doi.org/10.1111/nph.13704>

DAMANIA, R. *et al.* Uncharted Waters: The New Economics of Water Scarcity and Variability. Washington, DC: **World Bank**, 2017. <https://doi.org/10.1596/978-1-4648-1179-1>

DUARTE, J. M. *et al.* Eficiência do uso da água na produção de óleo do girassol (*Helianthus annuus* L.), sob suspensão hídrica. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, v. 6, n. 3, p. 166 - 175, 2012. <https://doi.org/10.7127/rbai.v6n300081>

FAO. **Towards a water and food secure future: Critical Perspectives for Policy-makers**. Food and Agriculture Organization of the United Nations: World Water Council, 2015. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i4560e.pdf>. Acesso em: 28 mai. 2020.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The state of food insecurity in the world**. 2014. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i4030e.pdf>. Acesso em: 28 mai. 2020.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Fao statistical year book 2013 world food and agriculture**. Rome, p. 307, 2013. Disponível em: <http://www.fao.org/3/i3107e/i3107e.pdf>. Acesso em: 25 mai. 2020.

- FERERES, E. *et al.* Balancing crop yield and water productivity tradeoffs in herbaceous and woody crops. **Functional Plant Biology**, V. 41, P. 1009-1018, 2014.
<https://doi.org/10.1071/FP14042>
- FLEXAS, J. *et al.* Diffusional conductances to CO₂ as a target for increasing photosynthesis and photosynthetic water-use efficiency. **Photosynthesis Research**, v. 117, n. 1-3, p. 45-59, 2013.
- FLEXAS, J. Genetic improvement of leaf photosynthesis and intrinsic water use efficiency in C₃ plants: why so much little success?. **Plant Science**, v. 251, p. 155-161, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.05.002>
- FLEXAS, J. *et al.* Photosynthetic limitations in Mediterranean plants: A review. **Environmental and Experimental Botany**, v. 103, p. 12–23, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.09.002>
- FLÜTSCH, S. *et al.* Guard cell starch degradation yields glucose for rapid stomatal opening in Arabidopsis. **Plant Cell**, Press., 2020.
- FRANKS, P. J. *et al.* Increasing water-use efficiency directly through genetic manipulation of stomatal density. **New Phytologist**, v. 207, n. 1, p. 188-195, 2015.
- FREIRE, Francisco Bruno Silva. **Sucrose synthase 2 regulates whole plant transpiration in Nicotiana tabacum L.** 2020. 91f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Programa de pós-graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020.
- FUNCEME. FUNDAÇÃO CEARENSE DE METEOROLOGIA E RECURSOS HÍDRICOS. Secretaria dos Recursos Hídricos. Governo do Estado do Ceará. Brasil, 2017. Disponível em: www.funceme.br.
- GAGO, J. *et al.* Opportunities for improving leaf water use efficiency under climate change conditions. **Plant Science**, v. 226, p. 108–119, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.04.007>
- GALMÉS, J.; MEDRANO, H.; FLEXAS, J. Photosynthetic limitations in response to water stress and recovery in Mediterranean plants with different growth forms. **New Phytologist**, v. 175, p. 81–93, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02087.x>
- GALON, L. *et al.* Eficiência de uso da água em genótipos de cana-de-açúcar submetidos à aplicação de herbicidas. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 28, n. 4, p. 777-784, 2010.
<https://doi.org/10.1590/S0100-83582010000400010>
- GOMES, E. P. *et al.* Produtividade de grãos, óleo e massa seca de girassol sob diferentes lâminas de irrigação suplementar. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.16, p.237-246, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662012000300001>
- GRANDIS, A.; GODOI, S.; BUCKERIDGE, M. S. Respostas fisiológicas de plantas amazônicas de regiões alagadas às mudanças climáticas globais. **Revista Brasileira de**

Botânica, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 1-12, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042010000100002>

GRANOT, D.; KELLY, G. Evolution of Guard-Cell Theories: The Story of Sugars. **Trends Plant Sci.**, v. 24, n. 6, p. 507–518, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.02.009>

HIROSE, T.; SCOFIELD, G. N.; TERAOKA, T. An expression analysis profile for the entire sucrose synthase gene family in rice. **Plant Science**, v. 174, n. 5, p. 534-543, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.02.009>

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The Water Culture Method for Growing Plants Without Soil. **California Agricultural Experiment Station**, Circular 34: Berkeley, p. 1–32, 1950.

HUSSAIN, M. *et al.* Drought stress in sunflower: Physiological effects and its management through breeding and agronomic alternatives. **Agricultural Water Management**, v. 201, p. 152-166, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2018.01.028>

IGBADUN, H. E. *et al.* Crop water productivity of an irrigated maize crop in Mkoji sub-catchment of the Great Ruaha River Basin, Tanzania. **Agricultural Water Management**, v. 85, n. 1-2, p.141-150, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2006.04.003>

IHUOMA, S. O.; MADRAMOOTOO, C. A. Recent advances in crop water stress detection. **Computers and Electronics in Agriculture**. Holanda, v. 141, p. 267–275, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2017.07.026>

IPCC. Intergovernmental Panel on Climate Change. **Climate Change 2007: The Physical Science Basis**. Working Group I Report, 2007. Disponível em: <https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/2018/02/ar4-wg1-frontmatter-1.pdf>. Acesso em: 8 jun. 2020.

IPCC. Intergovernmental Panel on Climate Change. **Climate change 2007: The Physical Science Basis**. Contribution of working groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. OMM/PNUMA, Geneva. 114p., 2007. Disponível em: https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/2018/03/ar4_wg2_full_report.pdf. Acesso: 16 mai. 2020.

IPCC. Intergovernmental Panel on Climate Change, **Climate change 2013: The Physical Science Basis**. Contribution of working group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, 2013. Disponível em: https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/2018/03/WG1AR5_SummaryVolume_FINAL.pdf. Acesso: 25 jun. 2020.

IPCC. Intergovernmental Panel on Climate Change, **Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability**. Working Group II contribution to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, 2014. Disponível em: https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/2018/03/ar5_wgII_spm_en-1.pdf. Acesso: 25 jun. 2020.

IPCC. Intergovernmental Panel on Climate Change. **Climate change 2014: synthesis report**. Geneva, 2015. Disponível em: http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar5/syr/SYR_AR5_FINAL_full_wcover.pdf. Acesso em: 4 jun. 2020.

IPCC. Intergovernmental Panel on Climate Change. AR 4. **Climate Change 2007: impacts, adaptation and vulnerability**. Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, 2007. Disponível em: <https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/2018/03/ar4-wg2-intro.pdf>. Acesso em: 25 mai. 2020.

JOHN, Liana; MARCONDES, Pyr. **O valor da água: primeiros resultados da cobrança nas Bacias PCJ**. São Paulo: Camirim Editorial. 2010.

JONES, Hamlyn G. Stomatal control of photosynthesis and transpiration. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, Special Issue, p. 387-398, 1998. https://doi.org/10.1093/jxb/49.Special_Issue.387

KELLY, G. *et al.* Guard-Cell Hexokinase Increases Water-Use Efficiency under Normal and Drought Conditions. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 2019.

KELLY, G. *et al.* Hexokinase mediates stomatal closure. **Plant Journal**, v. 75, n. 6, p. 977–988, 2013.

KELLY, G. *et al.* The *Solanum tuberosum* KST partial promoter as a tool for guard cell expression in multiple plant species. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 11, p. 2885-2897, 2017.

KIM, T.-H. *et al.* Guard Cell Signal Transduction Network: Advances in Understanding Abscisic Acid, CO₂, and Ca²⁺ Signaling. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 561-591, 2010. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112226>

KO, J.; PICCINNI, G. Corn yield responses under crop evapotranspiration-based irrigation management. **Agricultural Water Management**, v. 96, n. 5, p.799-808, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2008.10.010>

KOPKA, J.; PROVART, N. J.; MÜLLER-RÖBER, B. Potato guard cells respond to drying soil by a complex change in the expression of genes related to carbon metabolism and turgor regulation. **The Plant Journal**, v. 11, n. 4, p. 871–82, 1997. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1997.11040871.x>

LAWSON, T.; BLATT, M. R. Stomatal size, speed, and responsiveness impact on photosynthesis and water use efficiency. **Plant Physiologist**, v. 164, p. 1556–1570, 2014. <https://doi.org/10.1104/pp.114.237107>

LAWSON, T. *et al.* Mesophyll photosynthesis and guard cell metabolism impacts on stomatal behaviour. **New Phytologist**, v. 203, n. 4, p. 1064–1081, 2014. <https://doi.org/10.1111/nph.12945>

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: SARVIER, 2006.

- LIMA, V. F. *et al.* Toward multifaceted roles of sucrose in the regulation of stomatal movement. **Plant Signaling and Behavior**, v. 13, n. 8, p. 0–8, 2018. <https://doi.org/10.1080/15592324.2018.1494468>
- LIPPER, L. *et al.* Climate-smart agriculture for food security. **Nature Climate Change**, London, v. 4, p. 1068-1072, 2014.
- LOCATELLI, V. E. R. *et al.* Desenvolvimento vegetativo de cultivares de feijão-caupi sob lâminas de irrigação no cerrado roraimense. **Irriga**, v. 1, n. 1, p.28- 39, 2016. <https://doi.org/10.15809/irriga.2016v1n1p28-39>
- LONG, S. P.; BERNACCHI, C. J. Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error, **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 392, p. 2393-2401, 2003. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg262>
- LOUREIRO, M. E. 1999. **The role of SNF1 and sucrose synthase in metabolism of potato tubers**. 1999. 172p. Tese (PhD). Freie Universitat Berlin.
- LUGASSI, N. *et al.* Expression of Arabidopsis Hexokinase in Citrus Guard Cells Controls Stomatal Aperture and Reduces Transpiration. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1–11, 2015. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01114>
- MACHADO, A. F. L. *et al.* Photosynthetic efficiency and water use in eucalyptus plants sprayed with glyphosate. **Planta Daninha**, v. 28, n. 2, p. 319-327, 2010.
- MACHADO, E. C. *et al.* Respostas da fotossíntese de três espécies de citros a fatores ambientais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 1161-1170.
- MANIVANNAN, P. *et al.* Analysis of antioxidant enzyme activity in various genotypes of *Helianthus annuus* L. (Sunflower) under varied irrigation regimes. **Food Biology**, v.3, p.1-10, 2014.
- MARENGO, J. A. **Mudanças climáticas globais e seus efeitos sobre a biodiversidade: caracterização do clima atual e definição das alterações climáticas para o território brasileiro ao longo do século XXI**. Brasília: MMA, 2007.
- MARENGO, J. A.; TORRES, R. R.; ALVES, L. M. Drought in Northeast Brazil - past, present, and future. **Theor Appl Climatol**, Springer, v. 129, n. 3-4, p. 1189-1200, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00704-016-1840-8>
- MATOS, Fábio Santos *et al.* **Folha seca: introdução à fisiologia vegetal**. 1. ed. Curitiba: Appris, 2019.
- MATTHEWS, J. S.; VIALET-CHABRAND, S. R.; LAWSON, T. Diurnal variation in gas exchange: the balance between carbon fixation and water loss. **Plant Physiology**, v. 174, n. 4, p. 614-623, 2017. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00152>

MEDEIROS, D. B. *et al.* Enhanced photosynthesis and growth in *atqac1* knockout mutants are due to altered organic acid accumulation and an increase in both stomatal and mesophyll conductance. **Plant Physiology**, v. 170, p. 86–101, 2016. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01053>

MEDEIROS, D. B. *et al.* Utilizing systems biology to unravel stomatal function and the hierarchies underpinning its control. **Plant, Cell and Environment**, v. 38, n. 8, p. 1457–1470, 2015.

MENG, S. *et al.* Nitrogen uptake and metabolism of *Populus simonii* in response to PEG-induced drought stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 123, p. 78–87, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.11.005>

MEYER, L. E. **Papel fisiológico de uma isoenzima de sintase de sacarose em folhas de batata**. 2003. 48f. Tese MS. Universidade Federal de Viçosa.

MORANDO, R. *et al.* Déficit hídrico: Efeito sobre a cultura da soja. **Journal of Agronomic Sciences**, Umuarama, v.3, n. especial, p.114-129, 2014.

MORISON, J. I. L. *et al.* Improving water use in crop production. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 363, p. 639-658, 2008. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2175>

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473–497, 1962. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

NEVES, Fábio de Farias. **Fixação de carbono através de microalgas nativas (*Chlamydomonas* sp.) cultivadas em diferentes concentrações de CO₂**. 2013. 200f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 2013.

NI, D. A. Role of vacuolar invertase in regulating *Arabidopsis* stomatal opening. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, n. 6, p. 2449–2452, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1036-5>

NILSON, S. E.; ASSMANN, S. M. The Control of Transpiration. Insights from *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 143, n. 1, p. 19-27, 2006.

NUNES-NESE, A. *et al.* Natural genetic variation for morphological and molecular determinants of plant growth and yield. **Journal of Exp. Bot.**, p. 1-13, 2016. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw124>

OECD. Organisation for Economic Cooperation and Development; FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Agricultural outlook 2010-2019**. Washington: OECD; FAO, 2010. Disponível em: <https://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/8A310C3417ACC5D04925775A0023FD67-OECD-FAO-Jun2010.pdf>. Acesso em: 29 jun. 2020.

OLIVEIRA, J. T. L. *et al.* Fitomassa de girassol cultivado sob adubação nitrogenada e níveis de água disponível no solo. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, v.6, n. 1, p.23-32, 2012.

PAIVA, A. S. *et al.* Condutância estomática em folhas de feijoeiro submetido a diferentes regimes de irrigação. **Engenharia Agrícola**, v. 25, n. 1, p. 161-169, 2005.
<https://doi.org/10.1590/S0100-69162005000100018>

PBMC. Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas. **Base Científica das Mudanças Climáticas**. Contribuição do Grupo de Trabalho 1 do Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas ao Primeiro Relatório de Avaliação Nacional sobre Mudanças Climáticas. Organização de Ambrizzi, T & Araujo, M. Rio de Janeiro, Coppe/Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014. Disponível em:
http://www.pbmc.coppe.ufrj.br/documentos/RAN1_completo_voll.pdf. Acesso em: 25 mai. 2020.

PENNISI, E. The Blue Revolution, Drop by Drop, Gene by Gene. **Science**, v. 320, n. 5873, p. 171–173, 2008. <https://doi.org/10.1126/science.320.5873.171>

PEREIRA-NETTO, Aducto Bellarmino de. Crescimento e desenvolvimento. *In*: WACHOWICZ, Cynthia Maria; CARVALHO, Ruy Inácio Neiva de. (Org.). **Fisiologia vegetal: produção e pós-colheita**. 1. ed. Curitiba: Champagnat, 2002. p. 17-42.

PIMENTEL, Carlos. **A relação da planta com a água**. Seropédica: Edur, 2004.

PLESCH, G.; EHRHARDT, T; MUELLER-ROEBER, B. Involvement of TAAAG elements suggests a role for Dof transcription factors in guard cell-specific gene expression. **The Plant Journal**, v. 28, n. 4, p. 455–464, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.01166.x>

PNUMA. Programa das Nações Unidas para Meio Ambiente. **Perspectiva para o meio ambiente mundial – 2002: Geo3, passado presente e futuro**. OSTORINO, R. (coord.); SHELLARD, S.; CORREA, N. B. (Trad.). Brasília/DF: IBAMA/UMA, 2004. Disponível em:
<https://profmoraes.files.wordpress.com/2012/02/geo-3-1-presente-passado-e-futuro.pdf>. Acesso em: 25 mai. 2020.

PROCÓPIO, S. O. *et al.* Características fisiológicas das culturas de soja e feijão e de três espécies de plantas daninhas. **Planta Daninha**, v. 22, n. 2, p. 211-216, 2004.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582004000200006>

REBOITA, M. S. *et al.* Climate Projections for South America: RegCM3 Driven by HadCM3 and ECHAM5. **Advances in Meteorology**, v. 2014, p. 1- 17, 2014.
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/376738>

REBOUÇAS, A. da C. Proteção dos Recursos Hídricos. **Revista de Direito Ambiental**. A. 8, n. 32, p. 33-67, 2003.

ROSENZWEIG, C. *et al.* Assessing agricultural risks of climate change in the 21st century in a global gridded crop model intercomparison. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 9, p. 3268–3273, 2014. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222463110>

SCHWALM, C. R. *et al.* Global patterns of drought recovery. **Nature**, v. 548, p. 202–205, 2017.

SOLOMON, S. *et al.* **Mudança climática 2007 - a base da ciência física**. Contribuição do grupo de trabalho I para o quarto relatório de avaliação do IPCC. Cambridge University Press, 2007.

SOUSA, Alan Bernard Oliveira de. **Irrigação com água salina no desenvolvimento e produção da mini melancia em diferentes concentrações de CO₂ atmosférico**. 2015. Tese (Doutorado em Engenharia de Sistemas Agrícolas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.
<https://doi.org/10.11606/T.11.2016.tde-14122015-172156>.

SOUZA NETO, Otacílio Antônio de. **Avaliação de linhagens transgênicas de plantas de *Nicotiana tabacum* superexpressando uma aquaporina de origem fúngica para tolerância a estresses abióticos**. 2017. 93f. Monografia (Curso de Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

STONE, L. F. **Eficiência do uso da água na cultura do arroz irrigado**, Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2005, 48 p. (Documentos, Embrapa Arroz e Feijão, 176).

TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

TALBOTT, L. D.; ZEIGER, E. Central roles for potassium and sucrose in guard-cell osmoregulation. **Plant Physiology**, v. 111, n. 4, p. 1051–1057, 1996.
<https://doi.org/10.1104/pp.111.4.1051>

TANG, G. –Q.; LÜSCHER, M.; STURM, A. Antisense repression of vacuolar and cell wall invertase in transgenic Carrot alters early plant development and sucrose partitioning. **The Plant Cell**, v. 11, n. 2, p. 177-189, 1999. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.2.177>

TEJEDA, Luis Herminio Chairez. **Déficit hídrico em plântulas de milho: aspectos morfológicos e moleculares**. 2019. 74f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Programa de pós-graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

TESTER, M.; LANGRIDGE, P. Breeding technologies to increase crop production in a changing world. **Science**, v.327, p. 818-822, 2010. <https://doi.org/10.1126/science.1183700>

UNCCD. United Nations Convention to Combat Desertification. **Desertification: A visual synthesis**. França: UNCCD, 2011. Disponível em:
<http://archive.zoinet.org/web/sites/default/files/publications/Desertification-SP.pdf>

UNCCD. United Nations Convention to Combat Desertification. **The ripple effect: A Fresh Approach to Reducing Drought Impacts and Building Resilience**. França: UNCCD, 2016.

UNESCO (United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization). **Global Education Monitoring Report 2016**. Place: Inclusive and Sustainable Cities. Paris, UNESCO, 2016. Disponível em: unesdoc.unesco.org/images/0024/002462/246230E.pdf.

UNESCO (United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization) WWAP. **The United Nations World Water Development Report 2019: Leaving No One Behind**. Paris, UNESCO, 2019. Disponível em: <https://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/367306eng.pdf>

VALVERDE, M. C.; MARENGO, J. A. Extreme rainfall indices in the hidrographic basins of Brazil. **Open Journal of Modern Hidrology**, v. 4, p. 10-26, 2014. <https://dx.doi.org/10.4236/ojmh.2014.41002>

XIAO, X. *et al.* Structure and expression profile of the sucrose synthase gene family in the rubber tree: indicative of roles in stress response and sucrose utilization in the laticifers. **The FEBS Journal**, v. 281, n. 1, p. 291-305, 2014. <https://doi.org/10.1111/febs.12595>

WALTER, J. *et al.* Do plants remember drought? Hints towards a drought-memory in grasses. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, ed. 1, p. 34–40, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.10.020>

WANG, Y. *et al.* Overexpression of plasma membrane H⁺-ATPase in guard cells promotes light-induced stomatal opening and enhances plant growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 1, p. 533–8, 2014. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305438111>

WANG, Z. *et al.* Analysis of the sucrose synthase gene family in tobacco: structure, phylogeny, and expression patterns. **Planta**, v. 242, n. 1, p. 153-166, 2015.

WATLING, J. R. PRESS, M. C.; QUICK, W. P. Elevated CO₂ Induces Biochemical and Ultrastructural Changes in Leaves of the C₄ cereal Sorghum. **Plant Physiology**, v. 123, n. 3, p. 1143-1152, 2000.

WHEELER, T.; BRAUN, J. Climate change impacts on global food security. **Science**, v. 341, n. 6145, p. 508-513, 2013.

WMO. World Meteorological Organization; Global Water Partnership; National Drought Mitigation Center. **National Drought Management Policy Guidelines: A Template for Action**. Integrated Drought Management Programme. Tools and Guidelines Series 1. WMO, Geneva, Switzerland and GWP, Stockholm, Sweden, 2014.

WWAP (United Nations World Water Assessment Programme). **The WWAP Water and Gender Toolkit for Sex-Disaggregated Water Assessment, Monitoring and Reporting**. Gender and Water Series. UNESCO, 2015. Disponível em: www.unesco.org/new/en/natural-sciences/environment/water/wwap/water-and-gender/water-and-gender-toolkit/.

YU, H. *et al.* Activated expression of an Arabidopsis HD-START protein confers drought tolerance with improved root system and reduced stomatal density. **The Plant Cell**, v. 20, p. 1134-1151, 2008.