

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR**



**Análises moleculares e fisiológicas como
estratégias para elucidar os mecanismos de
tolerância à seca em porta-enxerto de citros**

ARIANA SILVA SANTOS

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL
Dezembro de 2019**

ARIANA SILVA SANTOS

**Análises moleculares e fisiológicas como
estratégias para elucidar os mecanismos de
tolerância à seca em porta-enxerto de citros**

Tese apresentada à Universidade Estadual
de Santa Cruz, como partes das exigências
para obtenção do título de doutor em
Genética e Biologia Molecular.

Área de Concentração: Genética e
Melhoramento Vegetal

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL
Dezembro de 2019

S237

Santos, Ariana Silva.

Análises moleculares e fisiológicas como estratégias para elucidar os mecanismos de tolerância à seca em porta-enxerto de citros / Ariana Silva Santos. – Ilhéus, BA: UESC, 2019.
xi, 157 f.: il.

Orientador: Abelmon da Silva Gesteira.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.
Inclui referências.

1. Cítricos – Efeito da seca. 2. Epigenética. 3. Porta-enxerto. 4. Stress (Fisiologia). I. Título.

CDD 634.3

ARIANA SILVA SANTOS

**Análises moleculares e fisiológicas como
estratégias para elucidar os mecanismos de
tolerância à seca em porta-enxerto de citros**

Tese apresentada à Universidade Estadual
de Santa Cruz, como partes das exigências
para obtenção do título de doutor em
Genética e Biologia Molecular.

Área de Concentração: Genética e
Melhoramento Vegetal

APROVADA:

Dr. Rogério Mercês Ferreira Santos
UEFS

Dra. Martielly Santana dos Santos
UESC

Dra. Milena do Amaral Santos
UESC

Dra. Virgínia Lúcia Fontes Soares
UESC

Dr. Abelmon da Silva Gesteira
Embrapa - Orientador

Não fui Eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar".

(Josué 1:9)

Aos meus pais, Lucidalva e Edimário, minha fonte de resiliência.

Ao meu companheiro Cleub Júnior.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

DEUS pela vida, oportunidades e força interior. Obrigada Senhor por está presente em cada detalhe da minha caminhada!

À Universidade Estadual de Santa Cruz, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular pela oportunidade.

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

À Embrapa Mandioca e Fruticultura por toda infraestrutura e apoio para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao meu orientador, Dr. Abelmon Gesteira, pela oportunidade e confiança para o desenvolvimento da pesquisa. Pelas experiências e conhecimentos compartilhados e também por me mostrar que para fazer Ciências temos que pensar fora da caixinha. Gratidão!

À minha querida co-orientadora, Dra. Cláudia Fortes, por todos os ensinamentos compartilhados e incentivo inestimável. És referência pra mim. Gratidão!

À minha co-orientadora, Dra. Dayse Drielly, ser humano incrível! Obrigada por todo incentivo e colaboração durante este processo. Por ser tão disponível e dedicada. Gratidão!

A todos os professores do PPGGBM por contribuírem para minha formação, em especial o professor Priminho. Gratidão professor Priminho pelo acolhimento no Grupo Proteômicos, pelos incentivos, apoio e carinho.

Ao incrível Grupo Proteômicos formado por pessoas e profissionais maravilhosos, que compartilham, incentivam e nos faz aprimorar todos os dias. Obrigada colegas!

As queridas secretárias do PPGGBM, Mara e Fabrícia por todo carinho e dedicação.

Ao Centro de Biotecnologia e Genética (CBG) por todo apoio, em especial ao Laboratório de Biologia Molecular.

Aos colegas do CBG, em especial Horlei e D. Jô.

A Diana Neves por ser tão acessível, dedicada e paciente comigo. Obrigada por ter compartilhado tudo sobre esse trabalho. Gratidão!

A Adriadna (Adinha) por dividir suas experiências sobre Proteômica. Agradeço pela amizade e parceria de trabalho.

A maravilhosa equipe do Núcleo de Biologia Avançada da Embrapa, em especial Vanderson, Andressa e Sr. Raimundo. Este laboratório sempre será minha família.

A Sr. Santana, funcionário da Embrapa. Gratidão pelos dias de campo, boas conversas e as experiências compartilhadas.

As companheiras de casa, Leti e Joci, obrigada meninas pela rotina compartilhada, pelos risos, pelas pautas do dia e amizade!

Ao ser humano de luz, Natasha, minha amiga Nath! Gratidão pela nossa amizade. Obrigada por sempre está ao meu lado me incentivando, puxando a minha orelha, rindo, abraçando, dançando....Obrigada Nath!

Aos amigos que deixaram a caminha mais leve em especial, Thay, Nay, Ivina, Malu e Alda.

A Luana Gonçalves e a Migo (Tharisson) por terem sido minha primeira família em Itabuna. Gratidão Luana pelas vivências compartilhadas e, principalmente por me incentivar nos momentos mais difíceis deste processo.

À minha querida e amada família! Meus pais, Lucidalva e Edimário por serem minha fonte de inspiração, força e resiliência. Isso é por vocês!

Aos meus irmãos, Adriele, Adriana e Júnior pelo apoio e carinho.

Aos meus pacotinhos de amor em forma de sobrinhos, Rian, Belly, Gui, Ronald, Ana e Helô.

Ao meu lindo presente, Cleub Júnior. Gratidão meu amor, por ser tão companheiro, amigo e calma. Por ter sido minha razão, minha lucidez nos momentos tão difíceis. Por ser o meu maior incentivador, por ter escolhido caminhar ao meu lado. Você foi fundamental nesse processo. Gratidão!

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para que eu chegasse até aqui acreditando que eu posso sempre mais.

Gratidão!

ÍNDICE

EXTRATO.....	viii
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO.....	14
HIPÓTESE.....	17
OBJETIVOS.....	17
REVISÃO DE LITERATURA.....	18
CAPÍTULO 1: Citrus scion and rootstock combinations show changes in DNA	46
methylation profiles and ABA insensitivity under recurrent drought conditions	
CAPÍTULO 2: Expressão diferencial de genes em variedades de porta-enxertos de	76
citros submetidos a condições de déficit hídrico	
CAPÍTULO 3: Bases epigenéticas envolvidas no estresse por seca em plantas: um	80
olhar sistemático	
CONCLUSÕES GERAIS.....	107
REFERÊNCIAS.....	108
.....	

EXTRATO

SANTOS, Ariana Silva, D.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, dezembro de 2019. **Análises moleculares e fisiológicas como estratégias para elucidar os mecanismos de tolerância à seca em porta-enxerto de citros.** Orientador: Abelmon da Silva Gesteira. Coorientadores: Cláudia Ferreira Forte e Dayse Drielly Souza Santana-Vieira.

A seca é o principal fator abiótico que limita a produção do cultivo de citros. Espera-se que em função das atuais mudanças climáticas, as limitações hídricas deverão aumentar em intensidade, recorrência e extensão geográfica. Os principais locais produtores de citros se concentram em regiões tropicais e subtropicais no mundo, regiões onde as modificações nos regimes de chuva tem-se acentuado e limitado a citricultura. Por isso, compreender os mecanismos fisiológicos que as plantas cítricas desenvolvem quando estão expostas as condições de seca, bem como mecanismos bioquímicos e, principalmente respostas moleculares relacionadas, a partir da expressão gênica e modulações epigenéticas é uma questão urgente na busca de genótipos mais tolerantes, que podem ser diretamente aplicados à agricultura. Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo principal caracterizar as respostas fisiológicas, moleculares e bioquímicas na interação copa/porta-enxerto de citros, identificando as estratégias de sobrevivência à seca dessas plantas, visando a identificação de genótipos tolerantes. Para alcançar este objetivo três experimentos independentes foram desenvolvidos: i) em condições recorrentes de déficit hídrico WD1, WD2 e WD3 (plantas expostas a um, dois e três períodos de déficits hídricos, respectivamente) avaliar o perfil fisiológico, bioquímico e epigenético das plantas cítricas *Citrus limonia* Osb. (Limoeiro ‘Cravo’ - RL), *Citrus sunki* (Tangerina ‘Sunki Maravilha’ - SM) e a *Citrus latifolia* Tanaka (Limeira ácida ‘Tahiti’ - TAL), nas seguintes combinações copa/porta enxerto, TAL/RL e TAL/SM; ii) traçar o perfil transcriptômico de plantas cítricas *Citrus sunki* (Tangerina ‘Sunki Maravilha’ – SM; Tangerina ‘Sunki Tropical’ - ST) como porta-enxerto, nas seguintes combinações copa/porta-enxerto, VO/SM (laranjeira Valencia/Sunki Maravilha) e VO/ST (laranjeira Valencia/Sunki Tropical), em condições de deficiência hídrica; e iii) com uma revisão sistemática identificar se as bases epigenéticas estão envolvidas na “memória” do estresse em plantas e se a tolerância ao déficit hídrico está relacionada com os mecanismos epigenéticos. Como resultados principais, o primeiro experimento permitiu identificar que combinações TAL/SM e TAL/RL apresentaram alterações nos perfis de metilação do DNA em função do déficit hídrico; os parâmetros fisiológicos avaliados apresentaram valores muito próximos entre as combinações, sendo este um indicativo de que a copa TAL, não responde ao comportamento dos porta-enxertos que apresentam padrões diferentes de resposta ao déficit hídrico. Desse modo, outras descobertas sugerem que a copa TAL é insensível ao hormônio vegetal Ácido Abscísico (ABA). Além disso, foi visto que a severidade e recorrência do estresse hídrico influenciaram na redução de produção excessiva de ROS, com a ação das enzimas antioxidantes. Com o segundo experimento foi possível identificar genes diferencialmente expressos (DEGs) envolvidos em mais de 100 processos biológicos e função molecular, além disso, DEGs relacionados à biossíntese do ABA, ao sistema redox, ao mecanismo de parede celular, desenvolvimento de raiz, incluindo fatores de transcrição (TFs) e proteínas Kinases (Pks) em tecidos de raiz das tangerineiras ‘Sunki’. A revisão sistemática permitiu compreender que os mecanismos epigenéticos conferem tolerância a seca e que eles estão envolvidos na “memória” do estresse transgeracional em

plantas. Em conclusão, para períodos de restrição hídrica mais severos, como previstos para os próximos anos, as tangerineiras ‘Sunki Maravilha’ e ‘Sunki Tropical’ mostram-se como alternativas de porta-enxertos para diversificação dos pomares de citros de regiões secas; os genes candidatos a tolerância a seca em citros podem ser utilizados em trabalhos futuros para o melhoramento da citricultura; as modificações epigenéticas induziram tolerância a seca em plantas cítricas e isto também foi confirmado na revisão sistemática em estudos com outras plantas. Essas marcas epigenéticas podem ser exploradas como marcadores epigenéticos para selecionar outros genótipos tolerantes de citros. Esforços futuros são necessários para compreender o mecanismo que confere insensibilidade da Limeira ácida ‘Tahiti’ ao ABA.

Palavras – chave: citros, déficit hídrico, Epigenética, mecanismos epigenéticos, MSAP, memória do estresse, RNA-seq, transcriptoma.

ABSTRACT

SANTOS, Ariana Silva, D.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, dezembro de 2019. **Molecular and physiological analyzes as strategies to elucidate drought tolerance mechanisms in citrus rootstocks.** Advisor: Abelmon da Silva Gesteira. Advisor Committee: Cláudia Ferreira Forte e Dayse Drielly Souza Santana-Vieira.

Drought is the main abiotic factor that limits the production of citrus cultivation. Due to the current climate change, water restrictions are expected to increase in intensity, geographical extent and recurrence. The main citrus producing areas are concentrated in tropical and subtropical regions worldwide, where changes in rainfall regimes have accentuated also limiting citrus cultivation. Understanding the physiological mechanisms that citrus plants develop when they are exposed to drought conditions as well as biochemical mechanisms, and especially those related molecular responses from gene expression and epigenetic modulations is an urgent issue in the search for more tolerant genotypes that can be directly applied to agriculture. Therefore, the present work aims to characterize the physiological, molecular and biochemical responses in the citrus scion/rootstock interaction, analyzing the drought survival strategies of these plants in order to identify tolerant genotypes. In order to achieve this goal three independent experiments were carried out i) under recurrent water deficit conditions (WD1, WD2 and WD3) to evaluate the physiological, biochemical and epigenetic profiles of citrus plants *Citrus limonia* Osb. ('Rangpur' lime - RL), *Citrus sunki* (Mandarin 'Sunki Wonder' - SM) and *Citrus latifolia* Tanaka ('Tahiti' acid lime - TAL), in the following scion/rootstock combinations, TAL / RL and TAL / SM; ii) trace the transcriptomic profile of citrus plants, *Citrus sunki* (Mandarin 'Sunki Wonder' - SM; Mandarin 'Sunki Tropical' - ST) as rootstock, in the following combinations scion/rootstock, VO / SM and VO / ST, under water deficit conditions; and iii) a systematic review analyzing if epigenetic bases are involved in the stress "memory" of plants and whether water deficit tolerance is related to epigenetic mechanisms. As main results, the first experiment showed that the TAL / SM and TAL / RL combinations presented alterations in DNA methylation profiles due to water deficit. The parameters presented very similar values between the combinations, which is an indication that the TAL scion does not respond to the behavior of the rootstocks that present different patterns of response to water deficit. Thus, other findings suggest that the TAL scion is insensitive to the plant hormone Abscissic Acid (ABA). Furthermore, the severity and recurrence of water stress influenced the reduction of ROS overproduction with the action of antioxidant enzymes. With the second experiment, it was possible to identify differentially expressed genes (DEGs) involved in more than 100 biological processes and molecular functions. DEGs related to ABA biosynthesis, redox system, cell wall mechanism, root development, including transcription factors (TFs) and protein kinases (Pks) in 'Sunki' mandarin tissue, were also identified. The systematic review allowed us to understand that epigenetic mechanisms confer drought tolerance and that they are involved in the "memory" of transgenerational stress in plants. For more severe water restriction periods, as foreseen in the coming years, the 'Sunki Maravilha' and 'Sunki Tropical' mandarins prove to be rootstock alternatives for the diversification of citrus

orchards in drought prone regions. Drought tolerance candidate genes in citrus can be used in future work to improve citrus cultivation. Epigenetic modifications induced drought tolerance in citrus plants and this was also confirmed in the systematic review in studies with other plants. These epigenetic marks can be exploited as epigenetic markers to select other tolerant citrus genotypes. Future efforts are needed to understand the mechanisms that confer the insensitivity of the 'Tahiti' acid lime to ABA.

Keywords: citrus, water deficit, Epigenetics, epigenetic mechanisms, MSAP, stress memory, RNA-seq, transcriptome.

INTRODUÇÃO

Os citros apresentam uma alta diversidade genética, o que inclui as laranjas (*Citrus sinensis*), tangerinas (*Citrus reticulata* e *Citrus deliciosa*), limões (*Citrus limon*), limas ácidas como o Tahiti (*Citrus latifolia*), Galego (*Citrus aurantiifolia*), lima da Pérsia (*Citrus limettioides*), pomelo (*Citrus paradisi*), cidra (*Citrus medica*), laranja-azeda (*Citrus aurantium*) e as toranjas (*Citrus grandis*) que se destacam como uma das principais fruteiras do mundo, com grande importância econômica, social e cultural (Fang e Roose, 1997; Mattos Junior et al., 2005).

Esse sistema econômico mundial é sustentado pela produção de laranja, e 1/3 dessa produção é para o processamento de suco concentrado, sendo o Brasil o principal produtor, seguido dos Estados Unidos da América (EUA). Além disso, a produção de limas e limões também tem se destacado, tendo como principais produtores Índia, México, Argentina, China e Brasil. As maiores produções de citros no Brasil estão concentradas nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Bahia e Sergipe, nessa ordem. Na safra de 2016/2017 a região do Nordeste foi responsável por 10,2% da produção nacional de laranja, sendo a Bahia o maior produtor de laranja participando de 6,3% da produção, ocupando grande destaque na produção nacional (CITRUSBR, 2017; FAO, 2019; IBGE, 2019).

Apesar dos índices de produção ambiciosos da citricultura brasileira, problemas ambientais climáticos têm colocado o setor em risco. Atualmente, tem-se observado um aumento gradativo na variabilidade climática, períodos mais quentes e estiagens mais prolongadas. Acredita-se que essa restrição aumente em intensidade, frequência e extensão geográfica como resultado das mudanças climáticas globais. Sendo assim, a seca tem se tornado o fator abiótico mais limitante da citricultura, pois as plantas cítricas necessitam de umidade no solo durante praticamente todo o ano (de 600 a 1300 mm anuais) para que tenham um bom crescimento e uma boa produção, mantendo assim excelentes níveis de produtividade (Vieira, 1991; Sentelhas et al., 2005; Cheeseman et al. 2007; Salekdeh et al. 2009; Kar et al. 2011; Gonçalves et al. 2019).

Sob déficit hídrico, as plantas cítricas desenvolvem mecanismos interligados responsivos a condição do estresse, tais como, moleculares, bioquímicos e fisiológicos. Para sobreviver a condição de limitação hídrica, estudos revelam que as plantas cítricas buscam desenvolver seu sistema radicular, para absorver água mais profundas do solo, bem como

ativam o fechamento dos estômatos, via sinalização do fito-hormônio ácido abscísico, reduzindo a transpiração, além de induzir o ajuste osmótico (Verslues et al, 2006; Gonçalves et al. 2016, 2019). Mecanismos bioquímicos também são ativados em plantas cítricas sob déficit hídrico, a exemplo da remoção das espécies reativas de oxigênios (ROS), que são acumuladas em condições de estresses podendo comprometer toda maquinaria celular. O sistema antioxidante enzimático em citros degradam moléculas como peroxidase e o superóxido, contribuindo ativamente no processo de tolerância à seca (Murtaza et al., 2016; Gonçalves et al. 2016).

Por outro lado, também existem bases moleculares envolvidas nas respostas dos citros em condições de seca. Alguns estudos utilizando EST (*Expressed Sequence Tag*), Microarray, RNA-seq já foram desenvolvidos para algumas plantas cítricas de importância, tais como: limão 'Cravo', tangerinas 'Clemenules' e 'Cleopatra', citrumelo Swingle, híbridos de Microcitrus, laranja doce enxertada em limão 'Cravo', estando estas submetidas a diferentes estresses, bióticos ou abióticos. Genes envolvidos nas respostas ao estresse osmótico, incluindo aquaporinas, desidrinas, sacarose sintase, enzimas antioxidantes, síntese de prolina, biossíntese do ABA, etileno, foram identificados nesses estudos e indicados como genes candidatos que apresentam expressão regulada por seca (Boscariol-Camargo et al., 2007; Gimeno et al., 2009; Zhang et al. 2016; Sousa et al., 2018; Gonçalves et al., 2019).

Outro fator molecular que tem ganhado destaque, como mecanismos de respostas a seca são as bases epigenéticas. Em plantas cítricas apenas Neves et al., (2017) avaliaram as marcas epigenéticas como indutora de tolerância a seca. Nesse estudo foi observado que os perfis de metilação do DNA de plantas cítricas são modulados conforme o fator ambiental, a seca.

As modificações epigenéticas, a exemplo da metilação do DNA, modificam o genoma da planta sem alterar a sequência de bases, levando-as a melhor suportarem as alterações do ambiente (Boyko et al. 2010; Herman et al. 2011; Crisp et al. 2016). A modificação epigenética do genoma via metilação da citosina é um processo dinâmico e possui alta sensibilidade a estresses ambientais, sejam bióticos ou abióticos (Tricker et al. 2013). Sendo assim, a metilação do DNA está diretamente envolvida na regulação da expressão gênica (Wang et al. 2010), podendo ser responsável pelas diferenças fenotípicas herdáveis em plantas, incluindo características agrônomicas de interesse, como a tolerância à seca (Neves et al. 2017; Garg et al. 2015; Gayacharan e Joel 2013).

Nesse contexto, os estudos das relações hídricas das plantas cítricas, bem como das interações de copa/porta-enxerto, causadas pelo déficit hídrico em seus processos moleculares, bioquímicos e fisiológicos são de fundamental importância para compreender seus diferentes mecanismos de tolerância, visando à adaptação das culturas cítricas ao clima presente e futuro, além disso, o uso dessas respostas/características na seleção de genótipos tolerantes à seca, contribuindo para o melhoramento genético da citricultura.

HIPÓTESE

É possível identificar genes de tolerância à seca a partir de perfis transcriptômicos e marcas epigenéticas na interação copa/porta-enxerto de citros para tolerância à seca, correlacionando-os com os parâmetros fisiológicos.

OBJETIVO GERAL

Caracterizar as respostas fisiológicas, moleculares e bioquímicas na interação copa/porta-enxerto de citros, identificando as estratégias de tolerância à seca.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o perfil fisiológico, bioquímico e epigenético das plantas cítricas *Citrus limonia* Osb. (Limoeiro cravo - RL), *Citrus sunki* (Tangerina Sunki Maravilha - SM) e a *Citrus latifolia* Tanaka (Limeira ácida Tahiti - TAL), nas seguintes combinações copa/porta enxerto, TAL/RL e TAL/SM, sob condições de déficits hídricos recorrentes.
- Traçar o perfil transcriptômico de plantas cítricas *Citrus sunki* (Tangerina Sunki Maravilha – SM; Tangerina Sunki Tropical - ST) como porta-enxerto, nas seguintes combinações copa/porta-enxerto, VO/SM e VO/ST, em condições de deficiência hídrica.
- Identificar se as bases epigenéticas estão envolvidas na “memória” do estresse em plantas e se a tolerância ao déficit hídrico está relacionada com os mecanismos epigenéticos, a partir de uma revisão sistemática.

REVISÃO DE LITERATURA

Aspectos gerais e panorama da citricultura

Os citros tem origem no sudeste da Ásia, mais precisamente no sudeste dos Himalaias, região considerada um hotspot de biodiversidade. É considerado um grupo monofilético e estabelece entre suas linhagens, relações bem definidas (Swingle e Reece 1967; Jacques et al. 2011; Wu et al. 2018). No entanto, sua filogenia e taxonomia ainda são conflitantes e controversas, isso devido às características complexas como a total compatibilidade sexual entre as espécies do gênero, ocorrência de apomixia, e a dificuldade de identificar espécies progenitoras puras ou selvagens, devido ao processo substancial de hibridização (Scora 1975; Barrett e Rhodes 1976; Curck et al. 2016).

O gênero *Citrus* engloba plantas que pertencem a outros gêneros afins com frutos que se assemelham ao limão e a laranja, como: *Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus*, *Eremocitrus* e *Clymenia*. Entretanto, os citros podem ser classificados em grupos de tangerineiras (*Citrus reticulata* Blanco), limeiras ácidas (*Citrus aurantiifolia* Christm.), limoeiros (*Citrus limon* L. Buen. F.), laranjeiras doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), pomelos (*Citrus máxima*), cidras (*Citrus medica*), toranjas (*Citrus paradisi*), entre outros (Pio et al. 2005; Liu et al. 2015).

Estima-se que o gênero *Citrus* sofreu dispersões transoceânicas, favorecidas pelos comércios e guerras entre os continentes, acarretando no desenvolvendo do seu cultivo em diversas regiões do mundo. Em 1500, a expedição liderada por Cristóvão Colombo introduziu mudas de plantas cítricas no continente Americano. No mesmo século, os portugueses junto com sua vinda ao Brasil, transportaram as primeiras mudas de laranja doce, que com as condições climáticas favoráveis no Brasil, se expandiu pelo país permitindo que os pomares tivessem boa produção, principalmente nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Bahia. Contudo, apenas em 1930 a cultura do citros passou a ser considerada comercialmente importante para a economia do País (Neves e Jank 2006; Neves et al. 2010; Azevedo 2013; Lima 2014).

Atualmente, este importante sistema agroeconômico no Brasil é sustentado pelos estados de São Paulo, Minas Gerais, Bahia e Sergipe, nessa ordem, sendo os maiores produtores de laranja doce e suco concentrado (IBGE, 2019). A fim de manter a liderança do

País, junto ao ranking mundial de produção de citros, o governo juntamente com o Ministério de Agricultura e Pecuária (MAPA) passaram a investir em infraestruturas, com instalações de campos experimentais e linha de crédito para os produtores brasileiros (MAPA, 2016). Neste cenário, surge na Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), localizada no município de Cruz das Almas – BA o Programa de Melhoramento Genético de Citrus, objetivando o melhoramento da citricultura, a partir da seleção genótipos resistentes à gomose de *Phytophthora* spp. e ao complexo do Vírus da Tristeza dos Citros – CTV (Citrus Tristeza Vírus), porta-enxertos mais tolerantes à seca, redução do período juvenil, aumento da longevidade dos pomares, entre outros.

Em índices de produtividade o continente Americano representou cerca de 42,2% da produção mundial de laranja doce no ano de 2017, liderada pelo Brasil com 17 ton, seguida pelos Estados Unidos da América com 4 ton. Na produção de limas e limões o Brasil manteve seu destaque na produção, com 1 ton no continente Americano representando 42,6% na produção mundial, ficando atrás apenas da China que produziu em 2017, 2 ton (Figura 1 A-B) (FAO, 2019).

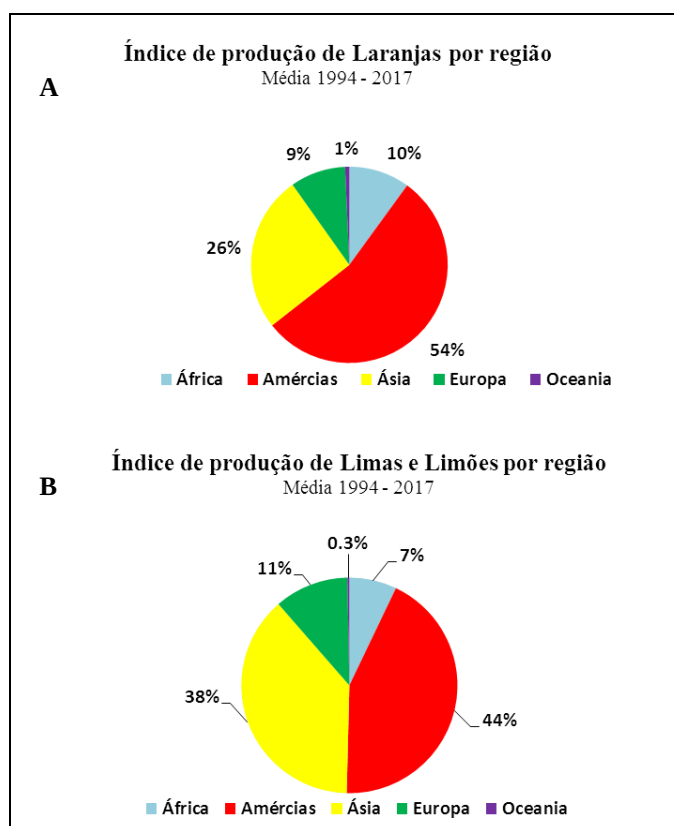


Figura 1: Produção mundial de Laranjas (A) e Limões e Limas (B) referente ao ano de 2017. Retirado e Adaptado de Food and Agriculture Organization of the United Nation (FAO), 2019.

Para que o Brasil mantenha-se na liderança mundial, diversos problemas que afetam a citricultura como, o controle de pragas e doenças, alterações nas mudanças climáticas, relacionadas à seca recorrente, bem como investigação dos potenciais genéticos dos poliploides, devem continuar sendo principais objetivos para a identificação de soluções para a cadeia produtiva citrícola (Soares – Filho 2003; Donadio et al. 2005; Allario et al. 2013).

Interação Copa / Porta – enxerto

Enxertia é uma técnica de propagação vegetativa, baseada na união de partes de uma planta em outra. A parte da planta enxertada é chamada de copa ou enxerto, já a planta que servirá como suporte e fornecimento do sistema radicular é denominada de porta-enxerto ou “cavalo”. A enxertia é uma técnica milenar que origina uma única planta, embora cada uma que a compõem, mantém suas características genótípicas (Hartmann et al. 2011; Xavier et al. 2013; Wendling et al. 2017).

Os porta-enxertos, geralmente são obtidos através de sementes e as copas são obtidos de ramos da planta-mãe, previamente selecionada, a qual se quer propagar. Os citros (*Citrus*), uva (*Vitis*), maçã (*Malus*) são exemplos de plantas que são propagadas comercialmente através da enxertia (Cunha Sobrinho et al. 2011; Melnyk e Meyerowitz, 2015; Neves et al. 2017; Da Silva et al. 2018).

No processo de interação copa / porta-enxertos (Figura 2), os porta-enxertos tem um impacto particularmente significativo na nutrição das plantas induzindo na síntese e na utilização de açúcares no crescimento; na tolerância e/ou resistência aos fatores abióticos e bióticos, como também na maturação e peso dos frutos da copa. Além disso, os porta-enxertos também podem modular características responsivas em níveis epigenéticos, sob estrito controle de genes relevantes (Pompeu, 2005; Zangh, 2011; Cantuarias- Avilés, 2011; Simpson, 2014; Liu, 2015; Neves et al. 2017). No entanto, Mota et al. (2009) afirmam que a influência dos porta-enxertos são diferenciadas conforme as condições edafoclimáticas e a cultivar copa, sobre ele enxertado. Nessa interação a copa é responsável pela absorção da luz do sol e do carbono do ar, para a fotossíntese, influencia no desenvolvimento das raízes dos porta-enxertos e também na tolerância/resistência do frio, seca, pragas e doenças, Contudo, suas influências no processo de interação ainda são poucas conhecidas ou consideravelmente menos visíveis (Pompeu, 2005).

As sinalizações bioquímicas também são mecanismos desenvolvidos na interação copa/porta-enxerto, que são caracterizados pelos estímulos dos hormônios, como, o ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (SA) e o ácido indolacético (AIA), que controlam os níveis de água na parte aérea e consequentemente, seu crescimento (Figura 2); o sistema antioxidante que degradam as espécies reativas de oxigênio (ROS) evitando o estresse oxidativo, desencadeando sinalizações para resposta às condições estressoras, como exemplo, a restrição hídrica (Santos et al. 2017; Zandalinas et al. 2017) .

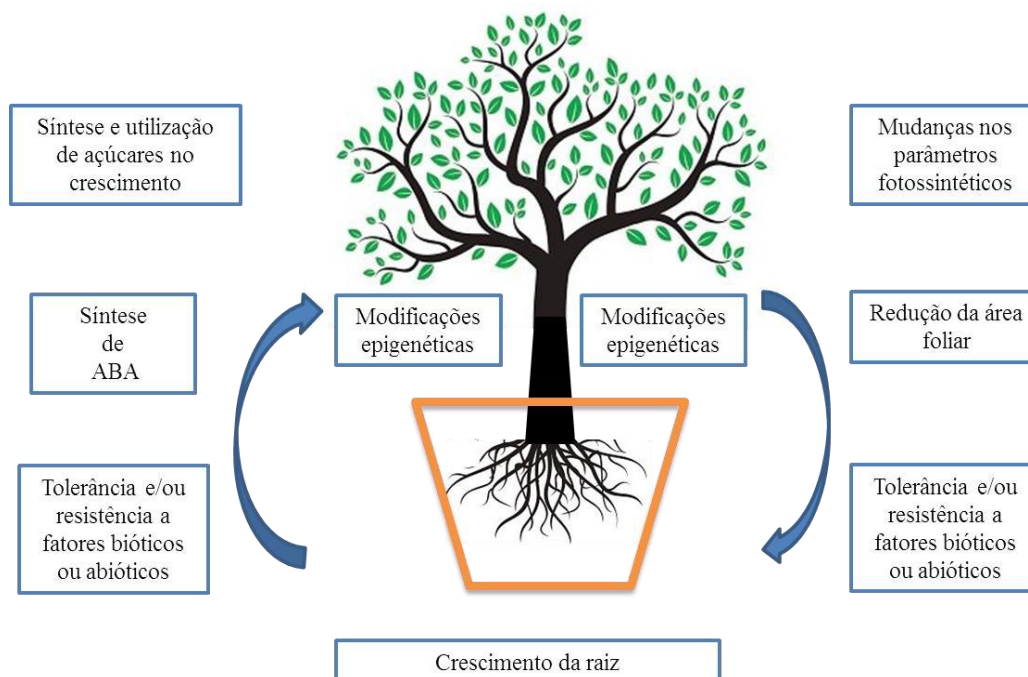


Figura 2: Representação de alguns mecanismos desenvolvidos no processo de interação de copa/porta-enxerto. Adaptado de Jones, 2012.

A expansão de um dos fatores mais limitantes da citricultura, a seca, tem sido alvo em pesquisas com citros (Koepke, 2013). Em estudos, como o de Santana-Vieira et al. (2016); Neves et al. (2017); Santos et al. (2017) foi comprovado a influência do porta-enxerto na tolerância ao déficit hídrico, além disso, demonstraram que a taxa de transpiração, taxas hormonais, a eficácia do sistema antioxidante, metilações no DNA são influenciadas geneticamente pelos porta-enxertos. Tzarfati et al. (2013), concluíram que o enxerto promove alterações no padrão de expressão de micro-RNAs (miRNAs), e que esta interferência pode estar relacionada com a redução do período juvenil em citros, favorecendo o florescimento e consequentemente, desenvolvimento dos frutos. Dessa forma,

identificar mecanismos e/ou características para facilitar a seleção de genótipos de porta-enxerto e copas mais tolerantes à seca, a partir da elucidação da influência de um para com o outro, tem sido um dos maiores desafios da citricultura brasileira.

Nos pomares brasileiros, dentre as variedades de copas mais cultivadas podemos citar, *Citrus sinensis* (L.) Osb. (Laranja Valência) e *Citrus latifolia* Tanaka (Limeira ácida Tahiti), ambas economicamente importantes. Vale ainda ressaltar que nos últimos anos os plantios comerciais da limeira ácida ‘Tahiti’, tanto para o mercado interno como externo, vem crescendo. Esse fato pode estar associado a sua resistência as principais doenças e pragas, como o cancro cítrico (*Xanthomonas*) e a tristeza do citros (Citrus tristeza vírus), que afetam a citricultura causando prejuízos aos pomares de laranjas doces. Além disso, a limeira ácida ‘Tahiti’ também tem ganhado mercado devido a sua forma, tamanho, brilho, sabor, valor nutritivo, segurança alimentar, coloração verde e turgescência (Figueiredo et al. 2002; Gayet e Salvo Filho, 2003; Bassan et al. 2016). A Limeira ácida ‘Tahiti’ é um aloploidio, considerada geneticamente complexa e faz parte do grupo de limas e limões cítricos, pouco explorados (Curck et al. 2016).

Na citricultura brasileira predomina o porta-enxerto Limoeiro Cravo (*Citrus limonia* Osbeck) (Gonçalves et al. 2016; Carvalho et al. 2019), que possui características importantes como potencial produtivo mesmo submetido à seca, tolerância a tristeza do citros e excelente compatibilidades com diversas variedades de copa (Pomeu, 2005). Tal fato é um risco à citricultura, devido à alta susceptibilidade dos campos de citros, às pragas e doenças, tornando-se um alerta para a necessidade de diversificação de variedades adaptadas às condições tropicais do Brasil.

A expansão da base genética dos porta-enxertos na citricultura tem sido explorada, com a utilização de porta-enxertos alternativos como tangerineiras ‘Cleópatra’ (*C. reshni* hort. ex Tanaka), ‘Sunki’ [*C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka] e citrumelo ‘Swingle’ (*C. paradisi* Macfaden x *Poncirus trifoliata* Rafinesque), afim de suportar os fatores bióticos e abióticos, embora essas variedades apresentem diferentes estratégias de sobrevivência em relação ao ‘Cravo’, a exemplo da tolerância à seca.

A tangerina ‘Sunki’ apresentam características desejáveis como resistência ao declínio dos citros, tolerância à tristeza, à xiloporose, a MSC, além de possuir elevado vigor e boa produtividade de frutos (Bassanezi et al. 2002; Pompeu, 2005), tornando-se uma variedade de interesse comercial, desde o início do século passado. É altamente utilizada em cruzamentos genéticos para obtenção de porta-enxertos (Schinor et al. 2011). Em pesquisas

desenvolvidas pela Embrapa Mandioca e Fruticultura foi selecionada nova variedades da tangerina ‘Sunki’, denominada de ‘Sunki Tropical’, que com destaque por apresentar boa resistência à gomose de *Phytophthora* e tolerância à seca similar a do ‘Cravo’ (Soares Filho et al. 2002; 2003).

Estudos com ‘Sunki Maravilha’, variedade também desenvolvida na Embrapa, revelaram diferentes padrões de captação de água no solo e perfis de proteína nas raízes quando submetida aos diferentes regimes hídricos. Quando sujeito ao déficit hídrico a ‘Sunki Maravilha’ utiliza menor quantidade de água do solo, atingindo uma maior resistência estomática, além disso, suas raízes e folhas apresentam um aumento progressivo no acúmulo de ABA. Suas estratégias de sobrevivência à seca são baseadas no equilíbrio da resposta entre a raiz e os tecidos aéreos devido à restrição hídrica (Neves et al. 2013; Oliveira et al. 2015).

Posteriormente, Santana-Vieira et al. (2016) demonstraram que a tangerina ‘Sunki Maravilha’ em condições de seca apresenta estratégia de tolerar a desidratação, a depender da severidade e duração do déficit hídrico. Essa estratégia é focada no desenvolvimento de mecanismos de proteção aos danos celulares, acúmulo de proteínas na manutenção da turgescência celular e expressão de enzimas antioxidantes para eliminação das espécies reativas de oxigênio (ROS), onde o objetivo é garantir a sobrevivência após o estresse. Os resultados afirmam que a estratégia de tolerância de ‘Sunki Maravilha’ à desidratação é focada na sobrevivência da planta, onde suas raízes e folhas passam a exibir maiores concentrações de ácido abscísico e ácido salicílico, que induz tolerância, e acúmulo de carboidratos, como trealose e rafinose, que são importantes sequestradores de espécies reativas de oxigênio, além de se recuperar das secas prolongadas com mais eficiência quando comparada a outro porta-enxerto.

A fim de selecionar novas combinações de porta-enxertos, Carvalho et al. (2019) apresentou a ‘Sunki Tropical’ como alternativa para diversificação genética dos pomares, por apresentar alto rendimento de frutos de qualidade média, sob condição de solo sequeiro. Além de apresentar resistência à podridão causada por *Phytophthora* spp. e boa compatibilidade com copas cítricas comerciais, a exemplo da laranjeira ‘Pera’ e Limeira Ácida ‘Tahiti’.

Respostas das plantas cítricas ao déficit hídrico

A água é um suprimento mundial limitante, que somado a constante demanda de alimentos, devido ao aumento da população mundial, provoca a superexploração dos recursos hídricos na agricultura, o que gera o aparecimento dos efeitos da seca de forma mais acentuados (Somerville e Briscoe, 2001; Chaves e Oliveira, 2003). Dessa forma, com a escassez dos recursos hídricos, a seca é a ameaça mais crítica à segurança alimentar mundial, o que foi no passado um fator agravante dos grandes períodos de fome. (Farooq et al. 2009).

Quando as plantas são sujeitas as condições que alteram a homeostase celular, considera-se que estão sob estresse, que podem ser de origem biótica e/ou abiótica (Mittler et al., 2004). Dentre os estresses abióticos, o que mais alerta os produtores é o déficit hídrico, que é considerado o estressor ambiental que mais limita a produtividade das culturas (Wang et al. 2016). É também o que mais possui estudos relacionados, pois além de objetivar compreender os mecanismos das plantas sob escassez de água, a restrição hídrica foi evolutivamente relevante para a conquista das plantas primitivas na terra, sendo determinante na distribuição dessas nos mais diversos tipos de ambientes (Verslues et al. 2006; Gonzalez et al. 2013). O déficit hídrico é medido em relação à sobrevivência da planta, produtividade agrícola, crescimento, assimilação de processos metabólicos primários – qualquer processo que tenha influência sobre o desenvolvimento da planta (Taiz, Zeeiger, 2013). A severidade, recorrência e a duração da seca são imprevisíveis, pois depende altamente da ocorrência, distribuição e precipitação das chuvas, dos processos evaporativos e a capacidade de armazenamento de água nos solos (Wery et al. 1994).

As plantas para sobreviverem as condições de déficit hídrico, passam por uma cascata de sinalizações metabólicas (Zingaretti et al. 2013; Gonçalves et al. 2016), respondendo a essas modificações através da redução do potencial hídrico (Ψ_w), fechamento dos estômatos, redução da área foliar (Temel et al. 2017); inibição da fotossíntese, abscisão foliar, queda das flores, e conseqüentemente, à redução na produção (Ahuja et al. 2010); crescimento radicular (Pinheiro et al. 2005); produção de espécies reativas de oxigênio(ROS), ajuste osmótico (Gonçalves et al. 2016); morte celular (Mittler 2002) ; fosforilação de proteínas (Zingaretti et al. 2013), entre outros (Figura3).

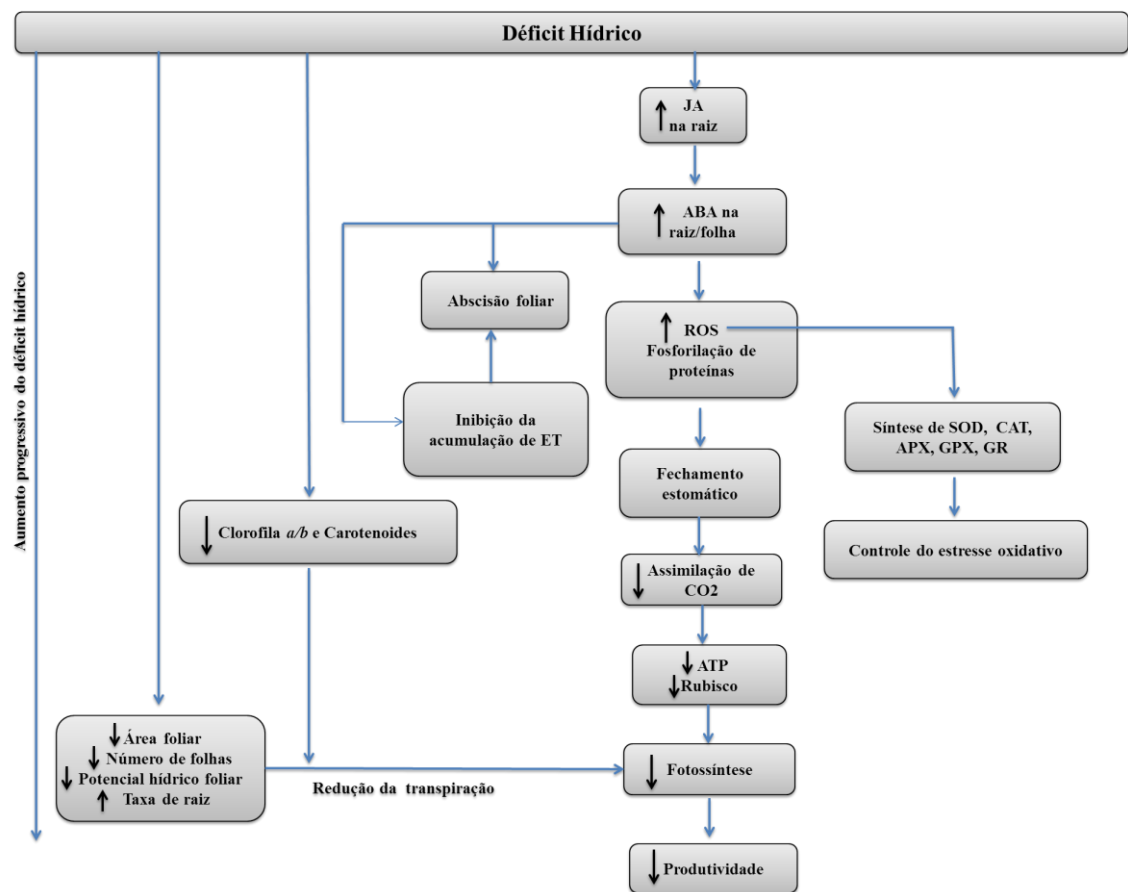


Figura 3: Mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares das plantas induzidos pelo déficit hídrico. Adaptado de Zingaretti et al. (2013)

Diversos estudos investigaram as respostas das plantas cítricas ao déficit hídrico, mostrando que a interação copa/porta-enxertos altera o desempenho fisiológico, bioquímico e epigenético sob condições restritivas através de variações na condutividade hidráulica das plantas, potencial hídrico foliar, condutância estomática, mecanismos antioxidantes, ajuste osmóticos, alterações nos perfis hormonais (Ácido Abscísico - ABA, Ácido Jasmônico - AJ, Ácido Indolacético - AIA, Ácido Salicílico – SA, Prolina), carboidratos e metilações no DNA. (Romero et al. 2006; Magalhães Filho et al. 2008; Rodríguez -Gamir et al, 2010; Pedroso et al., 2014; Gonçalves et al. 2016; Santana – Vieira et al. 2016; Neves et al. 2017). Adicionado a isto, as respostas dos citros à seca são altamente influenciadas pela duração, intensidade e recorrência do estresse (Mattos, 2007).

Rodríguez-Gamir et al.(2010) avaliaram genótipos de citros sob restrição hídrica e constataram nos seus estudos que o déficit afeta as trocas gasosas, condutância estomática e o potencial hídrico foliar. Além disso, concluíram que a tolerância à seca está relacionada ao

genótipo. Isto também foi observado por Pedroso et al. (2014) e Santana-Vieira et al (2016), especialmente quando retratam a importância do genótipo porta-enxerto.

No trabalho de Santana-Vieira et al (2016) foram analisados oito combinações de plantas cítricas submetidos ao estresse por seca e posterior reidratação. As combinações exibiram altas concentrações de Ácido Abscísico (ABA) e Ácido Salicílico (SA), que induzem tolerância à seca, e de carboidratos como Trealose e Rafinose. Essas alterações influenciaram nas estratégias de sobrevivência, de evitar ou tolerar a desidratação, adotada pelos porta-enxertos avaliados. Pedroso et al. (2014), avaliando plantas cítricas investigaram a capacidade dos porta-enxertos na modulação de carboidratos não estruturais em condições de restrição hídrica. Os resultados demonstraram que genótipos mais tolerantes aumentaram o crescimento radicular e mantiveram os índices de carboidratos, para eles a partição de carboidratos vegetais com déficit hídrico foi dependente do porta-enxerto. Afirmando que a modulação dos carboidratos em plantas cítricas atua como mecanismo de tolerar as restrições hídricas.

Estudos de Gonçalves et al. (2016) constataram que as condições restritivas de água levam as plantas cítricas a desenvolverem o ajuste osmótico, como mecanismo de tolerância à seca e estimulam o sistema antioxidativo enzimático, como linha de defesa contra as ROS, que tem produção reforçada sob déficit hídrico devido a inibição de assimilação de dióxido de carbono (CO₂), fechamento estomático e mudanças nas atividades fotossintéticas.

O primeiro conjunto de dados sobre epigenética em plantas cítricas foi descrito por Neves et al. (2017), que avaliou sob condições de seca recorrente combinações de copa/porta-enxerto de citros, concluíram que alterações epigenéticas em plantas cítricas, desencadeadas por restrição hídrica recorrente, acarretam a uma melhor tolerância à seca nas plantas cítricas.

Está bem estabelecido que, durante a seca, o genoma da planta passa por um estado de estresse e a planta tenta sobreviver expressando genes relacionados à tolerância à seca (Madlung e Comai, 2004). Argamasilla e Gómez-Cadenas (2014), avaliaram dois genótipos de citros submetidos ao estresse por seca e alagamento, e foi constatado alterações nos perfis de ácido jasmônico (AJ), ácido indolacético (AIA) e ABA durante o déficit hídrico, evidenciando que o genótipo possui características intrínsecas que podem influenciar na aclimação a condição de estresse, a partir da regulação desses hormônios.

Um elemento importante envolvido com a tolerância à seca em planta é o ácido Abscísico (ABA), pois ele atua regulando processos fisiológicos em plantas, desde a

abertura estomática, ao armazenamento de proteínas, que em condições de déficit hídrico promove determinada aclimação (Waterland et al. 2010; Sah et al. 2016).

A planta em condições de déficit hídrico sintetiza ABA, que inicia o controle da abertura estomática através da regulação de genes-chaves (Raghavendra et al. 2010). A limeira ácida ‘Tahiti’, genótipo de importância econômica que compõem a citricultura, tem comportamento pouco conhecido diante a síntese e percepção do ABA. Com base no estudo de Santana-Veira et al. (2016), observou-se maior demanda de ABA do porta- enxerto quando estava em combinação com Tahiti em condições de controle, quando comparado a outras combinações com porta-enxerto limão ‘Cravo’. A maior produção de ABA mostra a influência que esta copa exerce sobre o porta-enxerto, por ter exigido maior produção de ABA para controlar a transpiração da parte aérea e limitar o crescimento vigoroso de ‘Tahiti’, porém sem sucesso. Sendo assim, acredita-se que a limeira ácida ‘Tahiti’ é insensível as sinalizações do ABA, que influência na abertura dos estômatos.

Espécies Reativas de Oxigênio e Mecanismo antioxidativo

A restrição hídrica, assim como outros estresses abióticos e bióticos, perturba a homeostase das células vegetais (Mittler et al. 2002). O estresse por déficit hídrico nas plantas leva a mudanças severas na divisão celular, como também na redução do crescimento vegetativo. Por consequência do déficit hídrico, outros efeitos são detectados na planta, como mudanças nos níveis de expressão gênica, síntese de chaperonas e ativação de enzimas envolvidas na produção e remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Mahajan e Tuteja, 2005; Caverzan et al. 2016).

Aproximadamente há 2,7 bilhões de anos em nossa atmosfera, foi introduzido o oxigênio molecular (O_2), gerando organismos fotossintetizantes. Desde então as ROS têm sido consideradas, subprodutos indesejáveis dos organismos aeróbicos. O oxigênio singlete (1O_2), superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH^\cdot$), NADPH oxidases, aminas oxidases e peroxidases são fontes de ROS, que quando em excesso são reativos e tóxicos às plantas (Halliwell e Gutteridge, 1989; Mittler , 2002; Mittler et al. 2004).

Nos últimos anos foi sugerido que as ROS têm um duplo papel na biologia das plantas i) como subprodutos indesejáveis; ii) como moléculas benéficas sinalizadoras. A

partir de novos estudos foram identificados uma função benéfica das ROS como moléculas sinalizadoras envolvidas em processos como crescimento, ciclo celular, desenvolvimento, senescência, morte celular programada, condutância estomática, sinalização hormonal e regulação da expressão gênica, respostas ao estresse bióticas e abióticas (Kovtun et al. 2000; Mullineaux e Karpinski, S. 2002; Neill et al. 2002; Torres et al. 2002; Mittler et al. 2004; Slesak et al. , 2007; Inze et al. 2012; Caverzan et al. 2016).

Dependendo da concentração de ROS nas células vegetais, ela pode apresentar um papel prejudicial ou benéfico às plantas. Quando em condição homeostática celular, em condições de crescimento normais, a produção de ROS nas células vegetais é baixa. No entanto, sob condições de estresse, a exemplo do déficit hídrico, aumenta-se a produção de ROS que é considerado prejudicial à sobrevivência da planta (Polle, 2001; Mittler, 2002).

Os cloroplastos e as mitocôndrias são organelas altamente oxidantes com importantes atividades metabólicas, e são consideradas fontes de produção de ROS nas células vegetais. Nos cloroplastos a reação de Mehler e os pigmentos antenas, nos processos fotossintéticos são as fontes primárias para a produção de ROS. Quando em condição de seca, a planta tem essa produção aumentada nos cloroplastos, pois a condição de restrição hídrica limita a fixação de CO₂ implicando em maiores reações oxidativas nos tilacoídes. Já nas mitocôndrias, a principal fonte de ROS é na redução excessiva da cadeia de transportes de elétrons, também em condição de estresse. (Mittler et al. 2004; Moller et al. 2011). As espécies reativas de oxigênio (ROS) também são produzidas nas plantas, seja em condições normais ou estressantes, em outros compartimentos, intracelular e extracelular, como: peroxissomas, membrana plasmática, retículo endoplasmático, citosol, vacúolo, parede celular (Das et al. 2014).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) quando acumuladas podem danificar componentes celulares (Figura 4), comprometendo o funcionamento de proteínas, lipídios, açúcares e oligonucleotídeos, danificando o DNA mitocondrial e do cloroplastos (McDowell et al. 2008; Gill et al. 2010; Claeys et al. 2013; Chi et al. 2013; Das et al. 2014; Pisoschi e Pop et al. 2015).

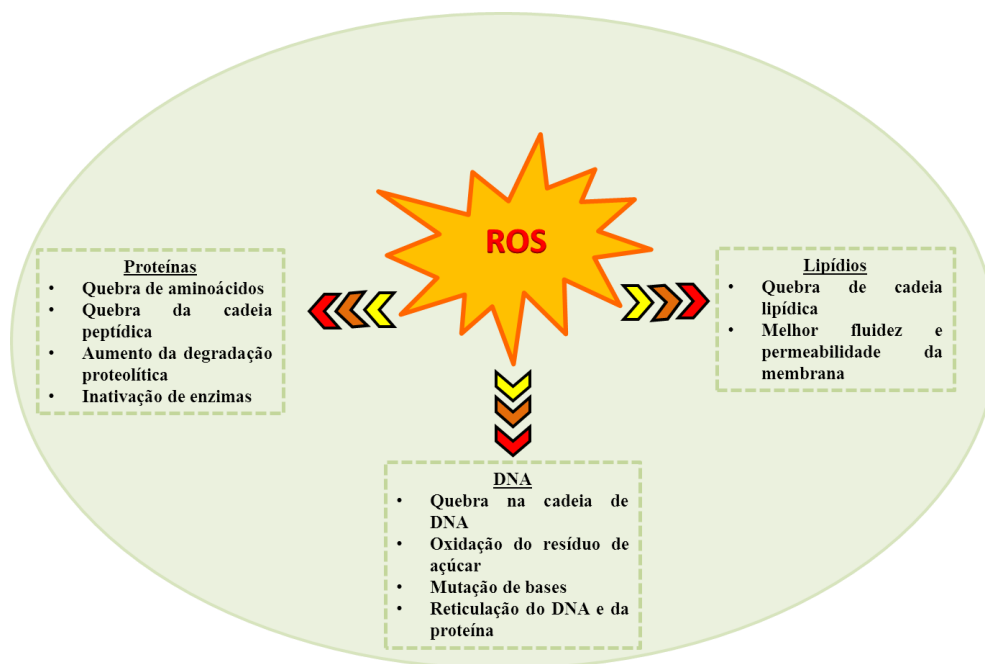


Figura 4: Componentes celulares que são alvos das Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), que quando acumuladas danifica-os, comprometendo o funcionamento. Adaptado de Das et al. 2014.

O equilíbrio entre a produção e eliminação de ROS das plantas é chamado de homeostase redox (Figura 5). Quando a produção de ROS é muito maior que a capacidade de eliminação pelas células, gera um desequilíbrio na homeostase redox celular, o resultado desse excesso de ROS, é conhecido como estresse oxidativo. Esse delicado equilíbrio entre a produção e eliminação de ROS é afetado por diferentes fatores estressores ambientais, a exemplo da seca (Mullineaux e Baker, 2010; Sharma, et al. 2012; Das et al. 2014).

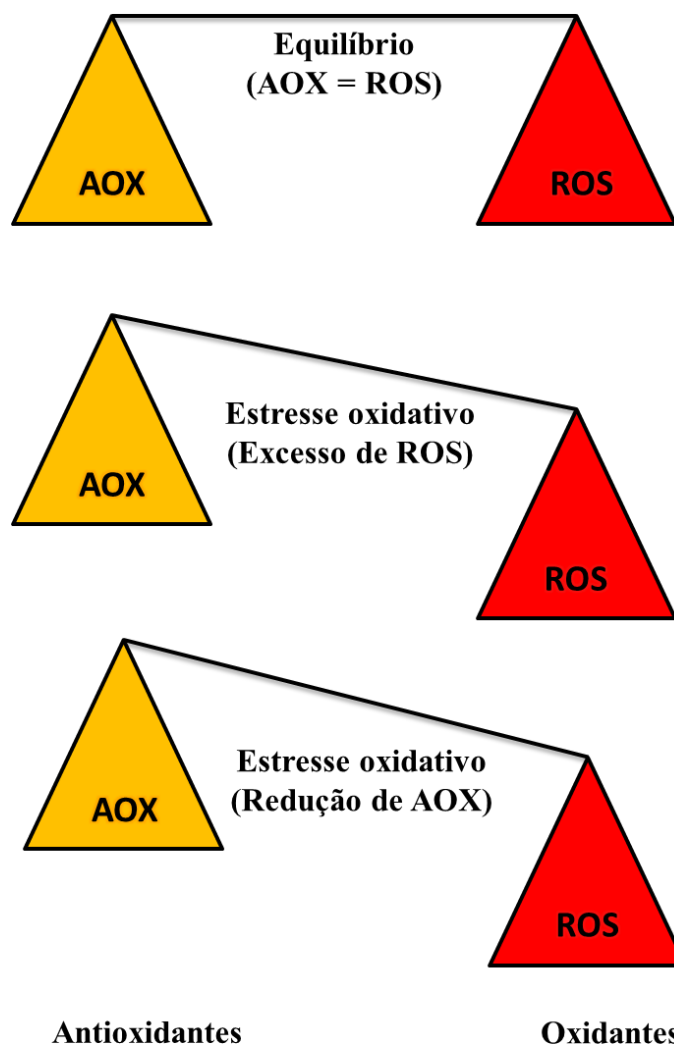


Figura 5: Desequilíbrio entre os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e antioxidantes (AOX) desencadeia o desequilíbrio na homeostase redox celular, consequentemente no estresse oxidativo. Em condições normais, as células são capazes de equilibrar a produção de antioxidantes e oxidantes, resultando em equilíbrio redox. Adaptado de Scandalios, 2005.

No entanto, as plantas possuem mecanismos antioxidantes que eliminam o excesso de ROS, a fim de evitar danos celulares. Este mecanismo de defesa consiste numa maquinaria antioxidante que ajuda a mitigar os danos induzidos pelo estresse oxidativo, consequência de um desequilíbrio da homeostase redox celular, oriundo de estresses bióticos e abióticos. O sistema de desintoxicação atua na oxidação e redução dos processos desencadeados pelas ROS, presente no apoplasto, e em outros compartimentos celulares. A homeostase redox em plantas durante condições estressantes é mantida por duas vias do mecanismo antioxidante: mecanismo antioxidante não enzimático e mecanismo antioxidante

enzimático (Scandalios, 2005; Pang e Wang, 2008; Sharma et al. 2012; Caverzan et al. 2016).

O sistema de defesa antioxidante não enzimático é composto de propriedades intrínsecas como: carotenoides, fenólicos, flavonoides, α -tocoferol, ácido ascórbico (AA), glutathiona reduzida (GSH) e aminoácidos, como a prolina. Esses compostos, além de atuarem na interrupção dos processos de oxidação, também desenvolvem um importante papel no crescimento das plantas, nos processos mitóticos, alongamento celular, senescência e morte celular (De Pinto e De Gara, 2004; Das et al. 2014).

A maquinaria celular antioxidante enzimática compreende um grupo de enzimas presentes em diferentes compartimentos celulares, a exemplo dos peroxissomos, mitocôndrias e cloroplastos. As principais enzimas que compõem o mecanismo antioxidante enzimático são: Dismutase do Superóxido (SOD), Peroxidase do Ascorbato (APX), Peroxidase do Guaiacol (GPX), e Catalase (CAT), representadas na figura 6 (Gill e Tuteja 2010; Miller et al. 2010; Gill et al. 2011; Das et al. 2014). A expressão dessas enzimas antioxidantes está intimamente relacionada com o aumento de tolerância das plantas contra fatores abióticos estressores (Caverzan et al. 2016).

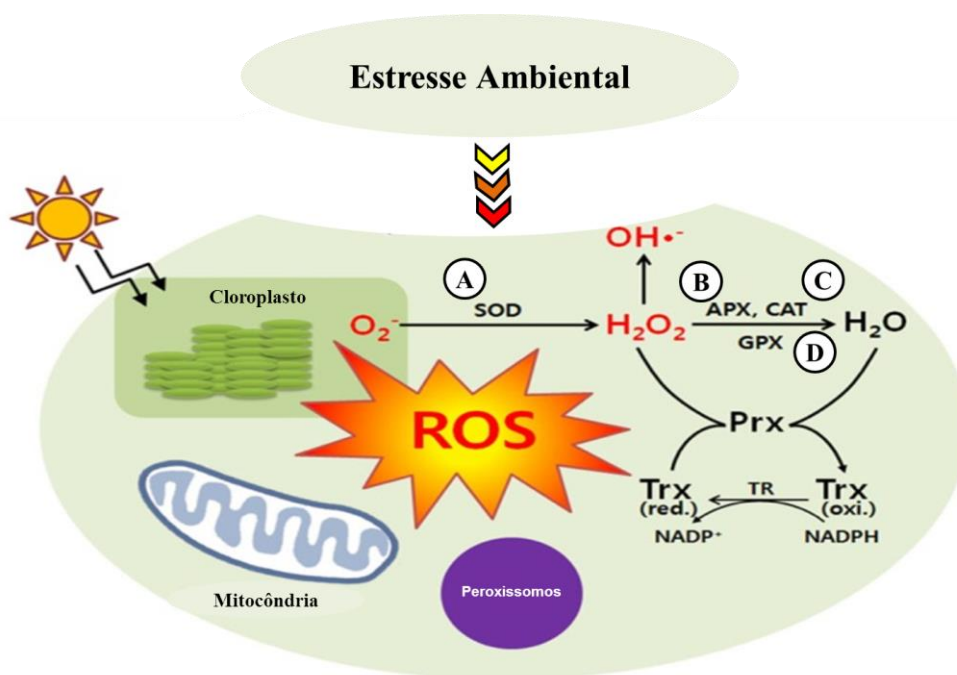


Figura 6: Mecanismos antioxidativo enzimáticos de eliminação de Espécies reativas de oxigênio (ROS): (A) Dismutase do superóxido (SOD); (B) Peroxidase do Ascorbato (APX); (C) Catalase (CAT) e (D) Peroxidase do Guaiacol (GPX). Plantas sob estresse (seca, salinidade, luminosidade, etc) podem gerar nas células espécies reativas de oxigênio (ROS). Inicialmente, uma ROS primária, que é o ânion

superóxido (O_2^-), pode ser formada pela redução de um elétron do oxigênio molecular. O ânion superóxido (O_2^-) é dismutado por dismutase do superóxido (SOD) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que é desintoxicado pela catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase do guaiacol (GPX). Adaptado de Chi et al. 2013.

A enzima dismutase do superóxido - SOD (EC1.15.1.1) pertence à família das metaloenzimas presentes em todos os organismos aeróbicos. É classificada em três grupos, de acordo com o tipo de metal co-fator utilizado. Em plantas, diferentes formas desta enzima são apresentadas nos seguintes compartimentos celulares: Citosol - Cu/Zn-SOD; cloroplasto - Cu/Zn e/ou Fe-SOD; mitocôndria - Mn-SOD. Ao contrário da maioria dos outros organismos, que possuem apenas um de cada tipo de SOD nos compartimentos celulares, as plantas possuem as diferentes formas de cada tipo, forte indicativo de que as plantas possuem defesas antioxidantes muito mais complexas, isso devido à regulação dos genes serem sinalizadas pelo desenvolvimento específico tecido – ambiente (Alscher et al. 2002; Resende et al. 2003; Menezes-Benavante et al. 2004; Scandalios, 2005; Das et al 2014; Caverzan et al. 2016).

Sob estresse ambiental, a SOD compõem a primeira linha de defesa do sistema antioxidativo enzimático, contra danos induzidos por ROS. É considerado o antioxidante mais eficaz, atuante nos compartimentos celulares propícios ao estresse oxidativo. A atividade da SOD ocorre através da redução do $O_2^{\bullet-}$, dismutando-o em O_2 e H_2O_2 . Isso elimina a possibilidade de formação de $OH^{\bullet}$ pela reação de Haber-Weiss, consequentemente gera um aumento do H_2O_2 . O radical $O_2^{\bullet-}$ é responsável pela peroxidação de lipídios, o que permite uma maior permeabilidade das membranas (Mittler, 2002; Martins e Mourato, 2008; Das et al. 2014).



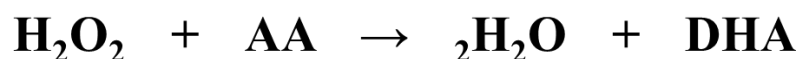
Por consequência da redução do radical $O_2^{\bullet-}$, ocorre um acúmulo de H_2O_2 que deve ser removido de modo que sua dismutação não tenha como produtos radicais mais reativos, como o $OH^{\bullet}$. Altos níveis de H_2O_2 nas plantas induzem o fechamento estomático e redução das taxas transpiratórias, esse radical também pode atravessar as membranas celulares, juntos com proteínas, a exemplo das aquoporinas, acarretando na peroxidação lipídica. (Perl-Treves e Perl, 2002; Resende et al. 2003). Além disso, o

acúmulo H_2O_2 atua como sinal para expressão dos genes da catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase do guaiacol (GPX), enzimas do mecanismo de defesa antioxidantes, que são necessárias para a oxidação e redução do H_2O_2 .

A catalase - CAT (EC1.11.1.6) é uma enzima tetramérica contendo heme, responsável por catalisar a dismutação de H_2O_2 em H_2O e O_2 , gerados em diferentes processos nas células como fotorrespiração e β -oxidação dos ácidos graxos que ocorre no peroxissomas, principal e mais estudado compartimento celular que tem atividade de CAT. Ela degrada o H_2O_2 , porém tem menor especificidade para os peróxidos orgânicos, é a única entre as enzimas antioxidantes que não necessita de um redutor (Mittler 2002; Das et al. 2014). Em condições de estresse, a exemplo da restrição hídrica a atividade de catalase é heterogênea, podendo aumentar, diminuir ou ficar inalterada sobre estresse hídrico (Brossa et al. 2015)

A enzima peroxidase do ascorbato - APX (EC1.1.1.1) é um componente integral do ciclo Ascorbato-Glutathione (ASC-GSH), diferente da CAT, que tem predominância de atividade para degradação do H_2O_2 no peroxissoma, a APX executa a mesma função no citosol, mitocôndria, peroxissomas e no cloroplasto, o que a torna um antioxidante mais eficiente em momentos de estresses da planta, devido sua ampla distribuição e também melhor afinidade pelo H_2O_2 , já que a enzima consegue atuar em baixas concentrações de H_2O_2 , na ordem dos μM , para efeitos de sinalização molecular (Mittler, 2002).

A peroxidase do ascorbato (APX) para dismutar o H_2O_2 necessita de agentes redutores celulares, ela apresenta alta especificidade pelo ascorbato (ou ácido ascórbico), que na reação a APX oxida o substrato redutor, o ascorbato, e reduz o H_2O_2 em H_2O e desidroascorbato (DHA) (Das et al., 2014).

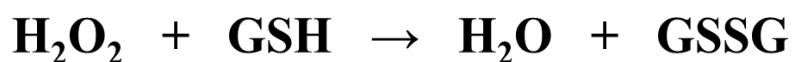


Nesta reação, como produto além da H_2O tem o desidroascorbato (DHA), que é reduzido a ascorbato pela ação da DHAR, que utiliza a glutathione reduzida (GSH) como doadora de elétrons. Esta reação origina glutathione no estado oxidado (GSSG), que é novamente reduzida a GSH pelo NADPH, numa reação catalisada pela enzima

glutathione redutase (GR), constituindo o importante ciclo glutathione-ascorbato (Asada e Takahashi, 1987; Gratão et al. 2005; Martins e Mourato, 2008).

A peroxidase do guaicol - GPX (EC1.11.1.7) é uma enzima que compõem o sistema antioxidativo enzimático, contém heme composto de monômeros de 40-50 kDa, que elimina o excesso de H_2O_2 , tanto durante o metabolismo normal quanto durante o estresse. Assim como a APX, a GPX também necessita de agentes redutores celulares, como os compostos aromáticos guaiacol e piragalol. No seu ciclo outro agente redutor também utilizado é a glutathione (GSH), encontrada em todos os compartimentos celulares, mantendo o equilíbrio redox juntamente com sua forma oxidada (GSSG) (Asada, 1999; Blokhina et al. 2003; Das et al. 2014).

A GPX é uma enzima que atua intracelularmente, em compartimentos como o citosol e vacúolo e extracelularmente na parede celular, sendo considerada enzima chave para a remoção do H_2O_2 . Para dismutação do H_2O_2 ela oxida os agentes redutores disponível, a exemplo da glutathione (GSH), que doa elétrons para o H_2O_2 , reduzindo-o. Tendo como produto da reação, H_2O e GSSG (Apel e Hirt, 2004; Das et al. 2014).



A GPX não atuam apenas como sequestrantes do H_2O_2 , mas tem também importante função na biossíntese de lignina, atuando na lignificação da parede celular, degradação do ácido indolacético (AIA), biossíntese do etileno e em defesas das plantas em condições de estresses abiótico ou bióticos. Além disso, os genes GPX também desempenham papéis importantes na sinalização do ABA (Zhai et al. 2013; Das et al. 2014; Caverzan et al. 2016).

Os níveis mais altos das atividades enzimáticas de SOD, CAT, APX e GPX estão intimamente relacionados com a tolerância das plantas a diversos fatores ambientais estressores. O equilíbrio entre a produção e a remoção de ROS, a partir das ações das enzimas antioxidantes nas células é crucial para a determinação do nível do estado estacionário de radicais superóxido e de peróxido de hidrogênio e também permitir a transmissão efetiva dos sinais redox. Isto sugere que, quando há um equilíbrio homeostático redox, a sinalização celular retém a aclimação e melhora a tolerância ao estresse (Dat et al. 2000; Apel e Hirt, 2004; Scandalios, 2005; Foyer et al. 2018).

O eficaz funcionamento do sistema antioxidativo enzimático garante as plantas proteção contra danos oxidativos. Em estudos, com plantas de arroz o aumento significativo da expressão de genes relacionados às enzimas antioxidantes foi relacionado com respostas a fatores estressantes (Rosa et al. 2010; Bonifacio et al. 2011; Ribeiro et al. 2012; Passaia et al., 2014; Caverzan et al. 2014, 2016). Em *Arabidopsis* foi observado o envolvimento de aproximadamente 152 genes na regulação do nível de ROS gerada pelo estresse oxidativo (Mittler, 2004). Estudos desenvolvidos com citros em condições de seca recorrentes foram observados tolerância em plantas que apresentaram altos níveis de atividade de SOD, CAT, APX e GPX (Neves et al. 2017).

Desse modo, o complexo sistema antioxidativo enzimático que evoluiu nas plantas é essencial para eliminar o excesso de ROS, mantendo o equilíbrio homeostático redox e consequentemente proteger as plantas do estresse oxidativo, oriundo dos estresses abióticos e/ou bióticos (Caverzan et al. 2016).

Mecanismos epigenéticos

O termo “epigenética” tem origem do grego, “epi” quer dizer “acima, adição, perto, a seguir”, epigenética significa “em adição à informação genética codificada no DNA”, sendo definida como modificações que ocorrem no genoma, na expressão gênica, que podem ser herdadas pelas próximas gerações, sem alterar a sequência do DNA. As mudanças epigenéticas têm efeitos significativos na biologia do organismo, definindo diferentes fenótipos, consequentemente, diferentes morfologias, comportamentos e desenvolvimento (Feinberg e Tycko, 2004; Gibbs, 2007; Skinner, 2007; Costa e Pacheco, 2013; Fanttapie, 2013).

Por muito tempo, apenas os genes eram considerados responsáveis por passar características biológicas de uma geração para outra, ou os únicos a determinarem as características fenotípicas de um organismo. Entretanto, esse conceito tem mudado, pois as alterações epigenéticas adquiridas ao longo da vida de um organismo, também determinam seu fenótipo no ambiente qual está inserido, essas características podem ser passadas para as gerações futuras (Fanttapie, 2013).

As alterações epigenéticas correspondem a uma série de modificações químicas no DNA e na cromatina, mais precisamente nas proteínas histonas, que modificam desde a ligação das histonas, condensação da cromatina até a metilação do DNA. Esses

padrões de alterações epigenéticas são regulados por enzimas como: DNA metiltransferases (DNMTs), histona acetiltransferases (HATs), histona desacetilases (HDACs), proteínas de ligação a grupos metis (MECP2) e histonas metiltransferases. Esta regulação atua na expressão gênica, tecido-específico e no silenciamento de elementos transponíveis, inibido sua replicação e transposição (Richards, 2006; Talbert e Henikoff, 2006; Weidman et al. 2007; Waggoner, 2007; Howell et al. 2009; Costa et al. 2013).

No processo de formação de um organismo, o seu desenvolvimento e sobrevivência depende da captação de sinais feito pelas células, que podem vir de dentro das próprias células, de células vizinhas, incluindo a célula-mãe, e do meio externo, o ambiente. Os sinais recebidos pelas células determinam a biologia do embrião e o organismo a se formar. Sinais como nutrientes, hormônios, calor, frio, sinais estressores, com seca, patógenos, terão reflexos na molécula de DNA sob a forma de modificações epigenéticas, no entanto, esses sinais precisam alcançar um compartimento crucial da célula, o núcleo. Assim com o DNA do núcleo modificado epigeneticamente, através desses sinais, vemos que um dos principais fatores dessas modificações é o ambiente (Fanttapie, 2013).

A regulação epigenética ocorre via, três mecanismos principais e distintos, mas altamente inter-relacionados: Metilação do DNA; Modificação das histonas e mecanismos baseados em RNA (Figura 7).

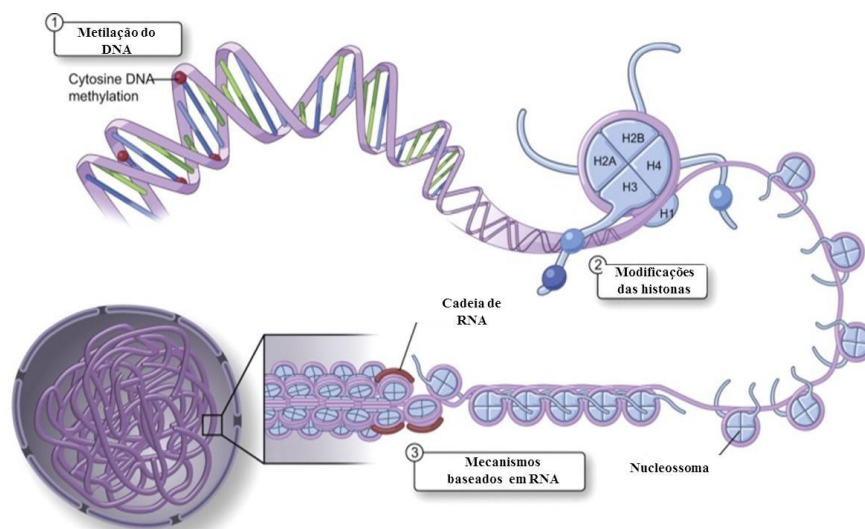


Figura 7: Esquematisação dos principais mecanismos epigenéticos. (1) - Metilação do DNA; (2) - Modificações das histonas; (3) - Mecanismos baseados em RNA. Retirado de Lovrečić et al. 2013.

A modificação das histonas é um importante mecanismo epigenético, as histonas são compostas por quatro grupos H2A, H2B, H3 e H4. Os dois primeiros grupos formam dímeros e os dois últimos um tetrâmero, e juntos compõem o nucleossomo. As histonas possuem regiões chamadas de N-terminal ou amino-terminal, onde se projetam do nucleossomo. Essas regiões N-terminal são suscetíveis as interações com outras proteínas e também com diversos grupos químicos. As caudas N-terminal sofrem modificações após o processo traducional, que definem o estado da transcrição, a partir do estado de condensação da cromatina e a expressão gênica (Lovrečić et al. 2013; Temel et al. 2017)

Os resíduos das caudas das histonas estão sujeitos a muitas modificações pós-traducionais, a exemplo acetilação, metilação, ubiquitinação, fosforilação, biotinilação, sumoilação e ASP-ribosilação que são caracterizados como mecanismos epigenéticos, ou seja, grupos químicos que ao serem adicionados, modificam a estrutura das histonas, sem alterá-las, com exceção da ubiquitinação, que envolve a adição de um domínio globular de 76 aminoácidos, e a SUMOilação, com adição de um domínio de aproximadamente 100 aminoácidos (Figura 8). Os mecanismos epigenéticos, nomeadamente acetilação de histonas, como também fosforilação e ubiquitinação de histonas aumentam a transcrição. Já a biotinilação e a sumoilação de histonas reprimem a expressão gênica (Nathan et al. 2006; Camporeale et al. 2007; Sridhar et al. 2007; Zhang et al. 2007; Chinnusamy et al 2009; Lovrečić et al. 2013; Zenter e Henikoff, 2013).

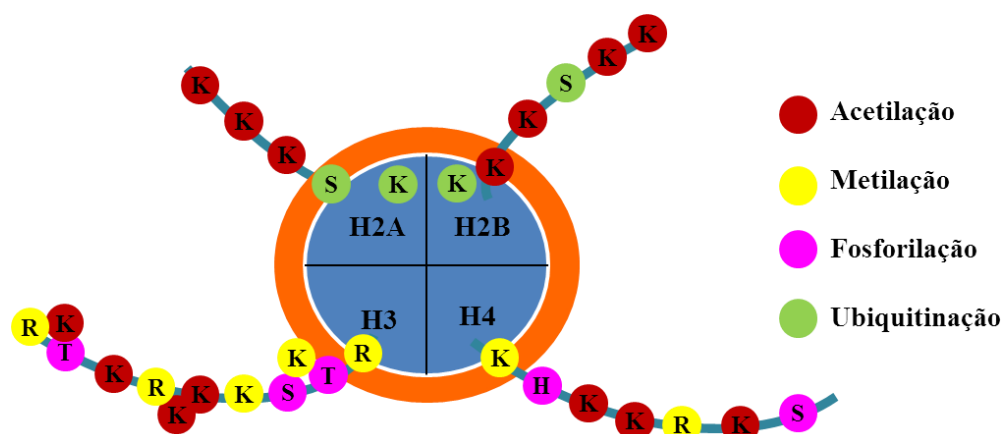


Figura 8: Resíduos dos aminoácidos arginina (R), histidina (H), lisina (K), serina (S) e treonina (T) nas histonas H2A, H2B, H3 e H4, modificados por acetilação (vermelho), metilação (amarelo), fosforilação

(rosa) e ubiquitinação (verde), representam um dos mecanismos epigenéticos baseados em modificações das histonas. Adaptado de Niciura et al. 2014

As regulações epigenéticas em níveis de histonas são processos dinâmicos e reversíveis, interpostos por dois grupos enzimáticos que podem remover ou ligar os grupos químicos. A acetilação em resíduos de lisina da região N-terminal é um dos mecanismos epigenéticos mais estudados em plantas em nível de modificações das histonas. O grupo químico acetil é anexado por enzimas acetil transferases (HATs) e podem ser removidos pela enzima desacetilase (HDACs). As histonas acetiladas tem carga positiva neutralizada nos resíduos de lisina, enfraquecendo as interações eletrostáticas entre as histonas e o fosfato da molécula do DNA, favorecendo a descompactação da cromatina e consequente expressão gênica (Santos – Rosa et al. 2009; Lovrečić et al., 2013; Niciura et al. 2014).

Outro importante mecanismo epigenético e pouco estudado em plantas é o mecanismo baseado em RNA, mais precisamente pela classe de RNA não codificante (ncRNA), que são moléculas de RNAs funcionais, transcritos do DNA, mas não são traduzidos em proteínas. Um estudo recente inferiu que as informações necessárias para entender as complexidades dos diferentes organismos, está além dos genes codificadores de proteínas, também está na classe de ncRNA (Niciura et al. 2014). Epigeneticamente os ncRNA regulam a expressão gênica em nível transcricional e pós-transcricional, precisamente, eles regulam a deposição das marcas epigenéticas, sendo estes os principais grupos de ncRNAs: miRNA (Micro RNA), siRNA (RNA de interferência curto), piRNA (RNA que interage com proteínas piwi) e lncRNA (RNA não codificador longo) (Mattick et al. 2009).

A metilação do DNA genômico é um dos principais mecanismos epigenéticos, é um tipo de modificação química que pode ser herdável, estabelecida e/ou removida sem alterar a sequência do DNA, sendo considerada a principal marca do silenciamento gênico epigenético. A metilação do DNA está envolvida na expressão gênica, silenciamento de transposon, sinal epigenético como memória, regulação da maioria dos genes *imprinted*, recombinação do DNA, desenvolvimento de respostas aos estresses abióticos e biótico, em plantas (Feil e Berger, 2007; Paulsen et al. 2008; Lei et al. 2010; Mirouze et al. 2012; Niciura et al. 2014; Liu et al. 2015).

A metilação do DNA ocorre por meio da adição de um grupamento metil (-CH₃), através de ligação covalente na posição 5 do anel pirimídico de uma citosina,

alterando-a em 5-metil-citosina (5mC) (Figura 9). O grupo metil na célula é produto da S-adenosil-L- metionina, sintetizada a partir de metionina, colina, co-fatores como as vitaminas e hormônios. Essa adição do grupo metil é mediada pela ação das enzimas metiltransferases (DNMTs) que catalisam a transferência de um grupamento metil da SAM para a citosina, no DNA (Tost, 2010; Niciura et al. 2014).

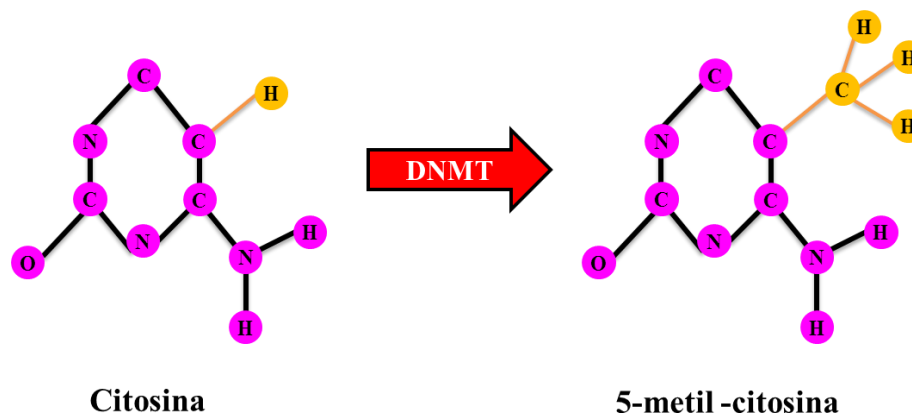


Figura 9: Mecanismo epigenético: Metilação do DNA. Adição do grupamento metil (-CH₃) na citosina, na posição 5 do anel pirimídico, pela enzima metiltransferase de DNA. Transformando a citosina em 5-metil-citosina. Adaptado de Niciura et al. 2014.

Nas plantas, a metilação do DNA pode ocorrer na citosina em simetria (CG ou CHG) e em contextos não simétricos (CHH), onde H pode ser A, C ou T, podendo ocorrer também em regiões repetitivas dos genomas. As metilações do DNA em plantas são controladas por três classes enzimáticas, tais como: a enzima Metiltransferase 1 do DNA (MET1), ortoga a DNMT1, que mantém a metilação; a enzima Cromometilases (CMT), responsável pela transferência do grupo metila e a enzima Metiltransferase (DRM2) que é guiada por sequências curtas específicas de RNAs, que catalisam a metilação de novo, em todos os contextos(Zhang et al. 2006; Gayacharan e Joel 2013; González et al 2013; Liu et al 2015; Wang et al. 2015).

No entanto, as plantas podem perder a metilação da citosina passivamente, no processo de replicação do DNA em ausência da atividade da enzima MET1 ou por meio da ação das enzimas Desmetilases de DNA (DMLs), que atua removendo a citosina metilada, que é substituída por uma citosina não metilada (Hsieh et al 2009; Wu et al 2010; Liu et al. 2015).

A modificação epigenética do genoma via metilação da citosina é um processo dinâmico e possui alta sensibilidade a estresses ambientais, sejam bióticos ou abióticos, essas alterações epigenéticas em plantas, contribui para o desenvolvimento de melhores respostas aos estresses. Por serem sesséis, as plantas estão constantemente expostas as mudanças do ambiente, com as alterações de temperatura, intensidade de luz, indisponibilidade de nutrientes e água, além de tensões desafiadas por vários patógenos. Essas alterações ambientais estimulam nas plantas respostas em níveis epigenéticos, a exemplo da metilação do DNA que modifica seu genoma sem alterar a sequência de bases, levando-as a melhor suportarem as alterações do ambiente (Boyko et al. 2011; Herman et al. 2011; Tricker et al. 2013; Kinoshita, 2014; Crisp et al. 2016).

Com as grandes mudanças ambientais, a seca tem se tornado um dos principais fatores que afeta diretamente as principais *commodity* agrícolas do Brasil, a exemplo da citricultura (Bray et al. 2000; Nakashima et al. 2014). A restrição hídrica altera os níveis de expressão gênica, induzidos pela metilação do DNA que provoca mudanças fenotípicas nas plantas, sem alterar seu genoma. Isto sugere que a metilação do DNA influencia nas respostas e adaptações das plantas sob déficit hídrico (Wang et al. 2011; Tang et al. 2014; Wang et al. 2016).

Estudos realizados com videiras sob restrição hídrica moderada, mostraram que a seca hipermetilou o DNA das plantas analisadas, o que indica a hipermetilação como uma resposta genômica em relação ao estresse abiótico. Além disso, conclui-se que a hipermetilação, produto dos altos níveis de metilação do DNA das videiras, foi dirigida por RNA e controladas por siRNA, moléculas que compõem outro mecanismos epigenético e exercem importantes papéis biológicos na plasticidade ambiental das plantas (Marfil et al. 2019). Também em estudo com arroz, realizado por Zheng et al. (2017), em condição de seca foram observado que um grupo de genes responsivos à seca, tiveram seus perfis de metilação do DNA afetados pela condição ambiental. Os resultados sugerem que os mecanismos epigenéticos desempenham funções fundamentais na adaptação do arroz às condições adversas do ambiente e que as alterações epigenéticas são consideradas mecanismos reguladores e vitais na adaptação e evolução das plantas em diferentes ambientes.

O primeiro conjunto de dados abordando mecanismos epigenéticos, como respostas à seca recorrente em citros foi descrito por Neves et al. (2017). Nos genótipos de citros analisados, observaram mudanças nos perfis de metilação do DNA, indicando

que a seca recorrente induz hipermetilação e hipometilação no DNA, atribuindo as plantas diferentes estratégias de sobrevivência em condição de restrição hídrica. Além disso, concluiu-se que uma melhor tolerância das plantas cítricas à seca recorrente, está relacionado ao desenvolvimento de “memória”, mecanismo que podem torna as plantas cítricas mais tolerantes as futuras e recorrentes exposições de déficit hídrico. Essa “memória” induz a adição ou remoção das marcas epigenéticas no genoma das plantas, coferindo respostas futuras mais eficientes, como resultado de um primeiro período de déficit.

Como as plantas são frequentemente submetidas a perturbações ambientais, a exemplo da seca, que podem ocorrer repetidamente é importante que sejam capazes de “lembrar” das perturbações passadas e usar essa “memória” para se adaptar e tolerar as condições adversas que possam vir sucessivamente. O sistema de “memória” em plantas ainda é pouco estudado, no entanto, o mais conhecido é o priming, que atua como defesa da planta controlando suas respostas aos fatores bióticos e abióticos, como o estresse hídrico. O sistema de “memória” da planta prepara sua defesa para uma resposta mais rápida e robusta ao estressor, em condição de recorrência do estresse, quando se comparada a primeira exposição. No entanto, a relação dos mecanismos epigenéticos com o sistema de “memória” em planta ainda é pouco elucidado (Bruce et al. 2007; Ding et al. 2012; Pastor et al. 2013; Kinoshita, 2014).

Estratégias para o uso do RNA-Seq de qualidade

Com os métodos de extração do RNA e sequenciamento do DNA complementar, possibilitou o estudo abrangente do transcriptoma, conjunto completo de transcritos, incluindo grandes e pequenos RNAs, novos transcritos de genes não-annotados, isoformas de splicing e transcrições de fusão gênica, presentes em um tecido durante um determinado momento. Sendo assim, o estudo dos transcritos é dinâmico e representa a expressão gênica de um momento determinado do organismo, sob influências ambientais, interrelações entre espécies e a fisiologia do organismo (Martin e Wang, 2011; Cronn et al. 2012; Conesa et al. 2016).

Os avanços tecnológicos de sequenciamento e algoritmos de montagem permitiram a reconstrução de todo o transcriptoma por sequenciamento profundo de RNA (RNA-seq), a partir do advento do sequenciamento intenso e paralelo, o NGS

(*Next Generation Sequencing*). Essas tecnologias permitem isolar o RNA ou DNA genômico de qualquer planta ou órgão vegetal, a exemplo de raízes, folhas e flores, podendo obter uma representação completa dos nucleotídeos contidos na amostra de interesse, independente da sua complexidade. Com isto, o estudo dos transcritos junto à quantificação da expressão gênica tem sido objetivos centrais na área da Biologia Molecular, desde o entendimento do RNA, como intermediário entre o genoma e o proteoma (Cronn et al. 2012; Conesa et al. 2016).

O RNA-seq atinge uma profunda resolução em nível de par de bases e uma faixa muito mais alta de níveis de expressão, quando comparado a outras tecnologias, a exemplo dos microarranjos. Além disso, o RNA-seq ao ser analisado permite que sua montagem seja feita, a partir de um genoma de referência ou de anotação de novo. (Martin e Wang, 2011; Oszlak e Milos, 2011; Wang et al. 2009).

Para obtenção e análise do transcriptoma o desenho experimental deve está delimitado a partir da hipótese levantada, deve-se também determinar o número de réplicas biológicas e técnicas; a profundidade do sequenciamento; o tipo de sequenciamento, *single-end* ou *paired-end*, priorizando a estratégia de alto rendimento do sequenciamento; a quantidade de reads a ser gerada; estratégia de montagem e tipos de análises (Figura 10) (Martin e Wang, 2011; Cronn et al. 2012; Haas et al. 2013; Conesa et al. 2016).

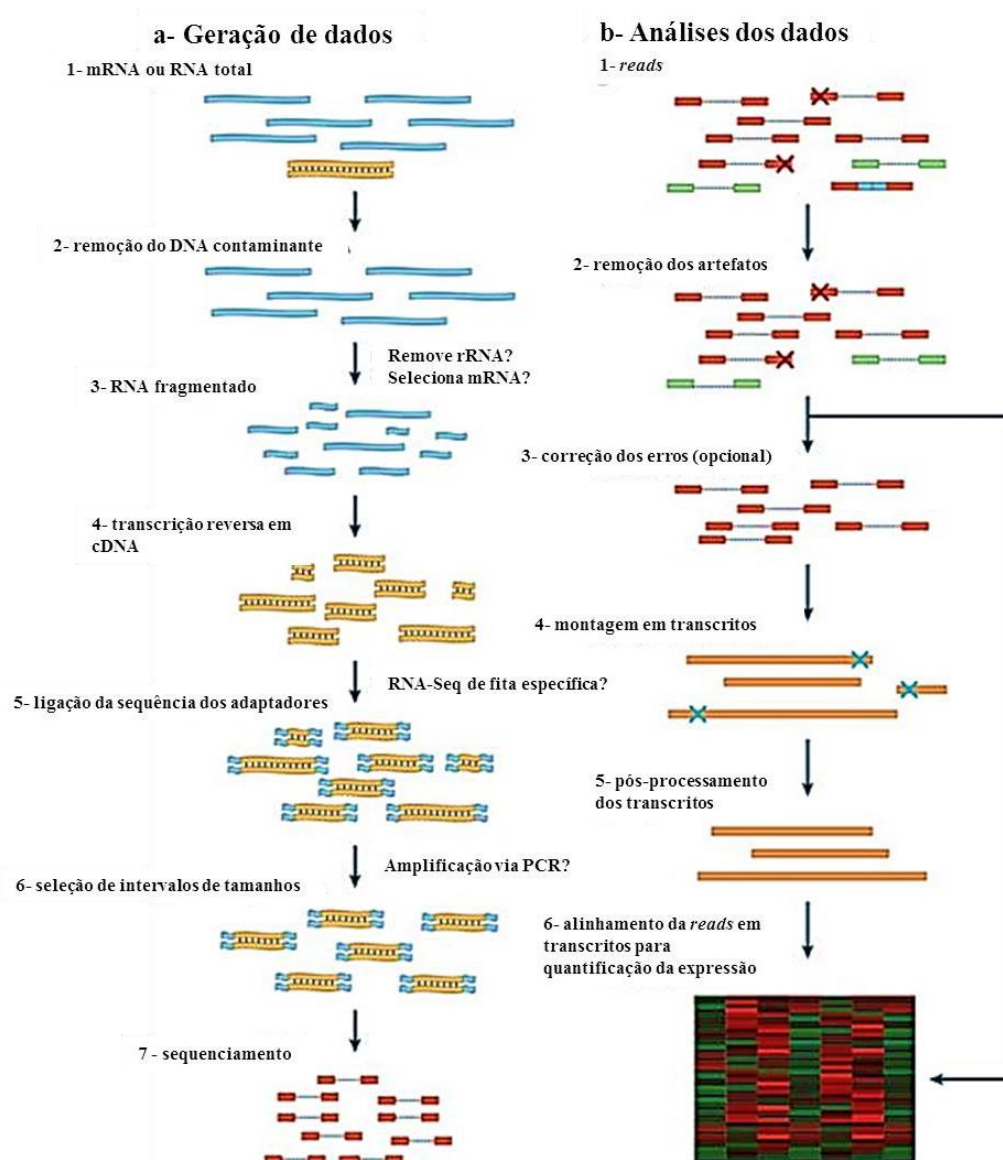


Figura 10: Representação da geração de dados (a) e análises de dados (b) de um experimento típico de RNA – Seq. A1 – extração do RNA; a2 – remoção de contaminação por DNA e seleção do mRNA; a3 – fragmentação do RNA; a4 – obtenção do cDNA a partir do mRNA; a5 – ligação dos adaptadores; a6 – seleção do tamanho dos fragmentos e amplificação; a7 – sequenciamento. B1 – obtenção das reads após sequenciamento; b2 – remoção de reads e artefactos de baixa qualidade (adaptadores e DNA contaminantes); b3 – correção de erros de sequenciamento; b4 – montagem das reads em transcritos; b5 – transcritos são processados para montagem do transcriptoma; b6 – análise de expressão diferencial, a partir do número de reads que se alinham a cada transcrição (heat map). Adaptado de Martin e Wang, 2011.

A biblioteca de DNA complementar (cDNA) é gerada através da ação da enzima transcriptase reversa, que transforma a informação dos transcritos de RNA em cDNA. Sendo assim, adiciona-se primers adaptadores, para dar início ao sequenciamento. A

profundidade de cobertura do sequenciamento garante a qualidade da montagem do transcriptoma, pois assegura o número de vezes que cada base foi sequenciada, garantindo um número representativo de read para os genes expressos (Anders e Huber, 2010; Cronn et al. 2012;).

A montagem do transcriptoma alvo baseada em referência, também conhecida com ‘*ab initio*’ é construída quando o genoma de referência para o transcriptoma está disponível. Pode ser feita com recursos computacionais básicos, sendo que, os vestígios de contaminação da amostra biológica não são considerados grandes problemas para esta estratégia, pois se espera que essas contaminações não se alinhem com o genoma de referência. É uma estratégia de montagem altamente sensível, o que permite a identificação de novas transcrições que não estão presentes na anotação atual. O transcriptoma também pode ser montado utilizando outra estratégia, a ‘*de novo*’. Esse tipo de montagem não faz uso de um genoma de referência, no entanto, utiliza-se da sobreposição dos *reads* para encontrar a sobreposição das leituras e então realizar a montagem dos *contigs*, essa montagem pode ser feita a partir do uso de softwares como Rnnotator , Multiple-k, Trans-ABysSS e o Trinity (Martin et al. 2010; Robertson et al. 2010; Surget-Groba e Montoya-Burgos, 2010; Martin e Wang, 2011; Zhao et al. 2011; O’Neil e Emrich, 2013).

Os índices de expressão gênica são obtidos a partir dos cálculos do FPKM (*Fragments Per Kilobase of Exon Model Per Million Mapped Reads*) e RPKM (*Reads Per Kilobase of Exon Model Per Million Reads*), que significa a quantidade de transcritos na amostra, para determinado gene. Esses valores são comparados em determinadas análises, a exemplo da expressão diferencial dos genes, e a partir dessa comparação são determinados valores de expressão, que classificam os transcritos para montagem dos *contigs* e posterior obtenção dos gráficos de expressão diferencial, a exemplo o *heat map* e até mesmo obtenção de redes de interação proteína-proteína (Trapnell et al. 2012; Xiao et al. 2013).

Respostas obtidas através de análise de RNA-seq contribui para caracterização de uma determinada espécie, conhecimento do seu comportamento diante de fatores estressores, como os fatores abióticos e bióticos, ampliação dos bancos de dados, relações filogenéticas, identificação de genes de interesse, além de conhecer e caracteriza a estrutura e funcionamento do próprio código genético.

Atualmente a transcriptômica, progressivamente, está sendo aplicada ao estudo da biologia molecular dos citros, abrangendo os mecanismos de mudança de cor dos frutos, desenvolvimento de frutos, desenvolvimento de floração, resistência a doenças, influência do porta-enxerto no crescimento da copa e tolerância à seca (Xu et al. 2009; Zhang et al. 2011; Yu et al. 2012; Liu et al., 2017; Gonçalves et al. 2019).

Estudos com plantas cítricas descrito por Liu et al. (2017), analisaram o transcriptoma a partir do RNA-Seq, para avaliar os efeitos de diferentes porta-enxertos na expressão gênica das folhas da copa. Foi observado redes de regulação gênica e identificado os principais genes através dos quais os porta-enxertos induzem diferenças de crescimento no enxerto.

Outros trabalhos envolvendo genótipos de citros sob condição de seca, relataram que uma fração funcionalmente diversa do transcriptoma de laranja doce, com funções no metabolismo, respostas celulares e regulação foram diferencialmente regulada pelo estresse hídrico e que a tolerância à seca induzida pelo porta-enxerto, inclui a ativação transcricional de genes relacionados à parede celular, metabolismo de carboidratos e antioxidantes solúveis, respostas de estresse biótico e abiótico, fatores de transcrição, proteínas quinases, sinalização do ácido abscísico (ABA), baixa regulação de genes envolvido no metabolismo do amido, reações de luz e sinalização de etileno (Gonçalves et al., 2019).

Estudos desenvolvidos por De Souza et al. (2017), analisaram as resposta à seca de combinações de copa/porta- enxerto de plantas cítricas poliploides, no entanto, esse estudo baseou-se em dados de RNA-Seq depositados em bancos de dados, desenvolvendo uma abordagem interativa para identificar proteínas envolvidas na resposta à seca. Os resultados permitiram identificar proteínas específicas, candidatas a posteriores análises funcionais de genes de citros relacionados à resposta à seca, além de serem bons marcadores de mecanismos fisiológicos desenvolvidos pelas plantas, sob condição de seca.

CAPÍTULO 1

Citrus scion and rootstock combinations show changes in DNA methylation profiles and ABA insensitivity under recurrent drought conditions

Artigo submetido à Scientia Horticulturae

Title:**Citrus scion and rootstock combinations show changes in DNA methylation profiles and ABA insensitivity under recurrent drought conditions****Authors and Affiliations**

Ariana S. Santos^a; Diana M. Neves^a; Dayse Drielly S. Santana-Vieira^b; Lucas Aragão H. Almeida^a; Márcio Gilberto C. Costa^a Walter S. Soares Filho^c; Carlos P. Pirovani^a, Mauricio Antônio Coelho Filho^c; Cláudia F. Ferreira^{c*} e Abelmon S. Gesteira^{c*}

^aDepartamento de Biologia, Centro de Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus – Bahia. ^bDepartamento de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Oeste do Pará, Juruti – Pará. ^cEmbrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas – Bahia.

***CORRESPONDENCE:**

Dr. Abelmon da Silva Gesteira

abelmon.gesteira@embrapa.br

Dra. Cláudia Fortes Ferreira

Claudia.ferreira@embrapa.br

Abstract: The physiological, biochemical and molecular responses of scion/rootstock interactions in citrus plants under recurrent drought conditions are still poorly understood. The responses of ‘Tahiti acid lime’ (TAL) scions grafted to two rootstocks that have different survival strategies under drought conditions ‘Rangpur lime’ (RL) and ‘Sunki Maravilha mandarin’ (SM) were investigated during three periods of water deficit, WD1, WD2 and WD3 (plants exposed to one, two and three periods of water deficit, respectively). In the three drought periods, the Ψ_L was maintained at an average of -2.0 MPa. The TAL / SM and TAL / RL combinations showed, due to water deficit, hypermethylation and hypomethylation in the DNA methylation profiles respectively. The physiological parameters analyzed showed very close values for the TAL / SM and TAL / RL combinations, which indicates that the TAL do not respond to rootstock behavior with different response patterns to water deficit. Other findings suggest that the TAL scion is unresponsive to the plant hormone ABA, which plays a crucial role in plant responses to water deficit. The results show that the severity and recurrence of drought stress conditions reduced excessive ROS production through the action of the antioxidant enzymes, which confirms the different defense mechanisms to drought stress conditions that can be used by these scion/rootstock combinations. We concluded that the epigenetic marks they are involved in the responses to water deficit, conferring tolerance the citrus plants. In addition, in a recurrent water restriction condition the physiological parameters and the antioxidant system are genotype dependent responsive. The present study addresses epigenetic modifications, physiological and biochemical mechanisms associated with drought tolerance in citrus plants.

Keywords: abscisic acid; antioxidant enzymes; citrus; DNA methylation; epigenetics; water deficit.

1. Introduction

Plants are often exposed to different types of biotic and abiotic stresses and modulate their physiological and developmental mechanisms through changes in gene expression to survive (Gayacharam et al. 2013; Wang et al. 2015).

With the recent environmental changes, drought has become one of the main factors that directly affects citriculture (Kramer and Boyer 1995; Bray et al. 2000; Nakashima et al. 2014) and is considered the most limiting abiotic factor for plant development, with the ability to affect multiple functions. To tolerate dehydration, plants control their physiological, antioxidant and, particularly, molecular mechanisms (Cheeseman et al. 2007; Kar et al. 2011).

Water deficits trigger responses in the plant at an epigenetic level, such as DNA methylation, which modifies its genome without changing the sequence of bases, allowing plants to better withstand environmental changes (Boyko et al. 2010; Herman et al. 2011; Crisp et al. 2016). Epigenetic modification of the genome through cytosine methylation is a dynamic process and has high sensitivity to environmental stresses, whether biotic or abiotic (Tricker et al. 2013).

The first study investigating DNA methylation in citrus plants was proposed by Neves et al. (2017), where they found that exposures to recurrent drought alter epigenetic profiles in citrus and this may be responsible for the phenotypic differences inherited by these plants, including agronomic characteristics of interest, such as drought tolerance. However, this study analyzed only a few genotypes and further studies are needed to broaden the genetic base of the genus *Citrus*.

Recurrent exposure to water deficit conditions allows plants to respond faster to new stress conditions through epigenetic changes of gene expression compared to plants that were not previously exposed. This shows the existence of memory or genetic imprint and this can be a memory associated with gene expression or a transgenerational memory and, consequently, a form of adaptation to environmental changes (Bruce et al. 2007; Ding et al. 2012; Springer et al. 2013; Kinoshita et al. 2014).

Genetic “memory” was recently reported in a study on recurrent drought stress conditions in citrus plants (Neves et al. 2017) and other studies show that water deficits in citrus plants triggers a cascade of signaling events that changes physiological factors such as: reduction of leaf water potential (Ψ_L), gas exchange, hydraulic resistance, leaf water ratio, stomatal closure; biochemical factors such as: production of reactive oxygen species (ROS), membranes and proteins destabilization, and synthesis of Absciscic Acid (ABA) and other hormones as well as molecular mechanisms and the expression of genes that improve the performance of these plants under adverse environmental conditions as a consequence of the water deficit (Pedroso et al. 2014; Oliveira et al. 2015; Gonçalves et al. 2016; Santana-Vieira et al. 2016; Neves et al. 2017).

Citrus plants use different approaches for soil water extraction and show different molecular profiles under drought conditions, thus indicating different survival strategies to drought, such as tolerating and avoiding dehydration, which can be adaptive alternatives for water deficit environments. Citrus plants like *Citrus limonia* Osb. (‘Rangpur’ lime – RL) and *Citrus sunki* (‘Sunki Maravilha’ mandarin – SM) used as rootstock under water-restricted conditions adopt the strategy of avoiding and tolerating dehydration, respectively (Neves et al. 2013; 2017; Santana-Vieira et al. (2016), however, need to understand their physiological, biochemical and molecular behaviors in recurrent drought conditions.

A strategy to improve performance under drought conditions in citriculture is to identify mechanisms and/or characteristics that enable the selection of drought-tolerant genotypes of scions and rootstocks. Therefore, this study aimed at assessing *Citrus limonia* Osb. ('Rangpur' lime – RL), *Citrus sunki* ('Sunki Maravilha' mandarin – SM) and *Citrus latifolia* Tanaka (Tahiti acid lime – TAL) in the scion/rootstock combinations TAL/RL and TAL/SM under three recurrent water deficit conditions.

2. Material and Methods

2.1 Plant material and imposition of water deficit

The rootstocks *Citrus limonia* Osb. (Rangpur lime) and *Citrus sunki* (Sunki Maravilha mandarin) and the commercial scion of great economic potential *Citrus latifolia* Tanaka (Tahiti acid lime) were used for having different survival strategies to drought conditions (tolerance and avoidance).

The seeds of the rootstocks were obtained from the citrus seed bank of Embrapa Mandioca e Fruticultura and the scions from its greenhouse. The grafting was performed when the rootstocks were six months old using two scion/rootstock combinations: Tahiti acid lime/Rangpur lime (TAL/RL) and Tahiti acid lime/Sunki Maravilha mandarin (TAL/SM).

After the grafting, the plants were transferred to 45 L pots containing Plantmax®, washed sand and clay (2:1:1) and covered with anti-aphid screen at Embrapa Mandioca e Fruticultura with daily irrigation. NPK and micronutrient fertilizers were applied every two weeks until the plants were two years old.

The plants of each scion/rootstock combination (TAL/RL and TAL/SM) were exposed to three periods of water deficit: WD1 - plants exposed to a water restriction period; WD2 - plants exposed to two periods of water restriction; and WD3 plants exposed to three periods of water restriction. The plants took an average of 40 days to get into water deficit. For the imposition of a new period of water deficit was expected 60 days, because after the end of each period of water deficit, the plants were irrigated to field capacity, pruned periodically and fertilized to start a new cycle of water deficit. The drought was characterized with gradual loss of water content in the soil and was monitored daily using a Time-Domain Reflectometry (TDR) probe. When the leaf water potential in the plants reached values below -2.0 MPa, leaf and root samples were collected for biochemical and epigenetic analyses.

The three experimental groups were installed in a completely randomized design, no factorial scheme 3 x 3.

Plants of the same scion/rootstock combination were analyzed in Santana-Vieira et al., (2016). This study compared the combinations after exposure to three periods of water deficit to investigate the physiological, metabolic and molecular performance of the genotypes exposed to recurrent water deficit stress conditions. According to the experimental design presented by Neves et al. (2017), the data presented in our study refers only to the third period of recurrent water deficit of the experiment (Figure 1).

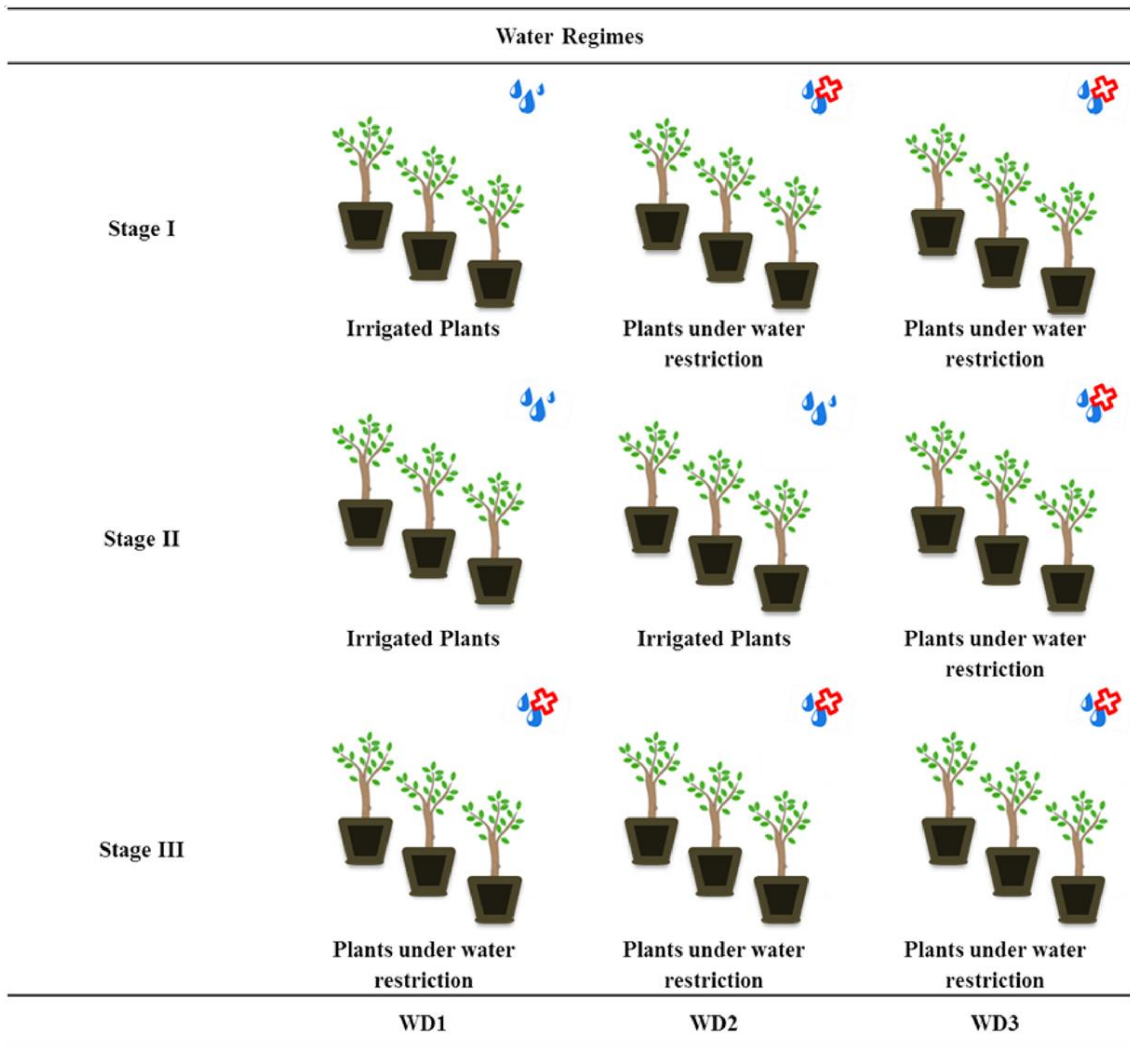


Figure 1: WD1 represents the plants exposed to water deficit conditions only in the third stage of the experiment, that is, exposed for the first time to the deficit; WD2 represents plants exposed to water deficit conditions in the first and third stages of the experiment, thus with exposure to two periods of water deficit, with the irrigation interval; and WD3 represents plants exposed to water deficit conditions in all three stages of the experiment, thus corresponding to the recurrent water deficit conditions. Adapted from Neves et al. 2017.

2.2 Soil water potential (Ψ_S)

The Ψ_S was measured daily with a TDR probe, determined as a function of soil moisture in relation to the water potential values obtained by pressure plate extractors and a WP4 Dewpoint psychrometer (PotentiaMeter dew-point mirror psychrometer, Decagon Devices Inc).

2.3 Leaf water potential (Ψ_L)

The Ψ_L was determined using the second or third fully expanded and mature leaf of the apex of the plant, in the morning period (Ψ_{am}). The leaves were detached with the aid of a blade and the Ψ_L was measured using a Scholander pressure chamber (M670, PMS Instrument Co, Albany, OR, USA). The Ψ_L was only measured after the decrease of the photosynthetic parameters. Leaves and roots of plants under severe drought were harvested when they reached $\Psi_L \leq -2.0$ MPa. The Ψ_L was also measured for the plants after 48 h of rehydration and collection of leaves and roots.

2.4 Relative water content (RWC)

The relative water content was determined on the day of harvest according to the technique described by Barrs and Weatherley (1962). Three leaves were selected from each plant and ten leaf discs were made with the help of a metal cylinder with a diameter of 2 cm. Leaf discs were weighed to determine the fresh weight (FW) and then stored in a 50 mL tube containing distilled water at 4 °C for 24 hours and weighed on the following day to determine the turgid weight (TW). To determine the dry weight (DW), the leaf discs were dried at 70 °C and subsequently weighed. Therefore, the RWC was calculated according to the following formula:

$$RWC (\%) = \frac{FW - DW}{TW - DW} * 100$$

2.5 Photosynthetic parameters

Mature leaves of each plant were selected and marked at the beginning of the experiment to measure the following photosynthetic parameters: Photosynthetic Rate (A), Stomatal Conductance (gs) and Transpiration Rate (E). These gas exchange measurements were performed using a portable LCpro-SD IRGA (ADC biotechnological Limited, UK) with Photosynthetically Active Radiation (PAR) from 1000 μmol of photon flux density $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ between 8:00 a.m. and 11:00 a.m.

2.6 Activity of antioxidant enzymes

Pools of leaves and lyophilized roots were macerated in liquid nitrogen. About 40 mg of each macerated plant tissue were homogenized in 800 μL of extraction buffer specific for each enzyme assay. Subsequently, the samples were briefly vortexed and sonicated on ice until the tissue was completely ruptured using an ultrasonic probe sonicator (Ultrasonic processor Gex 130, 130 W) at an amplitude of 70% with 8 pulses of 5 s with intervals of 10 s. The samples were centrifuged at 14,000 GX for 10 min at 4 °C and the supernatant was collected and transferred to a new microtube, which composed the crude extract. The readings of the enzymatic activities were performed in quadruplicates using the SpectraMax Paradigm (Multi-Mode Detection Platform). The activities of the enzymes Superoxide Dismutase (SOD - EC1.15.1.1), Ascorbate Peroxidase (APX - EC1.1.11.1) and Guaiacol Peroxidase (GPX - EC1.11.1.7) were determined as described in Havir e Mchale (1987); Giannopolitis e Ries (1977); Calberg e Mannervik (1985), respectively.

2.7 Methylation-sensitive Amplification Polymorphism (MSAP)

DNA methylation analysis using MSAP followed the protocols suggested by Reyna-López et al. (1997) and Xiong et al. (1999). Briefly, leaf DNA obtained for the different treatments was extracted according to the protocol of Murray and Thompson (1980) and two aliquots of 100 ng of DNA were digested with the following restriction enzyme combinations: EcoRI/HpaII and EcoRI/MspI (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Anza).

The resulting DNA fragments were ligated and then amplified by PCR, which completed the pre-amplification step. Then, a new PCR amplification was performed by selective amplification using the pre-amplified product. All primers used in the amplification step were obtained according to Tang et al. (2014). To confirm the reproducibility of the amplified fragments, these were visualized on a 3% agarose gel and then analyzed in the Fragment Analyzer (System Advanced Analytical) using the DNF 477 0500- 1-1500pb kit (Applied Biosystems).

2.8 Stomatal analyses

For the anatomical study, ten expanded leaves of young plants, standing under field conditions, from the citrus germplasm bank of Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas - BA, of the genotypes *Citrus latifolia* Tanaka (Tahiti acid lime) and *Citrus sinensis* (L.) Osb., Valencia' Orange were selected. The leaves were collected in the first period of the morning and immersed in solutions of Absciscic acid - ABA (Sigma approx 99% - 250 mg) at concentrations of 15 ng/mL and 240 ng/mL, as these concentrations were the most significant on previous studies, and for different times: 5 minutes (T5), 10 minutes (T10), 20 minutes (T20) and 40 minutes (T40). Leaves immersed only in deionized water were used as controls (CT; Supplementary Fig. S1). After the treatments, the leaves were fixed in micrometric slides (slides 26 x 76 mm) using transparent glue and photomicrographed using a Leica ICC50 - HD optical microscope coupled with an Olympus E330 digital camera. The images were used to count and measure the open and closed stomata by area, and ten leaves of each genotype were analyzed for the different times and ABA concentrations, registering six sections of each leaf. The scales of the figures were obtained using the projection of a micrometric slide photographed and digitized.

2.9 Statistical analysis

The experiment was conducted in a completely randomized design (ICD), with three replicates for each water deficit treatment group (WD1, WD2 and WD3). To analyze the data, the following physiological parameters were measured: Relative water content (RWC), leaf water potential (Ψ_L), soil water potential (Ψ_S) and photosynthetic parameters.

The Analysis of Variance (ANOVA) and Tukey's tests were applied using the Sisvar software with p-value < 0.05. This analysis was also conducted for the measurements of the activity of antioxidant enzymes.

For stomatal analyses (open and closed) and characterization, the Image.J software was used and the data was analyzed using the GGEBiplotGUI package in the R software (Core Development Team, 2016) by the Analysis of Variance (ANOVA) test and the F-test with p-value < 0.05.

The MSAP profiles were analyzed using the MSAP v.3.2.2.3 R package according to Pérez-Figueroa (2013). The software combines information based on the four possible patterns of presence-absence matrices obtained with combinations of EcoRI/HpaII and EcoRI/MspI primers, leading to a new punctuation matrix according to the methylation state. The type of epigenetic modification detected with the MSAP loci was categorized according to Schulz et al. (2013) and the frequency test was evaluated using the Heatmap79 R package (Core Development Team, 2016). A dendrogram showing the methylation profile of the treatments was generated using the devtools and ggplot R packages.

3. RESULTS

3.1 Morphological and Physiological Parameters

The plants reached a severe water deficit on different days and showed that severe water deficit was successfully imposed, with soil water potential (Ψ_S) values around -1.0 MPa (Figure 2A) and leaf water potential (Ψ_L) $\leq$ -2.0 MPa at the end of each treatment (WD1, WD2 and WD3; Figure 2B).

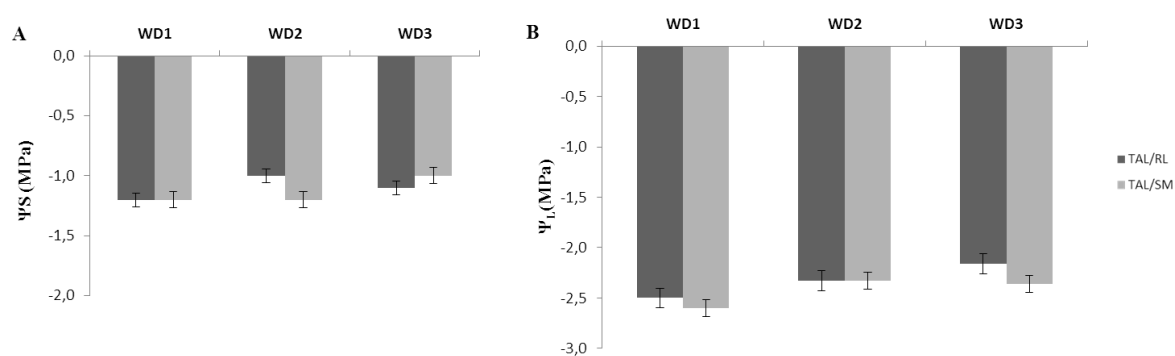


Figure 2: Soil water potential (Ψ_S - MPa) - (A); Leaf water potential (Ψ_L - MPa) - (B); under conditions of recurrent water deficit WD1, WD2 and WD3 (Figure 1). Tahiti/Rangpur lime (TAL/RL) - black bar and Tahiti/Sunki Maravilha (TAL/SM) - gray bar, with leaf water potential (Ψ_L) $\geq$ 2.0 MPa.

The values of 57-70% obtained for the relative water content RWC (Figure 3) are characteristic of a physiological response to water deficits and confirm the visual observations of wilt of the TAL/RL and TAL/SM combinations.

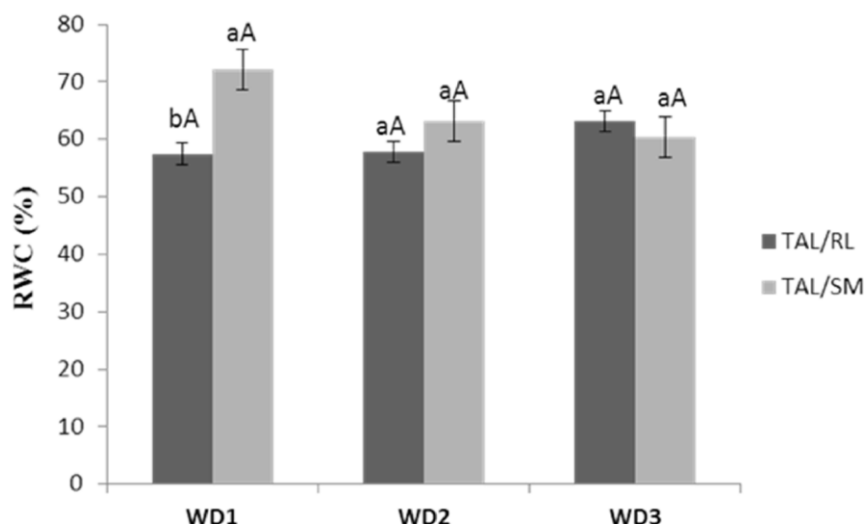


Figure 3: Leaf relative water content (RWC) in recurrent water deficit conditions WD1, WD2 and WD3 (Figure 1). Tahiti/Rangpur lime (TAL/RL) - black bar and Tahiti/Sunki Maravilha (TAL/SM) - gray bar. The data represent the mean with Standard Error of $n = 3$. Lowercase letters represent the relationship between the combinations. Uppercase letters indicate the relationship between the treatments of the combinations, Tukey's test ($p < 0.05$).

Using these parameters to detect the water deficit condition, leaf and root plant samples of the scion/rootstock combinations TAL/RL and TAL/SM were collected in the different treatments.

The physiological parameters (Figure 4 A-C), photosynthetic rate (A), stomatal conductance (gs) and transpiration rate (E) were not significantly different for the two scion/rootstock combinations (TAL/RL and TAL/SM) and for the different water deficit treatments (WD1, WD2, WD3).

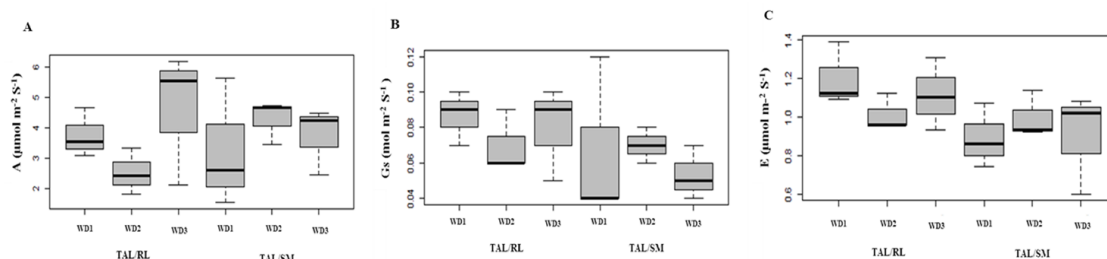


Figure 4: Box Plot for the (A) photosynthetic rate - A, (B) stomatal conductance - gs and (C) transpiration rate - E in Tahiti/Rangpur lime (TAL/RL) and Tahiti/Sunki Maravilha (TAL/SM) leaves exposed to the recurrent water deficit WD1, WD2 e WD3 (Figure 1). The Box plots represent the mean with Standard Deviation of $n = 3$ by the Tukey's test ($p < 0.05$). ExpDes.pt R Package.

3.2 Activity of antioxidant enzymes

The action of the APX, SOD and GPX enzymes showed variations in leaves and roots (Figure 5 A-B) in the scion/rootstock combinations TAL/RL and TAL/SM exposed to different water regimes (WD1, WD2 and WD3).

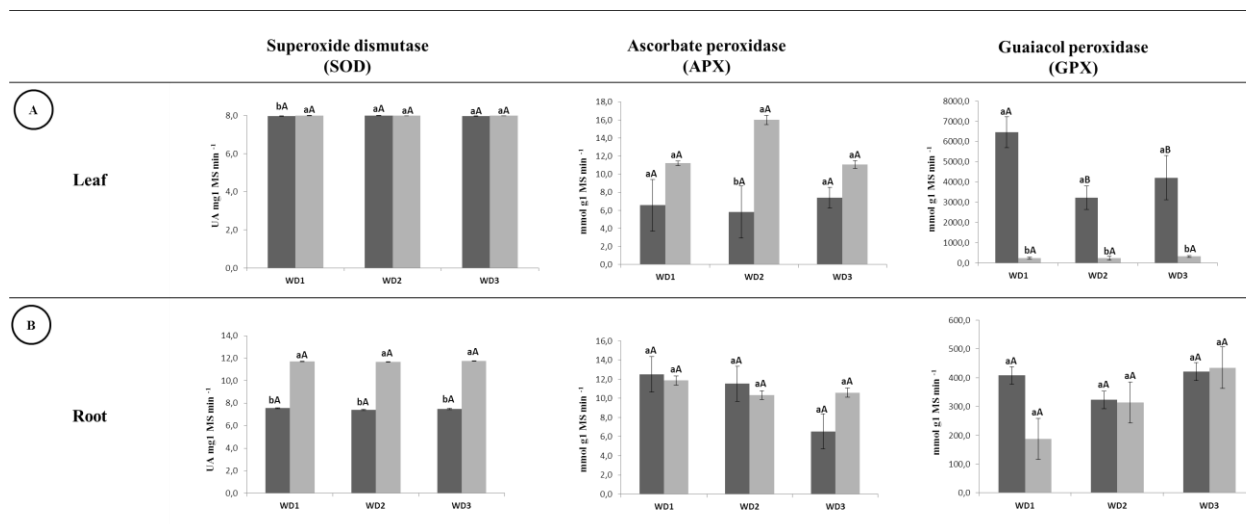


Figure 5: Enzymatic activity of Superoxide Dismutase (SOD), Ascorbate Peroxidase (APX) and Guaiacol Peroxidase (GPX) in leaves (A) and roots (B) of Tahiti/Rangpur lime (TAL/RL - black bar) and Tahiti/Sunki Maravilha (TAL/SM - gray bar) exposed to severe and recurrent water deficit conditions WD1, WD2 and WD3 (Figure 1). The means represent $(\Delta\text{ABS}/\text{time})/\text{Mass (g)}$ with Standard Error ($n = 3$). Uppercase letters compare the differences between combinations. Lowercase letters compare the differences between treatments, Tukey's test ($P > 0.05$).

The activity of APX was significantly higher in leaves (Figure 5A) of TAL/SM in treatment WD2. However, this enzyme showed a higher activity in roots of TAL/RL in treatments WD1 and WD2 (Figure 5B). Overall, the APX activity pattern was different, in leaf, it was twice as high in TAL / SM when compared to TAL / RL in the different water restriction treatments, this same proportion of activity was observed in the root tissue in relation to the leaf in TAL / RL.

Figure 5 shows the enzymatic activities of GPX and a significant difference between TAL/RL and TAL/SM and between treatments (WD1, WD2 and WD3) in leaves (Figure 5A). Comparison of the scion/rootstock combinations in the different water deficit conditions shows differences from water regime WD1 to the more severe water deficit condition WD3, especially for the TAL/RL combination that showed higher activities compared to TAL/SM. Moreover, the recurrent water deficit was sufficient to change GPX activity in roots (Figure 5B) in the two citrus plant combinations.

For SOD (Figure 5 A-B), there was a significant difference in both plant tissues. The significant difference in leaves was observed between TAL/RL and TAL/SM in the water regime WD1, with no differences between combinations in the other treatments (Figure 5A). A significant difference was also detected in roots (Figure 5B) between the two scion/rootstock combinations and the behavior of TAL/RL was of note as it showed lower activities in all water deficit conditions.

3.3 DNA methylation profiles

A total of 293 and 248 polymorphic bands (Table 1) were amplified using the MSAP technique for the Tahiti/Sunki Maravilha (TAL/SM) and Tahiti/Rangpur lime (TAL/RL) combinations, respectively.

For the TAL/SM combination, a total of 253, 214, 226 and 257 methylated bands were found in plants exposed to control (CT) and WD1, WD2 and WD3 conditions, respectively. This result indicates a constant increase in methylation, especially when comparing treatment WD3 (exposure to three periods of water deficit) with treatments WD1 and WD2. On the other hand, for the TAL/RL combination, a total of 180, 232, 204 and 212 methylated bands were found in plants exposed to control (CT) and WD1, WD2 and WD3 conditions, respectively. There is an increase in treatment WD1 compared to the control and a significant reduction when comparing the water deficit treatments from WD1 to WD3 (Table 1).

Table 1: Different MSAP profiles of methylated cytosine levels of leaf DNA from Tahiti acid lime scions grafted to two rootstocks (Tahiti/Sunki Maravilha (TAL/SM) and Tahiti/Rangpur lime (TAL/RL)) exposed to total irrigation (control) and to severe conditions of recurrent water deficit (WD1, WD2 and WD3). ^aTotal of amplified bands; ^bTotal of methylated bands (II + III + IV); ^cRate of fully methylated bands (II + IV); ^dRate of hemi-methylated bands (III); ^eMSAP - percentage ratio of total of methylated bands (II + III + IV) in relation to the total of amplified bands.

	TAL/SM				TAL/RL			
MSAP type band	CT	WD1	WD2	WD3	CT	WD1	WD2	WD3
I*	40	79	67	36	68	16	44	36
II**	26	45	50	38	24	11	36	17
III***	29	52	38	33	49	32	25	23
IV****	198	117	138	186	107	189	143	172
Total amplified bands	293	293	293	293	248	248	248	248
Total methylated bands (II + III + IV)	253	214	226	257	180	232	204	212
Fully methylated bands ratio (II + IV) %	76,45	55,29	64,16	76,45	52,82	80,65	72,18	76,21
Hemi-methylated ratio % (III)	9,90	17,75	12,97	11,26	19,76	12,90	10,08	9,27
MSAP%	86,3	73,0	77,1	87,7	72,6	93,5	82,3	85,5

Bands ***type I** - presence of bands in EcoRI/HpaII and EcoRI/MspI reactions and indicates absence of methylation; ****type II** - bands in EcoRI/MspI reactions, but not in EcoRI/HpaII; *****type III** - bands in EcoRI/HpaII reactions, but not in EcoRI/MspI; and ******type IV** - represents the absence of band in both enzyme combinations.

The hemi-methylation profiles for the TAL/SM scion/rootstock combination show the following proportions: 9.90%, 17.75%, 12.97% and 11.26% in plants exposed to control (CT) and WD1, WD2 and WD3 conditions, respectively. There is an increase in the methylated cytosine levels in one of the DNA strands, only from the control to the WD1 condition, which indicates an hypermethylation induced by water deficit. Comparison of the recurrent deficit conditions WD1, WD2 and WD3 shows a reduction in the methylation levels.

In contrast, for the TAL/RL combination, plants exposed to control (CT) and WD1, WD2 and WD3 conditions showed levels of 19.76%, 12.90%, 10.08% and 9.27%, respectively. There is sequential loss of methylated cytosines in one of the DNA strands

for the treatments, especially for recurrent water deficit conditions, which suggests the existence of hypomethylation for this combination.

The total MSAP rate (%) in TAL/SM showed a decrease in the methylation pattern in treatment WD1 compared to the control (CT). However, the methylation pattern increases as the number of water deficit cycles increases, reaching 87.3% in WD3, which is similar to the control. This behavior was not observed when comparing the TAL/RL combination to the control (Table 1).

The methylation profiles showed a significant variation for the TAL/SM combination in the different treatments (CT, WD1, WD2 and WD3) (Figure 6A).

The methylation profile of type IV showed higher indices, which represents the different factors associated with the appearance of methylations, and mutations at restriction sites are included in these factors. In addition, the highest level of total methylation was observed in WD3 conditions in both combinations, but especially in TAL/SM (Figure 6A). Types I, II and III profiles fluctuate among treatments WD1, WD2 and WD3, with a significant increase compared to the control.

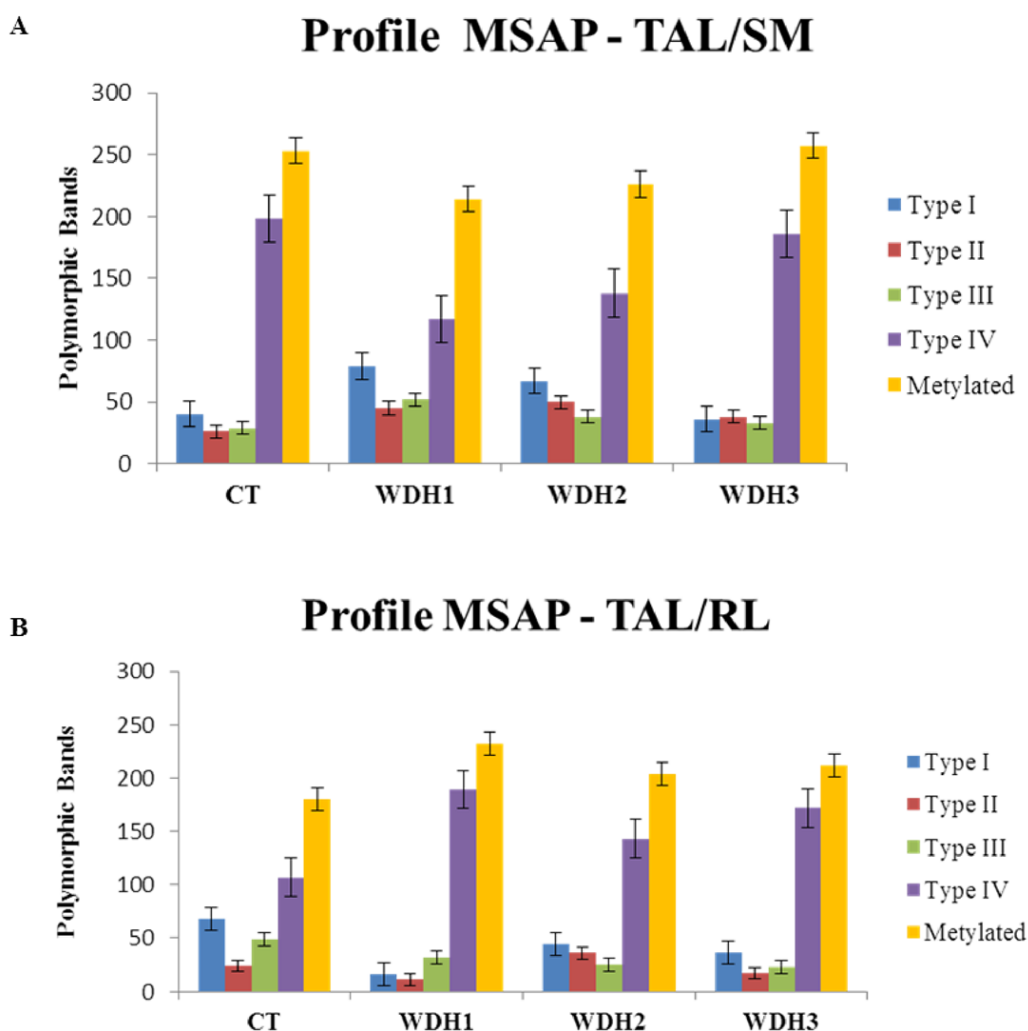


Figure 6: (A) Polymorphic bands detected in the combination Tahiti/Sunki Maravilha (TAL/SM) and Tahiti/Rangpur lime (TAL/RL) (B) for DNA extracted from the scion (Tahiti acid lime). Types I to IV are, respectively: non-methylated, internal cytosine methylation, external cytosine methylation or hemi-methylation, and hypermethylation or mutation at the restriction site. Methylation is the total methylation

level estimated according to Nicotra et al. (2015) and Schulz et al. (2013). The means are followed by the Standard Error with n = 3.

There is also variation in the MSAP profiles for the TAL/RL combination (Figure 6B). However, types I, II and III profiles greatly fluctuated from the control to the most severe water deficit treatment (WD3), which indicates loss of methylation in the different periods of water deficit.

A total of 541 clear fragments were amplified using 36 primer combinations on the MSAP analysis of TAL/RL and TAL/SM leaf DNA samples.

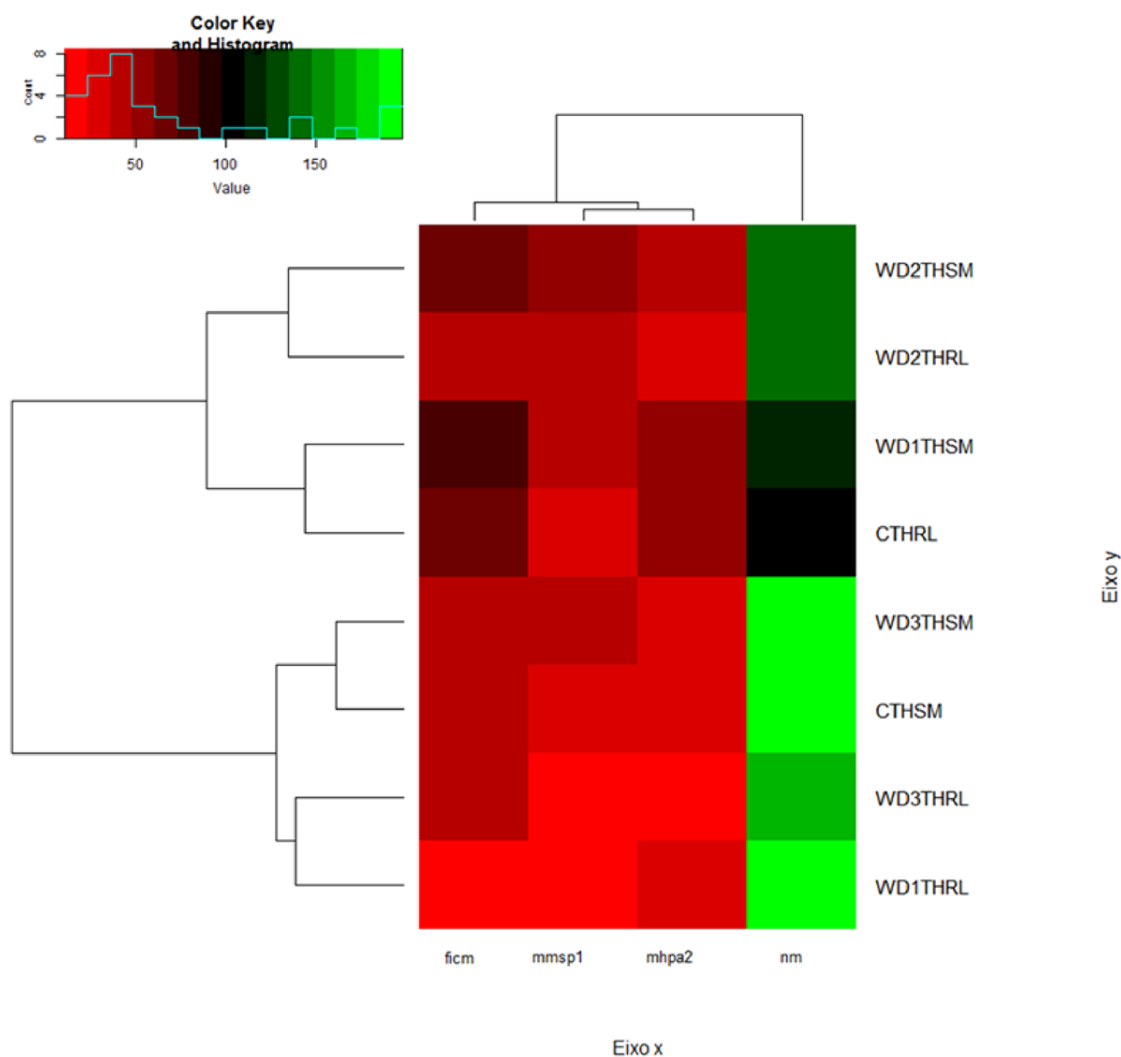


Figure 7: Heat map with the Spearman's correlation representing the methylation profiles provided by the MSAP analysis using the MspI and HpaII enzymes in the Tahiti/Rangpur lime (TAL/RL) and Tahiti/Sunki Maravilha (TAL/SM) combinations for the different treatments (C, control and different water deficit conditions WD1, WD2 and WD3). NM represents the presence of bands cut with both enzymes and thus no methylation; Mhpa2 indicates the presence of methylation due to HpaII digestion; Mmsp1 indicates the presence of methylation due to MspI digestion; and FICM represents the absence of bands for both enzymes and there can be different types of total methylation of internal or external cytosines, hemi-methylations and even mutations.

The heat map represents the polymorphic patterns of the MSAP profiles, with differences between the non-methylated (NM) and methylated (M-HpaII, M-MspI and FICM) profiles. The NM group is mainly green and the M-HpaII, M-MspI and FICM groups are mainly red (Figure 7).

The methylation frequency for the M-HpaII profile was similar in WD1 and WD2 for TAL/RL, while it differed in WD3 as the color was less intense. This difference was not observed in the TAL/SM combination. However, TAL/SM showed similar results in WD2 and WD3 treatments for the M-HpaII profile, differing from WD1 with higher frequencies. Comparison of TAL/SM and TAL/RL profiles in treatments WD2 and WD3 shows that TAL/RL has lower frequencies. The M-MspI profile is more significant in treatment WD3 in TAL/SM compared to the same treatment in TAL/RL.

Figure 8 represents the two principal component components of MSAP profiles for TAL/RL and TAL/SM combinations and the four treatments (CT, WD1, WD2 and WD3).

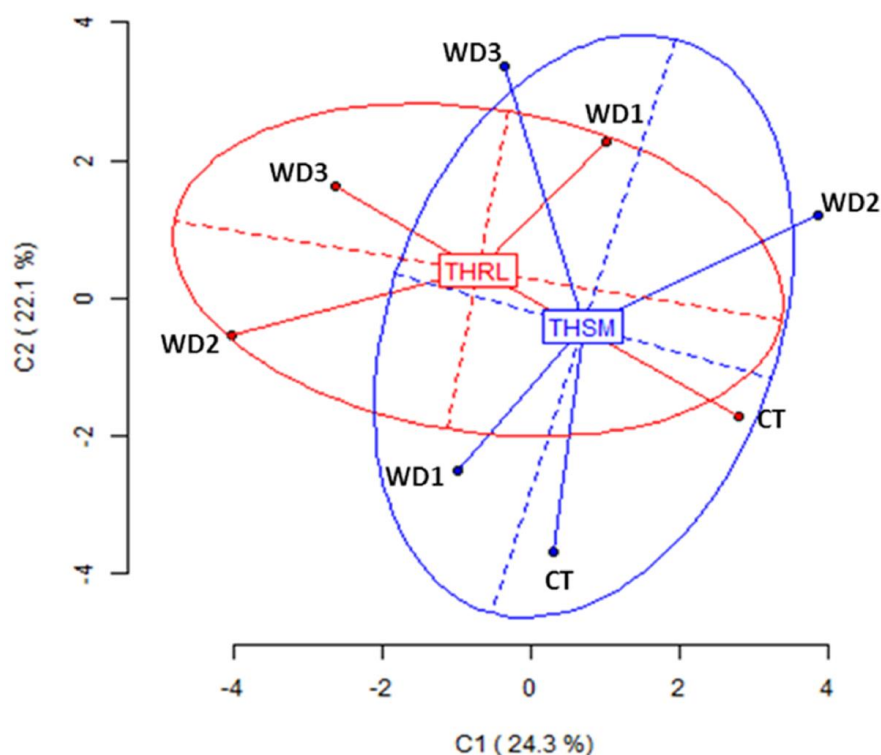


Figure 8: Two-dimensional representation of Principal Component Analysis (PCA) of methylation patterns with epigenetic variation. Methyl Sensitive Loci - MSL. Scion/rootstock combinations Tahiti/Rangpur lime (TAL/RL) and Tahiti/Sunki Maravilha (TAL/SM), control treatment (CT) and different water deficit treatments (WD1, WD2 and WD3). The principal components (C1 and C2) are shown with the percentage of variance that explains the variation found in the different treatments. The ellipses represent the mean dispersion of the points (CT, WD1, WD2 and WD3) around their center (TAL/SM and TAL/RL). The long axis of the ellipse shows the direction of maximum dispersion and the short axis shows the direction of minimum dispersion.

The scion/rootstock combinations are not directly related as they were in different groups. This is related to a greater epigenetic variation between combinations, which isolates them in the respective groups and only allows to establish associations within each group. The methylation levels are not specifically regulated by the genotype, but by the treatments and the different periods of recurrent water deficit.

The analysis of the treatments shows that the periods with higher number of recurrent water deficit cycles (WD3) of both combinations are in the same quadrant, which indicates higher levels of MSL in these treatments and suggests that the methylation profiles of citrus plants change under severe water deficit conditions.

A partial overlap of the genotypes is represented in Figure 9, which evidences a lower genetic variability among them compared to non-methylated loci - NML.

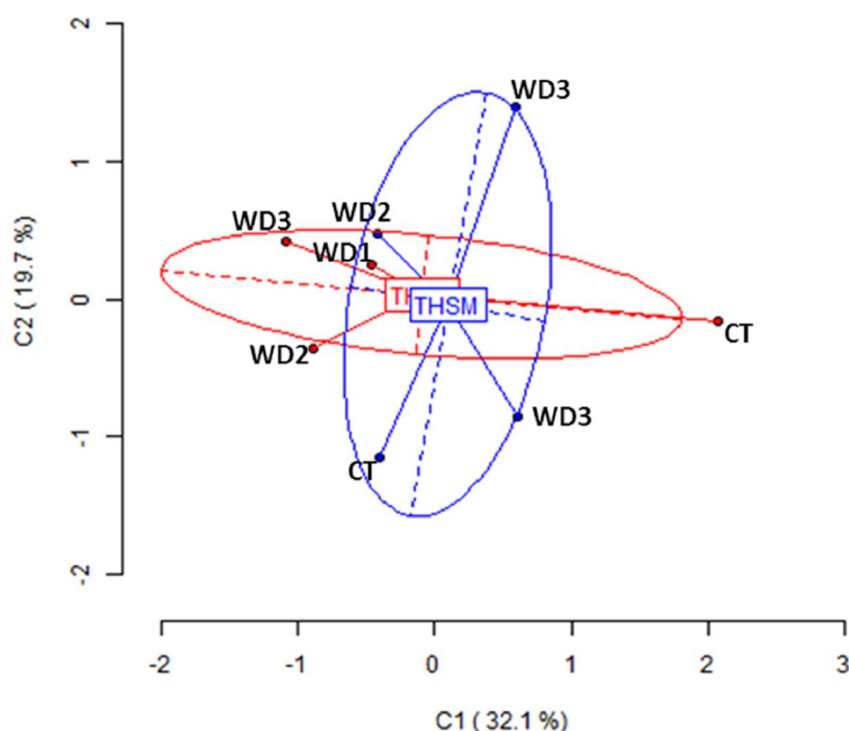


Figure 9: Two-dimensional representation of Principal Component Analysis (PCA) of Non-Methylated Loci - NML. Scion/rootstock combinations Tahiti/Rangpur lime (TAL/RL) and Tahiti/Sunki Maravilha (TAL/SM), and the control treatment (CT) and different water deficit treatments (WD1, WD2 and WD3). The principal components (C1 and C2) are shown with the percentage of variance that explains them. The ellipses represent the mean dispersion of the points (CT, WD1, WD2 and WD3) around their center (TAL/SM and TAL/RL). The long axis of the ellipse shows the direction of maximum dispersion and the short axis shows the direction of minimum dispersion.

Most treatments in both combinations were grouped in the same quadrant and there is a greater distance from the controls, when the plants were in full field capacity and showed higher levels of non-methylated loci.

3.4 Stomatal analyses

In the different recurrent water deficit treatments (WD1, WD2 and WD3) for the scion/rootstock combinations TAL/SM and TAL/RL of this study, the physiological parameters (Figure 4 A-C) did not show significant differences for any of the treatments and between combinations.

However, Neves et al. (2017) used combinations with ‘Valencia’ orange tree as scion and observed changes in physiological parameters as the number of water deficit cycles increased. These physiological differences in recurrent drought conditions among the scion genotypes mentioned above indicate that the Tahiti acid lime scions used in this study do not respond to the rootstock stimuli, probably due to insensitivity to abscisic acid (ABA). Considering that the variables of the mechanisms of the physiological parameters indicate the stomata as important regulators of gas exchanges, which are directly controlled by ABA, the stomata were counted to further support this hypothesis. Therefore, to shed new light on the role of ABA in citrus plants under drought conditions, leaves of *Citrus latifolia* Tanaka (Tahiti acid lime) – TAL and *Citrus sinensis* (L.) Osb. ‘Valencia’ – Orange – VO were photomicrographed and two thousand sections were observed to analyze the ABA-induced closure and opening of the stomata. The Valencia (VO) showed a total of 36.3% and 63.7% open and closed stomata, respectively, at the concentration of 15 ng/mL of ABA. At the highest concentration of 240 ng/mL, 69.8% of the stomata were closed and 30.2% remained open. The highest number of closed stomata was observed in T40 with 1175 and 1166 at concentrations of 15 ng/mL and 240 ng/mL of ABA, respectively. However, Tahiti (TAL) had an inverse behavior, showing 61.4% of open stomata and 38.6% of closed stomata at the concentration of 15 ng/mL of ABA. At the concentration of 240 ng/mL of ABA, TAL had 67.6% of open stomata and 32.4% of closed stomata and the highest number of open stomata was obtained from T5 to T40 with: 539, 904, 770, 750 open stomata in treatments T5, T10, T20 and T40, respectively.

Analysis using the GGEbiplotGUI R package was performed to evaluate the greater number of open stomata (Figure 10) in TAL and VO at different exposure times and ABA concentrations. In this analysis, components 1 and 2 explained 85.35% of the phenotypic variation. At the different ABA concentrations and for the different immersion times, Tahiti (TAL) always had the greater number of open stomata throughout the treatments and was more centralized (bullseye) – green arrow, in the GGEbiplotGUI analysis. The Tahiti acid lime (TAL) remained with more open stomata under exposure to T10, T20 and T40 immersion time treatments at both ABA concentrations, 15 ng/mL and 240 ng/mL. However, the stomata in Valencia (VO) were less open at concentrations of 15 ng/mL and 240 ng/mL of ABA, which was also significant in the T10, T20 and T40 immersion times. In addition, the genotypes showed no differences in the opening of the stomata in control conditions (immersion only in deionized water) and in the T5 immersion treatment, as shown in Figure 10.

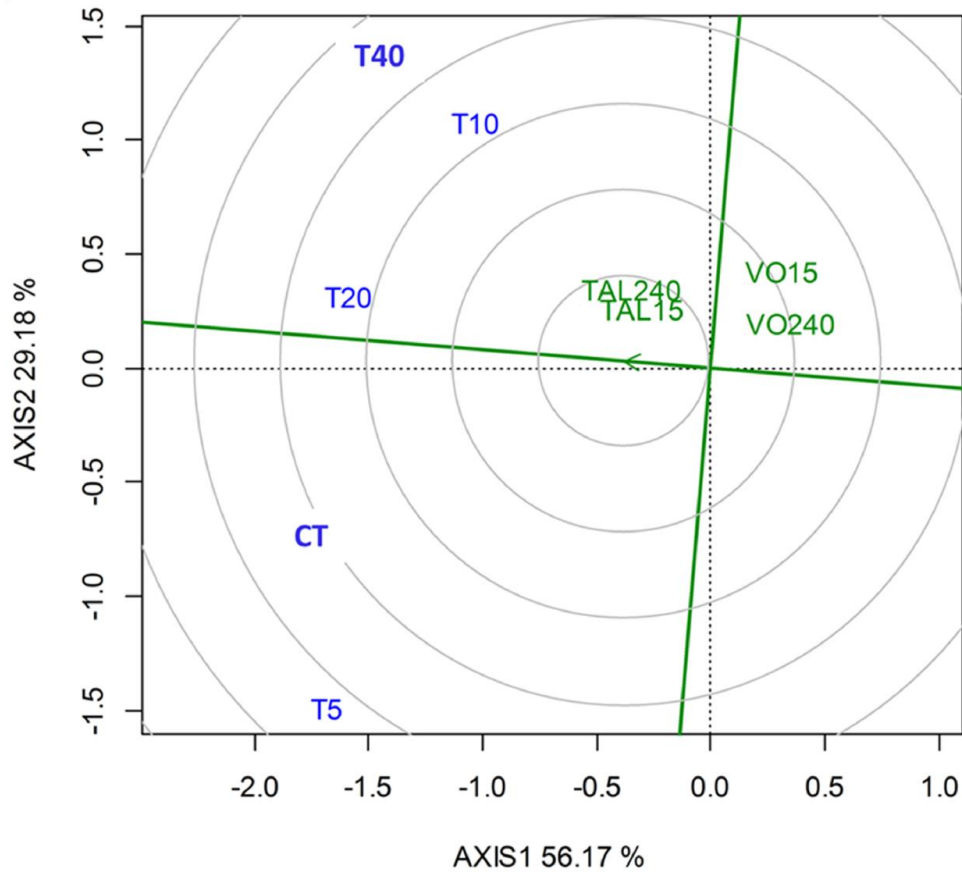


Figure 10: GGEbiplotGUI plot - model scaled by standard deviation and Global centered - E (Environment) + G (Genotype) + GE (Genotype - Environment interaction) explaining a total of 85% (AXIS 1 + AXIS 2) of the phenotypic variation related to the treatments. TAL15 and TAL240 - Tahiti leaves at ABA concentrations of 15 ng/mL and 240 ng/mL, respectively; VO15 and VO240 - Valencia leaves at ABA concentrations of 15 ng/mL and 240 ng/mL, respectively. CT - Control; T5, T10, T20 and T40 - immersion in ABA solution for five, ten, twenty and forty minutes, respectively.

Figure 11 shows the anatomical changes resulting from ABA treatments in Tahiti acid lime (TAL) and Valencia (VO).

The photomicrographed Tahiti (TAL) paradermic sections (Figure 11A) indicate insensitivity to ABA treatments as there were almost no closed stomata and TAL had a higher number of open stomata. Open stomata were present at both ABA concentrations of 15 ng/mL and 240 ng/mL, which is different from the observations in VO (Figure 11B). In Valencia (VO), these different treatments gradually induced stomatal closure and this more pronounced in the ABA treatment at the concentration of 240 ng/mL for 40 minutes (Figure 11 B).

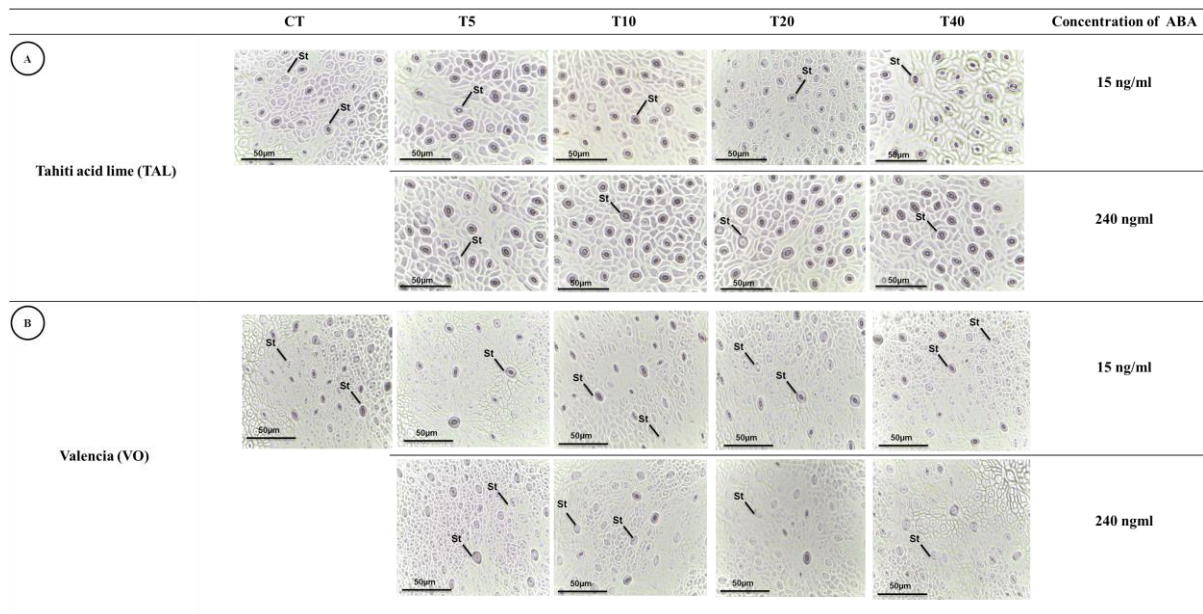


Figure 11: Photomicrographs of paradermic sections of the epidermis on the abaxial surface of Tahiti acid lime (A) and Valencia (B) leaves: Control condition (CT) and sections of leaves treated with concentrations of 15 ng/mL and 240 ng/mL for T5, T10, T20 and T40, St.: Stomata; Bar = 50 μ m.

4. Discussion

The response to recurrent water deficit conditions in TAL/RL and TAL/SM combinations regarding physiological, molecular and biochemical parameters was analyzed in groups of plants of these combinations exposed to different recurrent water deficit treatments (Figure 1). The WD1 plant group was used as reference for the other treatments (WD2: plants exposed to water deficit treatments in the first and third stages of the experiment and WD3: plants exposed to water deficit treatments in all three stages of the experiment), since treatment WD1 represents plants exposed to a single water deficit treatment.

The data set comparing the control conditions (maintained in field capacity) and the water deficit conditions for the combinations TAL/RL and TAL/SM was shown in the study of Santana-Vieira et al. (2016) that previously evaluated only the differences in the physiological, hormonal, and metabolic patterns of these combinations. The authors concluded that the responses of the genotypes exposed to water deficit conditions are highly dependent on the scion/rootstock combinations. However, this previous study did not provide information on the behavior of Tahiti acid lime in combination with SM and LR exposed to recurrent water deficit stress conditions, especially regarding the level of epigenetic variation in the behavior of these plants (combinations).

Plants exposed to recurrent abiotic stress conditions are prepared for future disturbances or promote a state of adaptation to the imposed stress condition that leads to what can be called “epigenetic memory” (Crisp et al. 2016). This priming ability or “epigenetic memory” is characterized by molecular responses that change the levels of signaling metabolites and transcription factors, chromatin states and histone tail, DNA methylation and efficiency in molecular and biochemical responses, after several

exposures to a recurrent stress (Paszkowski et al. 2011; Gayacharan et al., 2013; Avramova et al. 2015; Crisp et al. 2016).

The use of Ψ_S and Ψ_L for water deficit in the different treatments (WD1, WD2 and WD3) allows to make a more accurate comparison of the drought responses in the combinations analyzed. These parameters were also adopted in the studies of Pedroso et al. (2014); Gonçalves et al. (2016); Santana-Vieira et al. (2016) and Neves et al. (2017) that, on average, obtained similar values of Ψ_S and Ψ_L in different citrus genotypes. According to Fang and Xiong (2015), as Ψ_S and Ψ_L influence the maintenance of plant development, the leaf relative water content (RWC) also influences this process, ensuring more precision in the imposition of the water deficit.

RWC rates (%) showed significant differences between TAL/RL and TA/SM combinations only in the first WD1 treatment (plants exposed to a single water deficit treatment in the third stage of the experiment). In general, scion/rootstock combinations maintained 60-70% of the leaf relative water content, except for TAL/RL plant rates, which decreased to 57.5% in the first water deficit treatment (Figure 3). Changes in RWC rates are physiological responses of plants that support the wilt process when they are in a water deficit regime (Sousa et al., 2018).

According to Syvertsen et al. (2014), depending on the severity and recurrence in citrus plants, water deficit leads to a reduction of the photosynthetic rates (A), Transpiration rates (E), Intercellular carbon dioxide concentrations (C_i) and Stomatal Conductance (gs), which is one of the survival mechanisms to drought. It should be noted that the variables of this mechanism suggest that stomata are important regulators of gas exchanges, which directly influences the quality and productivity of citrus plants.

In the different recurrent water deficit treatments (WD1, WD2 and WD3) in the TAL/SM and TAL/RL scion/rootstock combinations, the photosynthetic rate (A), stomatal conductance (gs) and transpiration rate (E) were analyzed (Figure 4A-C). Using the WD1 treatment as a reference in the comparison with WD2 and WD3, no significant differences were observed in the evaluations of plant leaf tissues for any of the treatments and between the combinations. Studies of Silva et al. (2005) and Santos et al. (2016) with Tahiti acid lime (TAL) as scion exposed to different water deficit conditions using irrigation methods also did not show a significant reduction of the photosynthetic rates, transpiration rates and stomatal conductance compared to other citrus plants.

Another study with citrus plants of Neves et al. (2017) used Valencia orange grafted to “Sunki” Maravilha (SM) and Rangpur lime (RL) rootstocks under recurrent water deficit and showed a significant reduction of the physiological parameters only in the first period of water deficit. The authors attributed this to the acclimatization process that can be developed by plants exposed to water deficit conditions. However, this study did not find differences in the physiological parameters in TAL/SM and TAL/RL combinations. The Tahiti acid lime (TAL) showed a uniform behavior in the two combinations analyzed. In addition to the relative water content (RWC) that was around 60-70% and the similar values of the physiological parameters, these are strong indications that the scion (TAL) does not respond to the rootstock stimuli and is insensitive to abscisic acid (ABA), which is a plant hormone that regulates growth, antioxidant signaling and is an excellent protector in recurrent drought conditions through the expression of genes of its biosynthetic pathway (Fleta-Soriano et al. 2015; Manzi et al. 2017; Neves et al. 2017).

Studies with *Arabidopsis thaliana* show that ABA insensitivity is linked to the reduction of a receptor-protein, such as the class of PP2C phosphatase proteins next to the Start

receptor, or to a reduced binding capacity of the receptor to ABA, thus preventing more efficient physiological responses when the plants are exposed to water stress conditions (Koornneef et al. 1982; Ma et al. 2009; Sing et al. 2015).

The Tahiti acid lime (TAL) is probably insensitive to ABA based on the following observations: (i) the study of Santana-Vieira et al. (2016) showed a greater demand of ABA for the rootstock RL in combination with TAL in control conditions compared to other combinations with the rootstock RL. The increased production of ABA shows the influence of this scion on the rootstock, since it requires more ABA to control the transpiration of the aerial part and to limit the vigorous growth of TAL, but without success; (ii) the study of Neves et al. (2017) showed significant improvements in the photosynthetic parameters in Valencia orange as the number of exposures to drought increased, which did not occur in this work with Tahiti acid lime; (iii) empirical observations in the field indicate that this Tahiti acid lime is more sensitive to water deficit compared to other scion varieties, since it does not respond to stomatal regulation.

To confirm the hypothesis that the Tahiti acid lime is insensitive to ABA, opening and closure of stomata was analyzed by exposing leaves of Tahiti acid lime (TAL) and Valencia orange (VO) to ABA solutions. It was observed that VO tends to gradually close its stomata, which does not occur in TAL as stomata remain mostly open (Figures 11A-B).

At the different concentrations of ABA, 61.4% (15 ng/mL) and 67.6% (240 ng/mL) of the TAL stomata remained open (Figure 11A). These concentrations gradually induced the closure of VO stomata, which had 36.3% (15 ng/mL) and 30.2% (240 ng/mL) of open stomata (Figure 11 B). Considering the significant difference of the results and the paradermic sections analyzed for the different genotypes, the Tahiti acid lime (TAL) has mechanisms that make it insensitive to ABA hormone signaling and this should be investigated in future studies with this citrus plant.

The induction of stomata closure is one of the main functions of ABA, which occurs through the inhibition of the potassium ions flux in guard cells and, consequently, the reduction of stomata size (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki 2006; Peleg and Blumwald 2011). Even with insensitivity, the hormone is present, but the mechanism to inhibit the potassium ions flux, prompting opening and closing of stomata, will not work due to insensitivity to ABA. In addition, plants have drought- responsive genes that can be induced by routes independent of ABA, mediated by secondary messengers, such as Ca^{2+} , or regulated by epigenetic mechanisms (Yoshida et al. 2014).

Drought is considered a multidimensional type of stress and, to tolerate dehydration, plants have the ability to control other mechanisms that prevent further cell damage caused by, for example, the maintenance of a fairly efficient detoxification metabolism that manages the increased production of Reactive Oxygen Species (ROS) caused by water deficit.

The accumulation of reactive oxygen species (ROS) leads to oxidative stress and compromises the function of proteins, lipids, sugars and oligonucleotides. The efficiency of the antioxidative defense mechanism is closely associated with the plant's memory capacity after exposure to recurrent periods of dehydration (McDowell et al. 2008; Gill et al. 2010; Claeys et al. 2013; Pisoschi and Pop et al. 2015; Neves et al. 2017).

The Superoxide Dismutase (SOD - EC1.15.1.1), Catalase (CAT - EC1.11.1.6) Ascorbate Peroxidase (APX - EC1.1.11.1) and Guaiacol Peroxidase (GPX - EC1.11.1.7) enzymes are the main components of the enzymatic antioxidative

mechanism and act in cascade and equilibrium (Mittler et al., 2004). The superoxide dismutase (SOD) enzyme is considered the most effective intracellular enzymatic antioxidant and is the first line of enzymatic defense in water stress conditions, converting $O_2^{\bullet-}$ to H_2O_2 (Mittler 2002; Martins and Mourato 2008). Corroborating the findings of Neves et al. (2017), the enzymatic activity of SOD in this study showed a significant difference in the two plant tissues analyzed, leaf and root (Figure 5A-B). The difference observed in roots was very pronounced between the TAL/SM and TAL/RL combinations and in the leaves it was noticed in the first period of water deficit (WD1), which indicates an efficient antioxidative enzymatic mechanism to eliminate ROS in these combinations / RL, and demonstrates the influence of different rootstocks on the scion.

As a dismutation product, H_2O_2 at high concentrations induces the expression of genes related to the activation of the antioxidant system, which in turn activates the main enzymes CAT, APX and GPX (Soares and Machado 2007). The H_2O_2 that accumulates intracellularly needs to be reduced and, for that process, the GPX and APX enzymes use reducing molecules, such as guaiacol or pyrogallol and ascorbate, respectively (Asada 1999). Regarding the enzymes that reduce H_2O_2 , APX and GPX are considered to be more efficient antioxidants compared to, for example, CAT, since they have a greater affinity for H_2O_2 and are more widely distributed in the cell as enzymes that act in intracellular (Cytosol, Chloroplast, Mitochondria, Vacuoles and Peroxisomes) and extracellular (Cell wall) regions (Das et al., 2014).

The activity of GPX showed significant differences in the leaves, but not in the roots (Figure 5A-B) for the TAL/RL and TAL/SM combinations. Depending on the recurrence and severity of the stress conditions (WD1, WD2 and WD3), the TAL/RL combination showed higher levels of GPX activity in the leaves and there was a significant difference. This was also observed in the roots when comparing with TAL/SM (Figure 5A-B). GPX is associated with many biosynthetic processes in addition to the antioxidant activity, including cell wall lignification, degradation of indoleacetic acid (AIA) and ethylene biosynthesis (Gill and Tuteja, 2010; Sharma, 2012).

Ascorbate peroxidase (APX), as well as GPX, also acts on changes in cell wall elasticity properties, but APX uses the oxidation of another substrate (ascorbate) to reduce H_2O_2 . Studies have shown that the APX activity is more correlated with the plant growth activity than with the elimination of ROS in water deficit conditions. Zhang et al. (2013) studied the role of APX regulatory genes in *Oryza sativa* and found that loss of function of these genes affected the growth and development of rice seedlings.

In this study, APX showed higher activity in TAL/SM leaves in treatment WD2 (Figure 4A). The comparison of this activity with the photosynthetic rate (Figure 3A) shows a similar profile with assimilation of CO_2 in the different treatments, which indicates a correlation between the photosynthetic rate and, consequently, growing leaves and APX activity, and corroborates the studies of Foyer and Shigeoka (2011) and Pinto et al. (2013). On the other hand, APX is more active in roots than in leaves in the TAL/RL combination (Figure 4B) in treatments WD1 and WD2, which indicates a well-known feature reported in studies with Rangpur lime (RL), which is the increase of root growth in water deficit conditions (Gonçalves et al., 2016).

The severity and recurrence of the water deficit induces the accumulation of reactive oxygen species (ROS) in the cells (Caverzan et al. 2016) and the efficiency of the enzymatic antioxidative system is observed in the results of the activities of the enzymes SOD, APX and GPX in the TAL/RL and TAL/SM combinations, which

reduced the production of ROS and ensured a balance between ROS production and elimination. Although TAL/RL and TAL/SM used SOD as the main line of defense to degrade $O_2^{\bullet-}$, TAL/RL showed higher GPX activity, while TAL/SM showed higher APX activity, which indicates that the antioxidant system genotype-specific as reported in a study with wheat (*Triticum aestivum* L.) under water stress (Caverzan et al., 2016). In citrus plants the combination of genotypes (scion / rootstock) will in a way modulate this genotype - specific response (Gonçalves et al., 2016). The antioxidative system was properly working and this confirms the efficiency of the stress memory when these combinations are exposed to recurrent periods of dehydration (Neves et al., 2017) and the different defense mechanisms that these scion/rootstock combinations (TAL/SM and TAL/RL) can use in drought conditions, as shown by Santana-Vieira et al. (2016). The elimination of ROS was differentially regulated according to the rootstock and water deficit treatment.

Changes in DNA methylation can be induced by drought (Herman et al., 1996; Boyko et al., 2010 and Crisp et al., 2016). Studies conducted by Gutzat et al. (2012) and Khraiweh et al. (2012) showed that drought-induced genes change their processes over time from activation to inactivation, resembling transcriptional processes.

These changes in DNA methylation patterns associated with water deficit in citrus plants are still poorly investigated. The pioneering study of Neves et al. (2017) evaluated Valencia orange (VO) as scion with two rootstocks that adopt different stress tolerance strategies in drought conditions (Sunki Maravilha (SM) and Rangpur lime (RL) after exposure to recurrent water deficit and showed data on methylation levels and other parameters with the conclusion that, at first, only the VO/SM combination showed a stress memory.

In this study, the recurrent drought conditions promoted DNA methylation in TAL/SM leaves, whereas these methylation profiles were not observed in the TAL/RL combination (Table 1). Thus, based on the similar values showed by the TAL/SM and TAL/RL combinations for the physiological parameters, it is possible to infer that both scion/rootstock combinations showed genetic “memory” in recurrent water deficit conditions, since no changes were observed in the physiological parameters over the different periods of water deficit (WD1, WD2, and WD3), but the epigenetic profiles were different, which are responsible for the survival strategies adopted by TAL/SM and TAL/RL.

This data corroborates the results of the study of Santana-Vieira et al. (2016) that evaluated only one period of water stress for these same combinations, since SM and RL rootstocks are considered to have different strategies to tolerate or prevent dehydration. However, in addition to that fact, the possible influence of the Tahiti acid lime (TAL) scion on the rootstocks should also be considered, since the comparative results of the behavior of RL and SM with the Valencia orange (VO) scion showed different behaviors in recurrent water deficit conditions (Neves et al., 2017).

Another important information in our study was the existence of an epigenetic diversity (MSL) significantly higher than the genetic variation (NML) (Figures 8 and 9). The combinations analyzed were not genetically different, but there was a significant epigenetic difference, which was highly influenced by the recurrent water deficit treatments WD1, WD2 and WD3.

Thus, citrus plants pre-exposed to recurrent water stress conditions can possibly change their survival responses by developing a genetic memory. This memory is regulated by a complex network of external and internal factors of the plants (Munné et al., 2013).

The PCA results indicate that the recurrence of periods of water deficit significantly increase the epigenetic diversity in the TAL/SM and TAL/RL combinations and this can be associated with the increase or loss of DNA methylation, generating a significant epigenetic diversity. This behavior of the genotypes in the different recurrent water deficit regimes is associated with one of the epigenetic fields described by Springer et al. (2013), which is the memory of gene expression states imposed during development or by environmental conditions that are related to mitotic inheritance or facultative heterochromatin. The changes in the DNA methylation profile and the mitotic memory generated by the conditions of gene expression are fundamental for the development and survival of the plants.

Gaycharam et al. (2013) and Neves et al. (2017) state that genotypes tolerant to water deficit conditions have their DNA hypomethylated. The hypermethylation and hypomethylation profiles in the TAL/SM and TAL/RL combinations, respectively, showed similar behaviors to those found by Neves et al. (2017), which further confirms that drought induces hypermethylation and hypomethylation in the DNA of citrus plants in recurrent water deficit conditions. The behavior of the physiological parameters in the TAL/RL and TAL/SM combinations, as well as the activities of the antioxidant enzymes, are probably linked to the marked differences in the DNA methylation profiles as changes in chromatin control from morphological to molecular levels of the plants, including their responses to the environment, which results in a mitotic epigenetic memory that can become transgenerational under stress conditions (Springer et al., 2013). Therefore, understanding these processes can provide greater control of the characteristics of interest in citriculture.

Considering the results, this study corroborates the initial hypothesis that citrus plants in recurrent water deficit conditions change their DNA methylation profiles, which indicates the involvement of the epigenetic machinery responsive to water deficit even though the MSAP technique used is limited because it does not reveal the potential hypermethylated and hypomethylated regions.

Nevertheless, the data on the physiological parameters and the antioxidant enzymatic system shows that memory adaptation responses to recurrent water deficit conditions depend on the genotype. Moreover, most of these responses are based on the insensitivity of the Tahiti acid lime to ABA, which confirms the need for scion/rootstock interaction studies to obtain combinations that are more productive and adapted to the different biotic and abiotic conditions.

Acknowledgments

This work was supported by research grants from CNPq (Process 402526/2016-3 and 661 304002/2018-6). A. S. Santos was recipient of a Ph.D. scholarship by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. 663 M.G.C. Costa, W.S. Soares Filho, C. C. Pirovani, M.A. Coelho Filho and A.S. Gesteira 664 are CNPq Research Fellows. The funders had no role in study design, data collection 665 and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author Contribution Statement

A.S. Santos:

D.M. Neves:

D.D.S. Santana-Vieira:
L.A.H. Almeida:
M.G.C. Costa:
W.S. Soares Filho:
C.P. Pirovani:
M.A. Coelho Filho:
C.F. Ferreira:
A.S. Gesteira

Competing financial interests:

References

- Allario T, Brumos J, Colmenero-Flores JM, Tadeo F, Froelicher Y, Talon M, Navarro L, Ollitrault P, Morillon R (2011) Large changes in anatomy and physiology between diploid Rangpur lime (*Citrus limonia*) and its autotetraploid are not associated with large changes in leaf gene expression. *Journal of Experimental Botany* 62, 2507-2519.
- Allario T, Brumos J, Colmenero-Flores JM, Iglesias DJ, Pina JA, Navarro L, Morillon R (2013) Tetraploid Rangpur lime rootstock increases drought tolerance via enhanced constitutive root abscisic acid production. *Plant, cell & environment*, 36(4), 856-868.
- Asada K (1999) The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. v. 50, p. 601–639.
- Avramova Z (2015) Transcriptional 'memory' of a stress: Transient chromatin and memory (epigenetic) marks at stress-response genes. *Plant J.* 83, 149-159.
- Barrs HD, Weatherley PE (1962) A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian Journal of Biological Sciences*. 15, 413-428.
- Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E (2000) Responses to abiotic stresses. In: Griessem W, Buchanan B, Jones R (eds) *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp 1158-1249.
- Bruce TJ, Matthes MC, Napier JA, Pickett JA (2007) Stressful 'memories' of plants: evidence for possible mechanisms. *Plant Sci.* 173, 603-608.
- Carlberg I, Mannervik B. (1985) Glutathione reductase. In: *Methods in enzymology*. Academic press pp. 484-490.

Caverzan A, Passaia G, Rosa SB, Ribeiro CW, Lazzarotto F, Margis-Pinheiro M (2012). Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and molecular biology*, 35(4), 1011-1019.

Caverzan A, Casassola A, Brammer S P (2016) Antioxidant responses of wheat plants under stress. *Genetics and molecular biology*, v. 39, n. 1, p. 1-6,

Cheeseman JM (2007) Hydrogen peroxide and plant stress: a challenging relationship. *Plant Stress*, v. 1, p. 4-15.

Claeys H, Inze D (2013) The agony of choice: how plants balance growth and survival under water-limiting conditions. *Plant Physiology* 162, 1768-1779.

Crisp PA, Ganguly D, Eichten SR, Borevitz JO, Pogson BJ (2016) Reconsidering plant memory: Intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. *Science Advances* 2, e1501340.

Das K, Roychoudhury A (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, 2, 53.

De Pinto MC, Locato V, Sgobba A, Romero-Puertas MDC, Gadaleta C, Delledonne M, de Gara L (2013) S-nitrosylation of ascorbate peroxidase is part of programmed cell death signaling in tobacco Bright Yellow-2 cells. *Plant Physiol.* 163, 1766-1775.

Ding Y, Fromm M, Avramova Z (2012) Multiple exposures to drought 'train' transcriptional responses in *Arabidopsis*. *Nat. Commun* 3, 740.

Fang Y, Xiong L (2015) General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* 72, 673-689.

Fleta-Soriano E, Pintó-Marijuan M, Munné-Bosch S (2015) Evidence of drought stress memory in the facultative CAM, *Apteniocordifolia*: Possible role of phytohormones. *PloS One*, 14.

Foyer CH, Shigeoka S (2011) Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiol.* 155, 93-100.

Gayacharan A, Joel, J (2013) Epigenetic responses to drought stress in Rice (*Oryza sativa* L). *Physiology and Molecular Biology of Plants* 19, 379-387.

Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant physiology*, v. 59, n. 2, p. 309-314.

Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, v. 48, n. 12, p. 909-930.

Gonçalves LP, Alves TF, Martins CP, de Sousa AO, dos Santos IC, Pirovani C P, Girardi EA (2016) Rootstock-induced physiological and biochemical mechanisms of drought tolerance in sweet orange. *Acta physiologiae plantarum*, 38(7), 174.

Gutzat R, Scheid OM (2012) Epigenetic responses to stress: triple defense? *Current opinion in plant biology*, v. 15, n. 5, p. 568-573.

Havir EA, Mchale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology*, v. 84, n. 2, p. 450-455.

KAR RK (2011) Plant responses to water stress: Role of reactive oxygen species. *Plant Signaling & Behavior*, v. 6, n. 11, p. 1741-1745.

Khraiweh B, Zhu JK, Zhu J (2012) Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants *Biochim Biophys Acta*, 1819 (2012), pp. 137-148.

Koornneef M, Jorna ML, Brinkhorst-van der Swan DL, Karssen CM (1982) The isolation of abscisic acid (ABA) deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) heyhn. *Theor Appl Genet* 61: 385-393

Kramer PJ, Boyer JS (1995) Water relations of plants and soils. Academic Press, San Diego, p 495.

Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A (2009) Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 324: 1064-1068.
Manzi M, Pitarch-Bielsa M, Arbona V, Gómez-Cadenas A (2017) Leaf dehydration is needed to induce abscisic acid accumulation in roots of citrus plants. *Environmental and Experimental Botany*, 139, 116-126.

Martins LL, Mourato MP (2008) Alterações no metabolismo de plantas em meios contaminados por metais pesados: stresse oxidativo. *Revista Agros*, v. 8.

McDowell N, Pockman WT, Allen CD, Breshears DD, Cobb N, Kolb T, Yezpez EA (2008) Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought?. *New phytologist*, 178(4), 719-739.

Meng F, Glaser SS, Francis H, Yang F, Han Y, Stokes A, Zhao H (2012) Epigenetic regulation of miR-34a expression in alcoholic liver injury. *The American journal of pathology*, 181(3), 804-817.

Mittler R (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9), 405-410.

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science*, 9(10), 490-498.

Munné-Bosch S, Alegre L (2013) Cross-stress tolerance and stress "memory" in plants: An integrated view. *Environ Exp. Bot* 94, 1-2.

Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8, 4321-4326.

Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2014) The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. *Frontiers in plant science*, v. 5, p. 170.

Neves DM, Coelho Filho MA, Belleite BS, Silva MFGF, Souza DT, Soares Filho WDS, Gesteira AS (2013) Comparative study of putative 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase and abscisic acid accumulation in the responses of Sunki mandarin and Rangpur lime to water deficit. *Molecular biology reports*, 40(9), 5339-5349.

Neves DM, da Hora Almeida LA, Santana-Vieira DDS, Freschi L, Ferreira CF, Soares Filho SW, Gesteira SA (2017) Recurrent water deficit causes epigenetic and hormonal changes in citrus plants. *Scientific reports*, 7(1), 13684.

Nicotra AB, Segal DL, Hoyle GL, Schrey AW, Verhoeven KJ, Richards CL (2015) Adaptive plasticity and epigenetic variation in response to warming in an Alpine plant. *Ecology and Evolution*, 5(3), 634-647.

Oliveira TM, Da Silva FR, Bonatto D, Neves DM, Morillon R, Maserti BE, Gesteira AS (2015) Comparative study of the protein profiles of Sunki mandarin and Rangpur lime plants in response to water deficit. *BMC plant biology*, 15(1), 69.

Osborn TC, Pires JC, Birchler JA, Auger DL, Chen ZJ, Lee HS, Martienssen RA (2003) Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends in genetics*, 19(3), 141-147.

Paszkowski J, Grossniklaus U (2011) Selected aspects of transgenerational epigenetic inheritance and resetting in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 195-203.

Pedroso FKJV, Prudente DA, Bueno ACR, Machado EC, Ribeiro RV (2014) Drought tolerance in citrus trees is enhanced by rootstock-dependent changes in root growth and carbohydrate availability. *Environmental and Experimental Botany* 101, 26-35.

Peleg Z, Blumwald E (2011) Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current opinion in plant biology*, v. 14, n. 3, p. 290-295.

PÉREZ-FIGUEROA A (2013) MSAP: a tool for the statistical analysis of methylation-sensitive amplified polymorphism data. *Molecular ecology resources*, v. 13, n. 3, p. 522-527.

Pisoschi AM, Pop A (2015) The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*, v. 97, p. 55-74.

Reyna-Lopez GE, Simpson J, Ruiz-Herrera J (1997) Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms. *Molecular and General Genetics MGG*, v. 253, n. 6, p. 703-710.

Santos MR, Donato SLR, Coelho EF, Arantes AM, Filho Coelho MA (2016) Irrigação lateralmente alternada em lima ácida 'Tahiti' na região norte de Minas Gerais. *Irriga, Botucatu, Edição Especial, Irrigação*, p. 71-88.

Santana-Vieira DDS, Freschi L, da Hora Almeida LA, De Moraes D S, Neves DM, Dos Santos LM, Gesteira SA (2016) Survival strategies of citrus rootstocks subjected to drought. *Scientific reports*, 6, 38775.

Soares AMS, Machado OLT (2007) Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. *Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas*, v. 1, p. 9-19.

Schulz B, Eckstein RL, Durka W (2013) Scoring and analysis of methylation-sensitive amplification polymorphisms for epigenetic population studies. *Molecular ecology resources*, v. 13, n. 4, p. 642-653.

Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*. p. 26.

Shan X, Wang X, Yang G, Wu Y, Su S, Li S, Yuan Y (2013) Analysis of the DNA methylation of maize (*Zea mays* L.) in response to cold stress based on methylation-sensitive amplified polymorphisms. *Journal of Plant Biology*, 56(1), 32-38.

Silva CRD, Folegatti MV, Silva TJAD, Alves Júnior J, Souza CF, Ribeiro RV (2005) Water relations and photosynthesis as criteria for adequate irrigation management in 'Tahiti' lime trees. *Scientia Agricola*, 62(5), 415-422.

Singh A, Jha SK, Bagri J, Pandey GK (2015) ABA inducible rice protein phosphatase 2C confers ABA insensitivity and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *PloS one*, 10(4), e0125168.

Sousa EMR, Almeida LS, Sousa ARO, Silva MC, Ledo CAS, de Almeida AAF, Gesteira AS (2018) Drought tolerance of a microcitrus when treated with paclobutrazol and exposed to different water conditions. *Scientia horticulturae*, 238, 75-82.

Springer NM (2013) Epigenetics and crop improvement. *Trends in Genetics*, v. 29, n. 4, p. 241-247.

Syvertsen JP, Garcia-Sanchez F (2014) Multiple abiotic stresses occurring with salinity stress in citrus. *Environmental and Experimental Botany*, v. 103, p. 128-137.

Tang XM, Tao X, Wang Y, Ma DW, Li D, Yang H, Ma XR (2014). Analysis of DNA methylation of perennial ryegrass under drought using the methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) technique. *Molecular Genetics and Genomics*, 289(6), 1075-1084.

Touchette BW, Marcus SE, Adams EC (2014) Bulk elastic moduli and solute potentials in leaves of freshwater, coastal and marine hydrophytes. Are marine plants more rigid? *AoB Plants* 6:plu014

Tricker P, López C, Gibbings G, Hadley P, Wilkinson M (2013) Transgenerational, dynamic methylation of stomata genes in response to low relative humidity. *International journal of molecular sciences*, 14(4), 6674-6689.

Wang W, Huang F, Qin Q, Zhao X, Li Z, Fu B (2015) Comparative analysis of DNA methylation changes in two rice genotypes under salt stress and subsequent recovery. *Biochemical and biophysical research communications*, 465(4), 790-796.

Xiong LZ, Xu CG, Maroof MS, Zhang Q (1999) Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Molecular and General Genetics MGG*, 261(3), 439-446.

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology* 57:781-803.

Yoshida T, Mogami J, Yamaguchi-Shinozaki K, (2014) ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. *Current opinion in plant biology*, v. 21, p. 133-139.

Zhang Z, Zhang Q, Wu J, Zheng X, Zheng S, Sun X, Qiu Q, Lu T (2013) Gene knockout study reveals that cytosolic ascorbate peroxidase 2 (OsAPX2) plays a critical role in growth and reproduction in rice under drought, salt and cold stresses. *PLoS ONE*, e57472.

Supplementary figure

Methodology used to immersed one leaf at a time in a solution of Absciscic Acid – ABA.

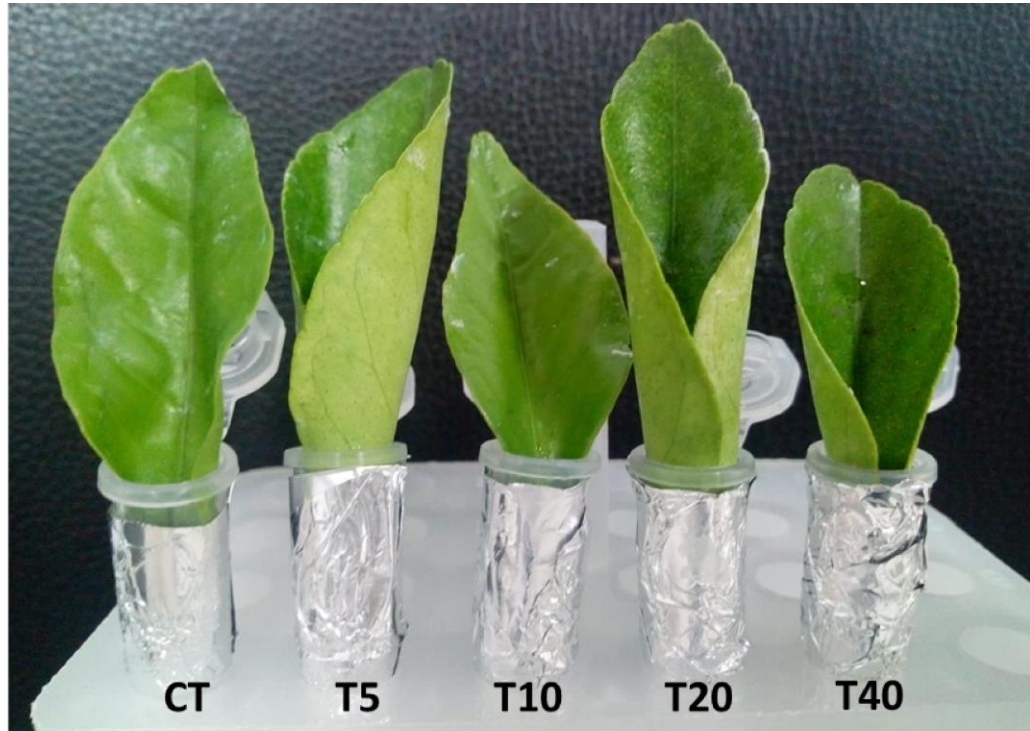


Fig. S1: Leaves of *Citrus latifolia* Tanaka (Tahiti acid lime) immersed one at a time in a solution of Absciscic Acid - ABA at the concentration of 15 ng/mL. CT (Control - deionized water); T5 (Leaf in ABA solution for 5 minutes); T10 (Leaf in ABA solution for 10 minutes); T20 (Leaf in ABA solution for 20 minutes) and T40 (Leaf in ABA solution for 40 minutes).

CAPÍTULO 2

Expressão diferencial de genes em variedades de porta-enxerto de citros submetidos a condições de déficit hídrico

Artigo em vias de tradução para ser submetido à *BMC Genomics*

Expressão diferencial de genes em variedades de porta-enxerto de citros submetidos a condições de déficit hídrico

Ariana S. Santos¹; Edson Mário de Andrade²; Andressa R. de Oliveira Sousa¹; Marcos M. do Carmo Costa³, Roberto Togawa³, Priscila Grynberg³, Carlos Priminho Pirovani¹, Saulo Alves Silva Oliveira⁴, Walter S. Soares Filho⁴, Mauricio Antônio Coelho Filho⁴, Abelmon S. Gesteira⁴ e Cláudia F. Ferreira^{4*}

¹Departamento de Biologia, Centro de Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus – Bahia. ²Departamento de Bioinformática, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – Minas Gerais. ³Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – Distrito Federal. ⁴Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas – Bahia.

*Correspondence: Cláudia Fortes Ferreira - claudia.ferreira@embrapa.br

Abelmon da Silva Gesteira - abelmon.gesteira@embrapa.br

Resumo: ‘Sunki Maravilha’ e ‘Sunki Tropical’ são plantas cítricas apontadas como alternativas de porta-enxertos para ambientes de restrição hídrica, no entanto, os perfis de expressão gênica responsivos à seca desses genótipos permanecem amplamente inexplorados. Neste estudo, os transcriptomas dos porta-enxertos, ‘Sunki Maravilha’ e ‘Sunki Tropical’ foram analisados usando a técnica de RNA-seq, tecnologia Illumina HiSeq-2500 sob condições de controle e déficit hídrico. Um total de 109.114.164 *reads* foram produzidas e mapeadas contra o genoma de referência *Citrus sinensis* (versão 1.1). 3.607 transcritos mostrou variação significativa da expressão, entre os tratamentos controle e estresse por seca, com 739 genes induzidos e 2868 reprimidos por déficit hídrico. Os genes diferencialmente expressos (DEGs) identificados estão envolvidos em mais de 100 processos biológicos e função molecular, na sua maioria, enriquecidos na função da oxidoreductase, fosforilação de proteínas, regulação transcricional, processos de ligação e resposta ao estresse oxidativo. Também foram identificados DEGs relacionados à biossíntese do ABA, ao sistema redox, ao mecanismo de parede celular, desenvolvimento de raiz, incluindo fatores de transcrição (TFs) e proteínas Kinases (Pks). Esses resultados contribuem para a expansão da base molecular, com diferentes alternativas de porta – enxertos, ‘Sunki Maravilha’ e Sunki Tropical’, que com base nos nossos resultados assumem diferentes estratégias de sobrevivência à seca.

Palavras – Chave: Citros, Seca, Transcriptoma, RNA-Seq, Sunki, Raiz.

INTRODUÇÃO

As plantas possuem mecanismos integrados de sinalização e resposta para se adaptarem aos ambientes em constantes alterações (Zhang et al., 2016) e os efeitos das mudanças climáticas, a exemplo da seca, têm sido um dos principais fatores que ameaça a segurança alimentar global. Espera-se que os períodos de seca aumentem em intensidade, frequência e extensão geográfica, tornando-se uma questão emergencial, atual e futura, para as principais culturas de importância econômica em relação às suas adaptações às adversidades ambientais (Gonçalves et al., 2019).

As plantas para garantir a eficiência do uso da água em condições de seca desenvolveram diferentes estratégias de sobrevivência, como evitar ou tolerar a desidratação. A estratégia de evitar a desidratação, normalmente utilizada por plantas em condições de restrição hídrica moderada, busca como respostas, o desenvolvimento das raízes e fechamento estomático, visando a manutenção do metabolismo e crescimento. A estratégia de tolerar a desidratação está muito associada à resposta a períodos de seca mais severos. Nessa estratégia, a planta desenvolve mecanismos de proteção aos danos celulares, acúmulo de proteínas na manutenção da turgescência celular e expressão de enzimas antioxidantes para eliminação das espécies reativas de oxigênio (ROS), onde o objetivo é garantir a sobrevivência da planta após o estresse (Chaves et al. 2004; Verslues et al., 2006; Salekdeh et al. 2009; Claeys e Inzé, 2013)

No caso das plantas cítricas, essas também desenvolveram diferentes estratégias de sobrevivência para evitar ou tolerar a desidratação, no entanto, a maior ou menor tolerância dos citros ao déficit hídrico, é altamente influenciada não somente pelo porta-enxerto (PE), mas também pela combinação copa x porta-enxerto (Santana-Vieira et al. 2016).

O *Citrus*, gêneros relacionados e seus híbridos, constituem a base econômica mundial, destacando-se a laranja doce, que representa 60% da produção total de citros (FAO, 2019). Apesar dessa representatividade, o cultivo da laranja tem sido limitado devido aos longos períodos de estiagem caracterizados pela seca, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Sentelhas, 2005).

A diversidade de porta-enxertos que conferem tolerância à seca na citricultura ainda é limitada, prevalecendo o uso do limão ‘Cravo’, que confere uma tolerância aprimorada à seca, em comparação com outros porta-enxertos de citros. Esse porta-enxerto ainda é o mais utilizado na indústria citrícola brasileira, apesar de ser suscetível

a doenças, como a ferrugem e a morte súbita dos citros (Bassanezi et al., 2003; Gonçalves et al., 2019). Por esse motivo, a Embrapa Mandioca e Fruticultura tem buscado aumentar a base genética dos PEs de *citrus* com o desenvolvimento de novas variedades, a exemplo das tangerinas ‘Sunki’, denominadas de ‘Sunki Tropical’ e ‘Sunki Maravilha’, que vem se destacando por apresentarem boa resistência à gomose causada pelo fungo *Phytophthora* e tolerância à seca, que a depender da copa, pode ser similar à do Limão ‘Cravo’ (Soares Filho et al. 2002; 2003).

Estudos preliminares com o porta-enxerto ‘Sunki Maravilha’ revelaram diferentes padrões de captação de água no solo e perfis de proteínas das raízes quando submetida aos diferentes regimes hídricos, indicando diferentes estratégias de sobrevivência à seca (Neves et al. 2013; Oliveira et al. 2015). Também foi demonstrado que o PE tangerina ‘Sunki Maravilha’, apresenta estratégia de tolerar a desidratação a depender da severidade e duração do déficit hídrico (Santana-Vieira et al. 2016). A fim de selecionar novas combinações de porta-enxertos, Carvalho et al. (2019) apresentaram a ‘Sunki Tropical’ como alternativa para diversificação genética dos pomares por apresentar alto rendimento de frutos de qualidade média sob condição de solo sequeiro, apresentando também resistência à podridão causada por *Phytophthora* spp. e boa compatibilidade com copas cítricas comerciais.

No entanto, as respostas de ‘Sunki Maravilha’ e ‘Sunki Tropical’ ao déficit hídrico são pouco compreendidas em nível molecular. Estudos utilizando análise por sequência expressa (EST), Microarranjo, RNA-seq já foram desenvolvidos para algumas plantas cítricas de importância, tais como: limão ‘Cravo’, tangerinas ‘Clemenules’ e ‘Cleopatra’, citrumelo Swingle, híbridos de Microcitrangemonia, laranja doce enxertada em limão ‘Cravo’, estando estas submetidas a diferentes estresses, bióticos ou abióticos (Boscariol-Camargo et al., 2007; Gimeno et al., 2009; Zhang et al. 2016; Sousa et al., 2018; Gonçalves et al., 2019).

Sendo assim, para avançar o entendimento sobre as respostas moleculares em relação à tolerância à seca induzida pelos porta-enxertos ‘Sunki Maravilha’ e ‘Sunki Tropical’ tendo como copa a laranjeira ‘Valência’, pela primeira vez o perfil transcriptômico, via sequenciamento de RNA (RNA-Seq), dos conjuntos de RNA obtidos das raízes de ‘Sunki Maravilha’ e ‘Sunki Tropical’ durante imposição de déficit hídrico, são relatados em nosso trabalho. Vários genes cítricos hiper-responsivos ao déficit hídrico que podem ser utilizados como genes candidatos para compreender os

mecanismos da seca, um estresse considerado multidimensional, além de induzir a tolerância, foram identificados. Genes diferencialmente expressos relacionados à biossíntese do ABA, ao sistema redox, ao mecanismo de parede celular, desenvolvimento de raiz, incluindo fatores de transcrição (TFs) e proteínas Kinases (Pks), são relatados.

Materiais e Métodos

Material Vegetal

Porta-enxertos de plantas cítricas, *Citrus sunki* (Tangerina Sunki Maravilha e Tangerina Sunki Tropical), variedades que exibem diferentes mecanismos de tolerância à seca, foram utilizados em combinação com *Citrus sinensis* (L.) Osb. (Laranja Valência), copa comercial de grande importância econômica, no processo de enxertia. As sementes dos porta-enxertos e as copas, oriundas de borbulheiras, foram obtidas da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Após a enxertia, as combinações de Valência/‘Sunki Maravilha’ (VO/SM) e Valência/‘Sunki Tropical’ (VO/ST), com um ano de idade foram transferidas para vasos de 45 L contendo latossolo vermelho amarelo e submetidas a tratamento de controle (plantas mantidas sob irrigação permanente) e estresse por seca (plantas expostas à suspensão completa da irrigação). A umidade do solo foi monitorada em dias intercalados usando uma sonda de reflectometria no domínio do tempo (TDR) para cada combinação em vaso. Quando o potencial hídrico na folha da planta, que foi medido antes do amanhecer atingiu valores de $\leq -2,0$ Mpa e $\geq -0,5$ Mpa, estressado por seca e controle, respectivamente, foram coletadas imediatamente as raízes de três plantas de cada combinação (réplica biológica) e feito um *pool* para a construção de duas réplicas técnicas das variedades ‘Sunki Maravilha’ e ‘Sunki Tropical’, usadas como porta-enxertos. A coleta das raízes ocorreu sob as mesmas práticas agrícolas, uma coleta destrutiva, para minimizar a influência de fatores ambientais.

Isolamento de RNA e construção das bibliotecas de RNA-seq

O RNA total das raízes dos porta-enxertos foi extraído, seguindo o protocolo de extração de Gambino (2008), com modificações. O RNA foi tratado sequencialmente com DNase Turbofree (kit da Ambion®), de acordo com as instruções do fabricante. A

qualidade e a concentração do RNA extraído foram avaliadas por análise de High sensitivity RNA eletrophoresis - RIN (RNA Integrity Number) – por meio do RNA pico software pela empresa Eurofins. Os *pools* de RNA de cada planta foram replicados, para a construção das bibliotecas de cDNA, duplicadas independentes e com concentrações equimolares, para os tratamentos de controle e seca. As amostras de RNA foram enviadas à Eurofins Genomic (França) para purificação de mRNA, construção das bibliotecas de cDNA e sequenciamento. O sequenciamento foi realizado mediante a técnica de RNA-seq, tecnologia Illumina HiSeq-2500 gerando ‘*paired end*’ reads de até 150 pb.

Análise do sequenciamento

Os reads de até 150 pb tiveram a qualidade verificada pela ferramenta FASTQC (versão 0.11.5) e foram posteriormente processados pela ferramenta Trimmomatic (versão 0.36) para remoção de bases de baixa qualidade e obtenção de reads limpos. O software STAR (versão 2.6.0) foi empregado para realizar o mapeamento dos reads processadas contra o genoma de referência de *Citrus sinensis* versão 1.1 obtido no portal Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>). Após a quantificação dos transcritos, foi conduzida uma análise geral, determinado quais foram exclusivos em ‘Sunki Maravilha’ e ‘Sunki Tropical’ nos diferentes tratamentos de controle e déficit hídrico, através do Diagrama de Venn com o uso do pacote EDGE-R do ambiente estatístico do programa R, assim como, também foi construído um Heat Map a partir dos transcritos em comum apresentados entre ‘Sunki Maravilha’ e ‘Sunki Tropical’, nos diferentes tratamentos.

Análise de expressão diferencial

A análise de expressão diferencial foi conduzida para ‘Sunki Maravilha’ e ‘Sunki Tropical’ entre os tratamentos controle e déficit hídrico e entre os tratamentos de déficit hídrico de cada combinação, com o uso do software RSEM associado aos pacotes edgeR e DESeq2 do ambiente estatístico R. Foram considerados como diferencialmente expressos os genes que apresentaram valor de Fold Change ≥ 2 e p-value < 0.001 em ambos pacotes.

Anotação funcional

A anotação funcional foi realizada a partir do alinhamento dos transcritos do genoma de *Citrus sinensis* contra as sequências de proteínas do banco de dados Uniref do Uniprot com a ferramenta blastx do software diamond (versão 0.9.8.109). As sequências que apresentaram alinhamento com e-value > 0.001 e identidade $\geq 50\%$ foram submetidas a mapeamento e posterior anotação funcional contra o banco de dados do Gene Ontology com o software BLAST2GO (versão 5). O conjunto de genes diferencialmente expressos foi submetido à análise de enriquecimento por meio do pacote GSEABase do Bioconductor executado no ambiente R (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/GSEABase.html>).

Análise de rede de interação

As redes de interação proteína – proteína (PPI) foram realizadas considerando os genes diferencialmente expressos com valor de Fold Change ≥ 2 e p-value <0.001, utilizando o banco de proteínas String (versão 10.5), alinhando ao genoma de *Citrus sinensis* (versão 1.1). Foram utilizados parâmetros de alto escore de confiança (0,700) e as matrizes de redes extraídas de STRING foram submetidas ao software Cytoscape (versão 3.7.1) para o uso da ferramenta de redes de mesclagem. O arquivo de interação extraído do Cytoscape foi utilizado para análise de centralidade (betweenness and degree) a fim de detectar os nós ‘hubs’ e ‘gargalo’, utilizando o plug-in CentiScaPe®.

A análise de agrupamento de ontologia gênica foi realizada utilizando o software Biological Network Gene Ontology (BiNGO) (versão 2.44), um plugin do Cytoscape. O grau de enriquecimento funcional para um determinado cluster e categoria foi avaliado quantitativamente (valor p) por distribuição hipergeométrica e uma correção de múltiplos testes foi aplicada usando o algoritmo de taxa de descoberta falsa (FDR-False Discovery Rate). Os clusters foram identificados pelo *fastgreedy.community* e os respectivos processos biológicos super-representados com valores p , identificados pela interface BiNGO.

Análise de classes funcionais

O software MapMan (versão 3.6.0 RC1) foi usado como uma ferramenta para visualizar as classes funcionais significativamente afetadas pelo tratamento da seca em forma de diagramas demonstrando processos metabólicos ou rotas.

RESULTADOS

Controle de qualidade do sequenciamento

Os 109.114.164 *reads* obtidos por sequenciamento e filtrados pelo Trimmomatic foram processados e alinhados pela ferramenta Start, com o genoma de referência de *Citrus sinensis*, não sendo inferior a 20M para cada amostra. Os níveis de expressão de um total de 78.916 transcritos únicos foram quantificados e normalizados pelo método FPKM (*Fragments Per Kilobase Of Exon Per Million Fragments Mapped*) com objetivo de eliminar vieses relacionados aos diferentes tamanhos dos transcritos.

A reprodutibilidade do sequenciamento é demonstrada nas análises de componentes principais (PCA), cujas réplicas biológicas dos mesmos tratamentos das diferentes plantas cítricas ('Sunki Maravilha' e 'Sunki Tropical') se agruparam no mesmo quadrante (Figura Suplementar 1 A-B), sendo explicado pelos componentes 1 e 2, que somaram um total de 99,56 % e 99,24% para 'Sunki Tropical' e 'Sunki Maravilha' nas condições controle e déficit hídrico, respectivamente. Essa análise explica a variabilidade entre os tratamentos, ratificando a qualidade e reprodutibilidade do sequenciamento.

A Figura 1 representa os transcritos que foram exclusivos entre 'Sunki Maravilha' e 'Sunki Tropical' nas condições de controle e restrição hídrica, a partir do total de transcritos obtidos no sequenciamento.

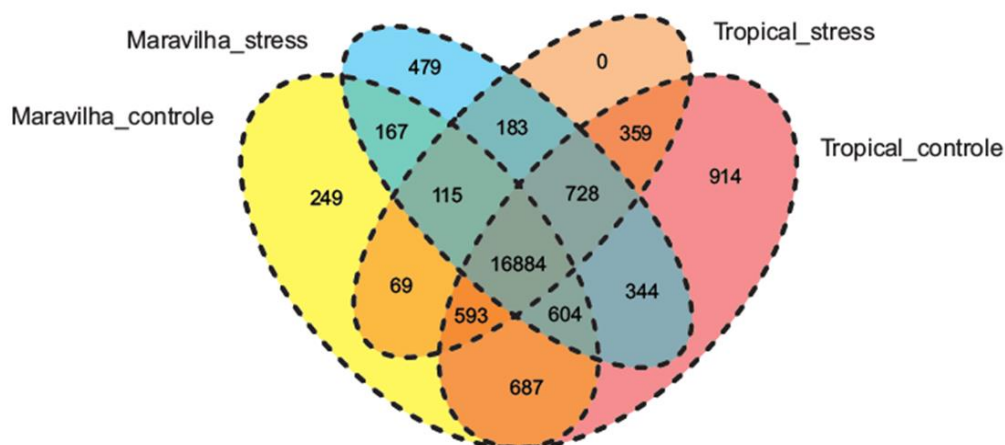


Figura 1: Diagrama de Venn de transcritos exclusivos ou não identificados no sequenciamento em relação aos tratamentos e os genótipos de citros. O diagrama ilustra o número de transcritos identificados em: 'Sunki Tropical' na condição de controle (Tropical_controle) e de déficit hídrico (Tropical_stress);

‘Sunki Maravilha’ expostas ao déficit hídrico (Maravilha_stress) e ao tratamento irrigado (Maraviha_controle) e suas sobreposições.

‘Sunki Tropical’ na condição de controle (Tropical_controle) apresentou 914 transcritos exclusivos, no entanto, no tratamento de déficit hídrico (Tropical_stress) não demonstrou exclusividade dos transcritos baseados no sequenciamento, apresentando apenas transcritos em comum com os demais tratamentos de ‘Sunki Maravilha’. Nos tratamentos de restrição hídrica (Maravilha_stress) e controle (Maravilha_controle), em ‘Sunki Maravilha’, foram detectados 479 e 249 transcritos exclusivos, respectivamente. No entanto, 21,39% dos transcritos identificados, que correspondem a 16.884 são em comum, ou seja, estão sobrepostos entre os diferentes genótipos nos diferentes tratamentos.

O Heat Map apresenta 16.884 transcritos em comum entre ‘Sunki Maravilha’ e ‘Sunki Tropical’, nos diferentes tratamentos. A partir do método de agrupamento Complete, alguns processos biológicos foram associados e agrupados em diferentes clusters (Figura 2). O maior número de transcritos acumulados está em ‘Sunki Tropical’, na condição de controle (Tropical_controle) e déficit hídrico (Tropical_stress). Sete clusters foram formados, associados aos processos biológicos, como: redução de oxidação, organização de parede celular, processos metabólicos de glicoproteínas, respostas à estímulos abióticos, entre outros.

No cluster 1 o processo biológico de redução de oxidação é bastante representado em condições bem irrigadas para ‘Sunki Maravilha’ e também para ‘Sunki Tropical’. Ainda sobre o processo biológico de redução de oxidação, no cluster 4, os transcritos correspondentes estão acumulados apenas para ‘Sunki Maravilha’ na condição de seca (Maravilha_stress).

Os transcritos endereçados para respostas a estímulos abióticos estão bem representados em ‘Sunki Tropical’ na condição de déficit hídrico (Tropical_stress), no cluster 5. Assim como os transcritos para organização de parede celular no tratamento controle (Tropical_controle) no cluster 2, entretanto, esse acúmulo não permanece no tratamento de seca (Tropical_stress).

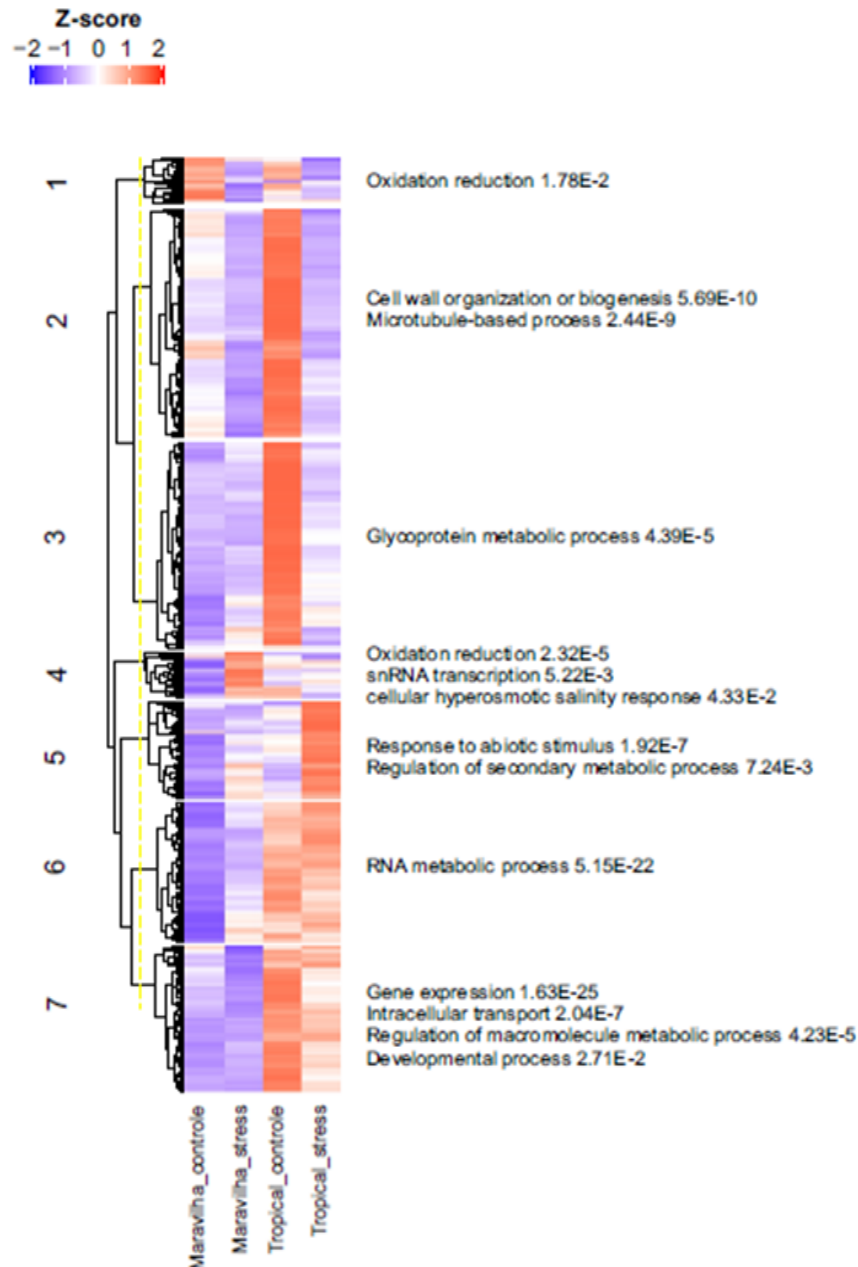


Figura 2: Heat map com Distância Euclidiana representando os transcritos em comum entre ‘Sunki Maravilha’ e ‘Sunki Tropical’ nos tratamentos de controle (irrigação permanente) e déficit hídrico. Sete clusters sendo representados e enriquecidos com seus respectivos processos biológicos. Método de agrupamento Complete.

Análise diferencial de expressão gênica (DEGs)

Um total de 3.607 transcritos mostrou variação significativa ($p \leq 0,001$) ($FC \geq +2,0$ ou $\leq -2,0$ vezes) da expressão, entre os tratamentos controle e estresse por seca, com 739 genes induzidos e 2868 reprimidos por déficit hídrico. As comparações da

expressão gênica (*pairwise*) desses transcritos estão representadas na Figura 3 (A-B), onde os gráficos MA Plot demonstram uma escala do nível de intensidade da expressão, calculada em FPKM e mudança de expressão ocorrida entre os tratamentos controle e déficit hídrico para ‘Sunki Maravilha’ e ‘Sunki Tropical’. Essa análise correlaciona a variação logarítmica média da expressão gênica nos grupos amostrais (controle x déficit hídrico) (Fig. 3 A-B) e a intensidade da expressão. As análises de Volcano Plot, que correlacionam a alta significância estatística representam a mudança de expressão entre os tratamentos a partir de um *p-value* corrigido (*q*-valor). Juntos indicam a expressão diferencial de unigenes do transcriptoma de ‘Sunki Maravilha’ e ‘Sunki Tropical’ apontando genes induzidos, aqueles com FC relevante e genes diferencialmente expressos e não significativos, representados por pontos vermelhos e azuis, respectivamente.

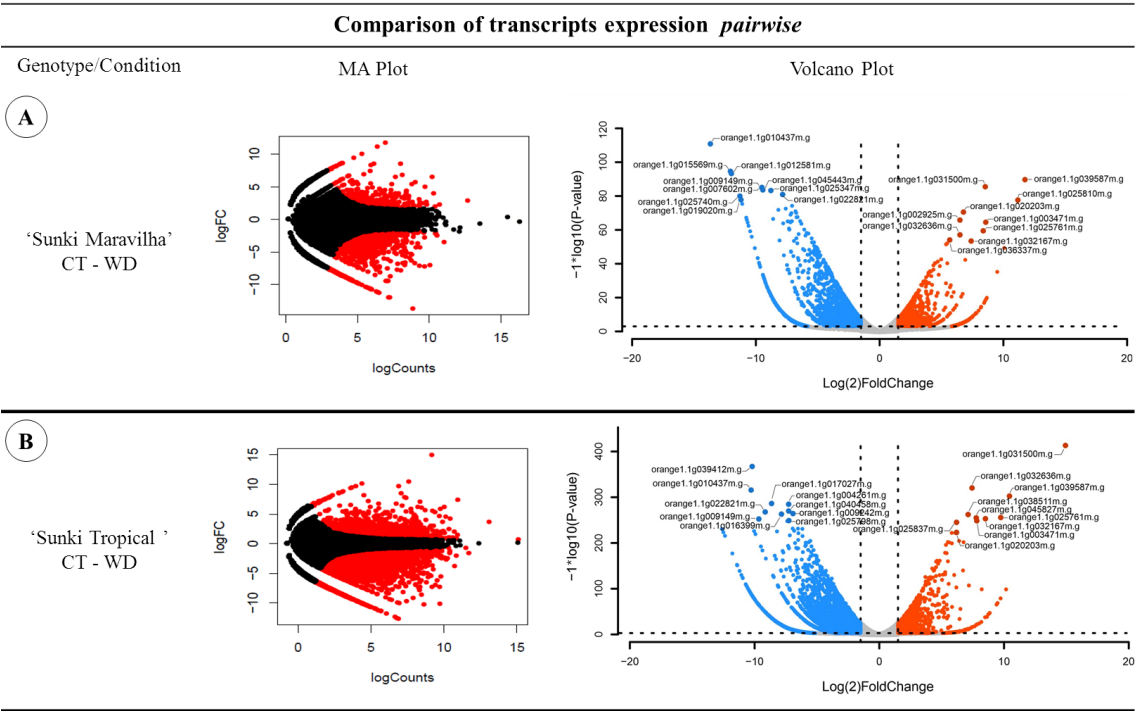


Figura 3: Comparação da expressão gênica pairwise (par a par) de ‘Sunki Maravilha’ (A), ‘Sunki Tropical’ (B) na condição de controle (CT) e de déficit hídrico (WD). MA Plot: representa a mudança de expressão ocorrida entre as condições. O eixo “y” representa a razão do nível de expressão das amostras, em escala logarítmica (logFC), e o eixo “x” representa a intensidade de expressão, calculada em FPKM. Pontos pretos são unigenes com expressão considerados similares e pontos vermelhos são aqueles expressos diferencialmente entre os tratamentos. Volcano Plot: O eixo “y” representa o *p-value* corrigido (*q*-valor) em escala logarítmica, que é diretamente proporcional a significância do logFC entre CT e WD

(A e B) e entre WD e WD (C) ; o eixo “x” representa a mudança de expressão ocorrida entre as condições. Pontos azuis são unigenes com variação de expressão não significativa ($p > 0.001$ e $\log FC < 2$ ou > -2) e pontos vermelhos são os diferencialmente expressos ($p < 0.001$ e $\log FC > 2$ ou < -2).

Classificação funcional dos DEGs

Para classificar funcionalmente os DEGs foi utilizado o banco de dados Gene Ontology (GO). Com base nas anotações do Uniref/Uniprot, 739 genes induzidos e 2868 reprimidos por déficit hídrico, receberam termos GOs. O enriquecimento dos termos de Ontologia Gênica utilizando a ferramenta GSEABase do Bioconductor para verificar a significância dos DEGs, foi realizado para ‘Sunki Tropical’ comparada a ‘Sunki Maravilha’; ambas em condições de restrição hídrica e para ‘Sunki Maravilha’ comparada a ‘Sunki Tropical’, ambos genótipos também no tratamento de déficit hídrico.

Na comparação entre ‘Sunki Tropical’ e ‘Sunki Maravilha’, na categoria de processos biológicos (Figura Suplementar 2A), a regulação do processo transcricional (28,26 %) foi o maior grupo, seguido de fosforilação de proteínas (7,7%) e resposta ao estresse oxidativo (4,4 %). Visto que, ainda para essa comparação, a categoria de função molecular (Figura Suplementar 2B), processos de ligação como: heme binding, zinc ion binding, iron ion binding, ATP binding, somaram 51,4 %, seguidos de DNA-binding transcription fator activity (16,11 %) e atividade transportadora transmembranar (5,3 %) foram os mais representativos.

Na categoria de processos biológicos (Figura suplementar 3A) para ‘Sunki Maravilha’ comparada a ‘Sunki Tropical’, tais processos como: redução de oxidação (18,1%) e fosforilação de proteínas (13,22 %) foram os mais enriquecidos. Em função molecular (Figura Suplemntar 3B) os processos relacionados à ligação como: ATP binding, ADP binding, iron ion binding representaram 37, 13 %. Atividade de proteínas kinase (13,12 %) e atividade de oxiredutase (10,9 %), também foram enriquecidos.

Análises adicionais de redes de interação proteínas – proteínas (PPI) foram feitas a partir dos DEGs, considerando $p \leq 0,001$ e $FC \geq + 2,0$ ou $\leq - 2,0$ vezes. Quatro conjuntos de proteínas selecionados para o tratamento de déficit hídrico, dois para ‘Sunki Maravilha’, com proteínas codificadas de transcritos *down* regulados e *up* regulados (Figura 4 A-B) e dois conjuntos, formados para ‘Sunki Tropical’(Figura 5 A-

B). As interações proteína-proteína (PPI), cujo escore de confiança foi 0,700, foram usadas para construir as redes usando a ferramenta Cytoscape para cada conjunto.

A rede PPI para ‘Sunki Maravilha’ *down* regulada é composta por nós, que de acordo com seu tamanho, representam o valor da expressão dos respectivos transcritos, baseado na escala de $\log_{2}FC$ ($< -13 > -2$) (Figura 4A). O processo de clusterização para esta rede gerou dez clusters com os seguintes processos biológicos super-representados dos transcritos *down* regulados: Ciclo celular ($0.00e^{-100}$), desenvolvimento de raiz ($2,13e^{-15}$), resposta ao estresse ($4,7e^{-10}$), fechamento estomático ($8.3536e^{-5}$). A rede PPI que representa os transcritos *up*-regulados em ‘Sunki Maravilha’ em condição de seca, é representada por quatro clusters e enriquecidos com suas funções relacionadas com: processo metabólico de Ácido Abscísico ($7,51e^{-7}$), processo metabólico de hexose ($2,69e^{-48}$), transporte (9,14 e^{-9}).

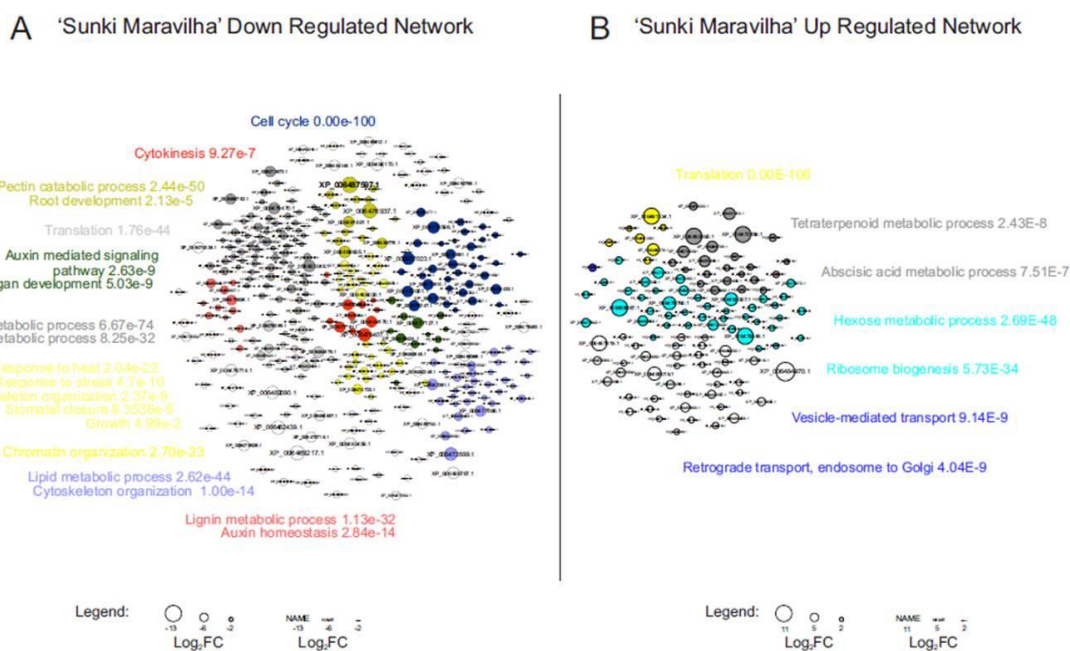


Figura 4: Análise de cluster e processos biológicos das redes de interação proteína – proteína (PPI) de transcritos *down*-regulados (A) e *Up*-regulados (B). As proteínas foram indicadas com os nós, baseadas no $\log_{2}FC \geq 2$ e o $p < 0,001$. **A** – representação das proteínas de ‘Sunki Maravilha’ codificadas por transcritos *down*-regulados na condição de déficit hídrico (WD) e a representação de dez clusters e suas respectivas funções. **B** - representação das proteínas de ‘Sunki Maravilha’ codificadas por transcritos *up*-regulados na condição de déficit hídrico (WD) e a representação de quatro clusters e suas respectivas funções. Os tamanhos dos nós e dos nomes das proteínas são proporcionais ao valor de expressão do respectivo transcrito. As cores dos nós representam os diferentes clusters identificados pelo *fastgreedy.community* e são respectivas aos processos biológicos super-representados com respectivos valores p , identificados pelo BiNGO .

As redes de interação proteína – proteína (PPI) de ‘Sunki Tropical’ também representam as proteínas correspondentes aos DEGs *down* (Figura 5A) e *up*- (Figura 5B) regulados. A rede representada na Figura 5A está categorizada em treze clusters super-representados com seus respectivos processos biológicos tais como: desenvolvimento de órgãos ($3,56 \times 10^{-16}$), desenvolvimento complexo de estômatos ($7,08 \times 10^{-14}$), processos biossintéticos de auxinas ($2,61 \times 10^{-17}$), desenvolvimento de raiz ($2,65 \times 10^{-14}$). As proteínas *up*-reguladas para ‘Sunki Tropical’ estão representadas na rede da Figura 5B, composta por seis clusters oriundos da análise de clusterização. Os clusters agruparam proteínas associadas ao processo metabólico de ácido nucléico ($2,97 \times 10^{-77}$), processos biossintéticos de giberelina ($2,09 \times 10^{-15}$), tradução ($0,00 \times 10^{-100}$), processo metabólico de amido ($9,97 \times 10^{-33}$).

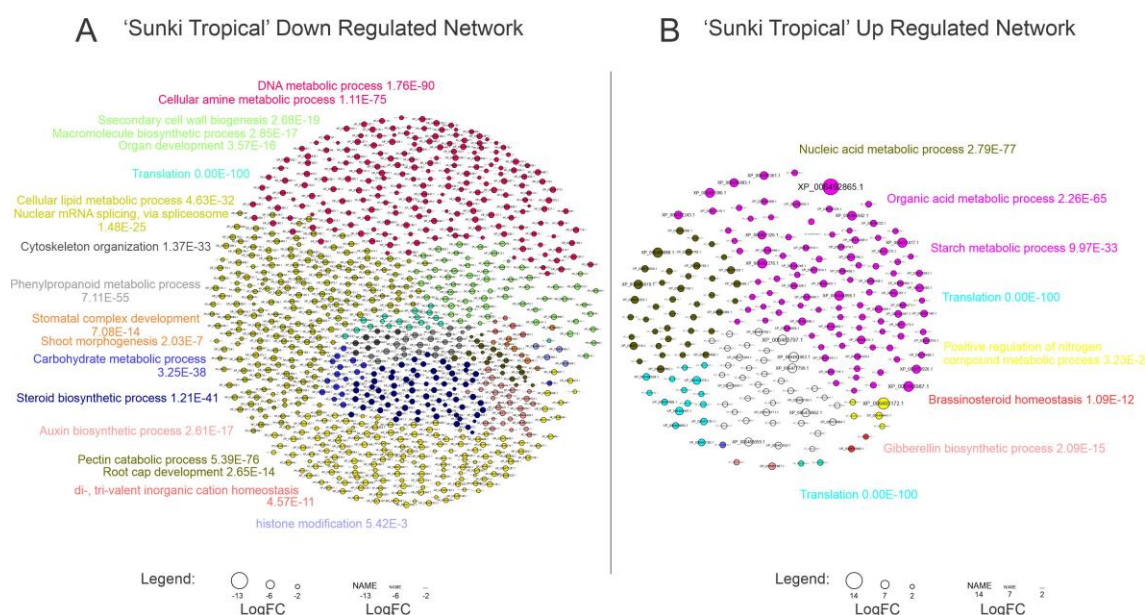


Figura5: Análise de cluster e processos biológicos das redes de interação proteína – proteína (PPI) de transcritos *down*-regulados (A) e *up*-regulados (B). As proteínas foram indicadas com os nós, baseadas no $\logFC \geq 2$ e o $p < 0,001$. **A** – representação das proteínas de ‘Sunki Tropical’ codificadas por transcritos *down*-regulados na condição de déficit hídrico (WD) e a representação de treze clusters e suas respectivas funções. **B** - representação das proteínas de ‘Sunki Tropical’ codificadas por transcritos *up*-regulados na condição de déficit hídrico (WD) e a representação de seis clusters e suas respectivas funções. Os tamanhos dos nós e dos nomes das proteínas são proporcionais ao valor de expressão do respectivo transcrito. As cores dos nós representam os diferentes clusters identificados pelo *fastgreedy.community* e são respectivas aos processos biológicos super-representados com respectivos valores p , identificados pelo BiNGO.

Grupos funcionais de genes diferencialmente regulados pelo déficit hídrico para os genótipos ‘Sunki Tropical’ e Sunki Maravilha’ foram visualizados de forma

esquemática usando o software MapMan (versão 3.6.0 RC1), o que inclui genes envolvidos no metabolismo, resposta celular, regulação e receptor do tipo quinase. A visão geral está demonstrada nas Figuras 6 e 7 para ‘Sunki Tropical’ e Sunki Maravilha’, respectivamente.

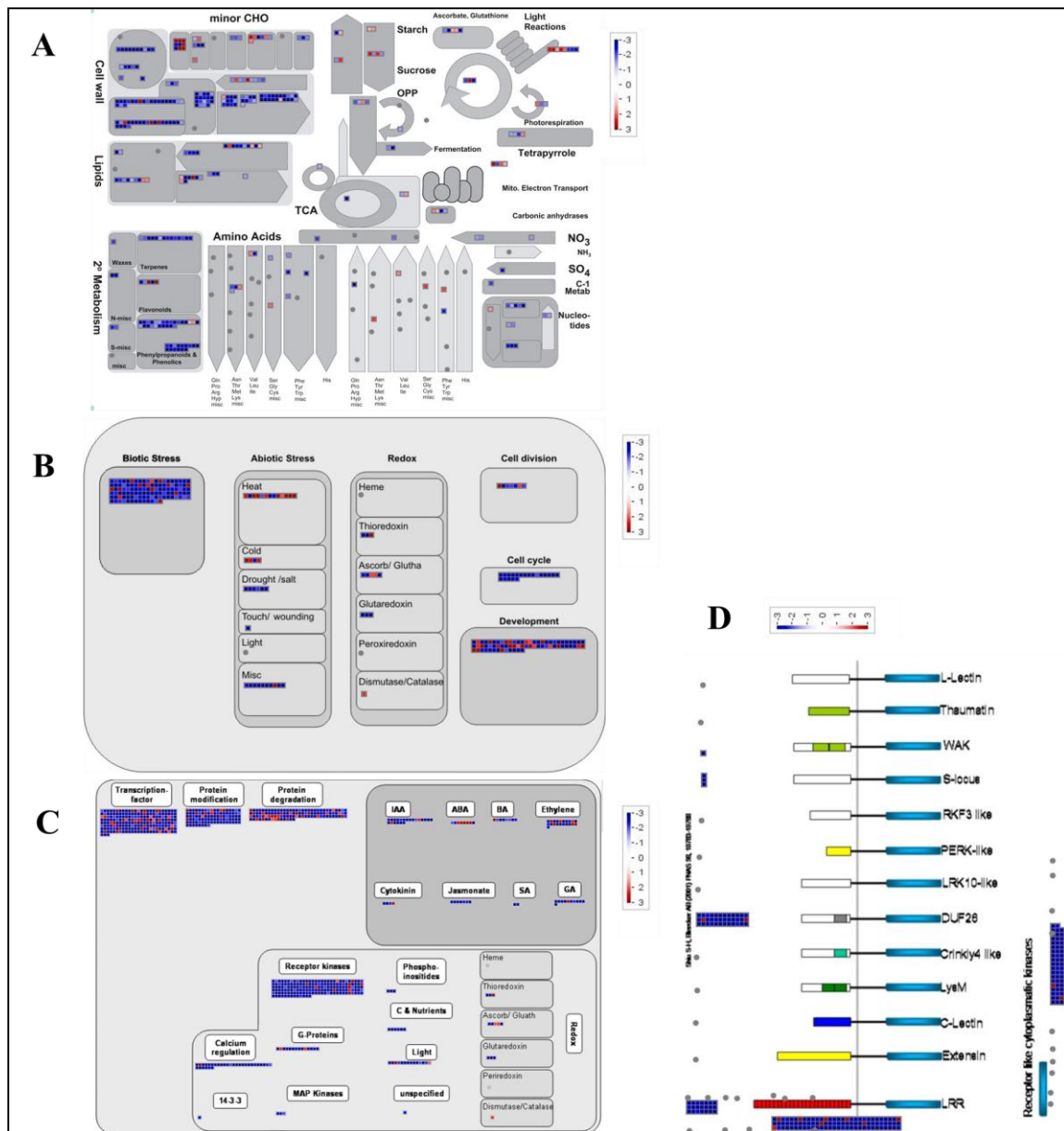


Figura 6: Genes diferencialmente expressos associados a processos metabólicos (A), respostas celulares (B), regulação (C) e receptor quinase (D) em raiz de ‘Sunki Tropical’ em condições de restrição hídrica. Pontos azuis indicam genes *down*-regulados e os pontos vermelhos os genes *up*-regulados.

De acordo com os DEGs para ‘Sunki Tropical’, na sua maioria nas vias metabólicas, estão reprimidos, com exceção do ascorbato e glutatona; moléculas

fundamentais para manutenção do sistema redox da planta e alguns genes que fazem parte da rota de fotorrespiração. Genes do metabolismo secundário envolvidos na biossíntese dos flavonoides, ceras, fenilpropanoides, em condição de seca, tem sua expressão reprimida, como mostra a Figura 6 A.

Em relação às respostas celulares de ‘Sunki Tropical’ em condições de seca (Figura 6B), 247 DEGs estão envolvidos em resposta de estresse biótico, a sua maioria *down*-regulados. No entanto, quando se observa a expressão dos genes responsáveis em resposta ao estresse abiótico, a maioria estão *up*-regulados, assim como os DEGs envolvidos no processo de desenvolvimento deste genótipo.

Uma visão geral dos processos de regulação para ‘Sunki Tropical’ sob restrição hídrica está demonstrada na Figura 6C. Duzentos e três DEGs codificam fatores de transcrição (TFs), onde a maioria corresponde aos fatores de transcrição da família *AP2*. Processos de modificações das proteínas como glicosilação e fosforilação, permanecem reprimidos em condições de seca. As biossínteses dos hormônios, jasmonato (JA), ácido salicílico (SA) e brassinosteróides (BA), encontram-se reprimidos em ‘Sunki Tropical’, em condições estressadas, visto que hormônios como o ácido abscísico (ABA), ácido indolacético (IAA) e o etileno, que induzem respostas fundamentais em condições de seca, apresentam expressão *up*-regulada. O sistema redox de ‘Sunki Tropical’ sobre tratamento de déficit hídrico mostra-se eficiente com a maioria dos DEGs envolvidos com a expressão da enzima dismutase, moléculas do ascorbato e glutathione, *up*-regulados.

A Figura 6D representa 147 DEGs relacionados aos receptores quinases em ‘Sunki Tropical’ em condições de déficit hídrico. Grande parte dos DEGs envolvidos na regulação desses receptores estão reprimidos nesta condição, com exceção de oito transcritos que apresentam-se *up*-regulados e que estão relacionados com receptor quinase de leucina.

As classes funcionais significativamente afetadas pelo tratamento da seca de ‘Sunki Maravilha’, estão representadas na Figura 7 A-D.

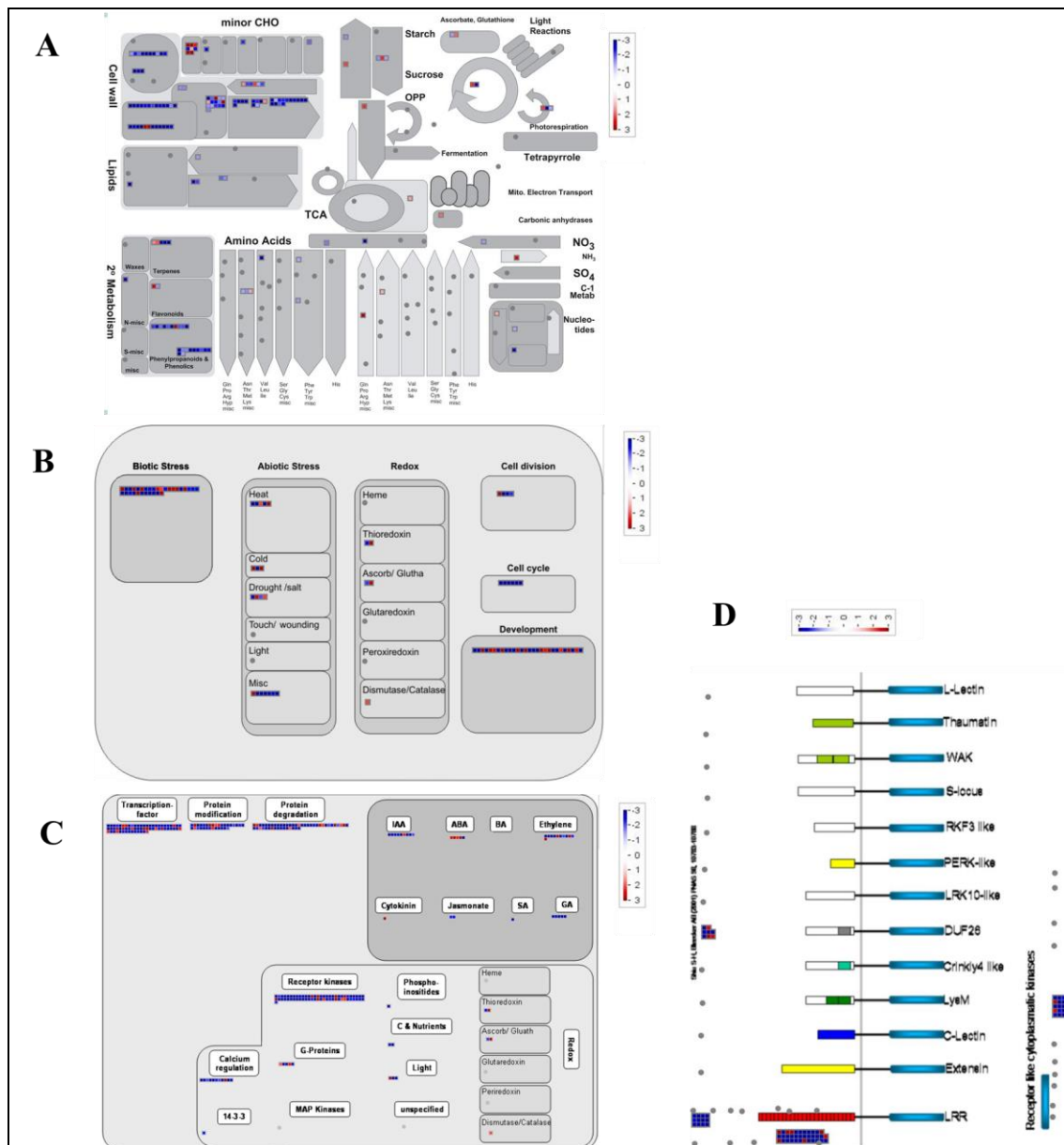


Figura 7: Genes diferencialmente expressos associados a processos metabólicos (A), respostas celulares (B), regulação (C) e receptor quinase (D) em raiz de ‘Sunki Maravilha’ em condições de restrição hídrica. Pontos azuis indicam genes down-regulados e os pontos vermelhos os genes *up*-regulados.

A visão geral da regulação da expressão dos processos metabólicos de ‘Sunki Maravilha’ representados na Figura 7A são semelhantes aos encontrados em ‘Sunki Tropical’. Vias metabólicas do ciclo celular e dos lipídios estão totalmente reprimidos em condições de seca. No entanto, as vias metabólicas do ascorbato, glutathione e da fotorrespiração, encontram-se *up*-regulados. No ciclo TCA, apesar de ser pouco representativo com oito transcritos, os DEGs apresentados estão *up*-regulados em ‘Sunki Maravilha’ sob tratamento de seca. Os aminoácidos representados estão *down*-

regulados, assim como os fenilpropanoides envolvidos no metabolismo secundário, com exceção da cera, que em ‘Sunki Maravilha’, está ausente e os flavonoides, *up*-regulados.

A Figura 7 B apresenta 85 DEGs relacionados a respostas celulares de ‘Sunki Maravilha’ em condições de seca. Os DEGs envolvidos em resposta do estresse biótico, na sua maioria estão reprimidos, visto que a regulação expressão dos genes responsáveis por respostas ao estresse abiótico estão *up*-regulados, podendo destacar a regulação positiva para os genes envolvidos em resposta ao estresse por seca, frio e calor, assim como os DEGs envolvidos no processo de desenvolvimento deste genótipo.

Em relação às vias de regulação de ‘Sunki Maravilha’ sob restrição hídrica (Figura 7C), os fatores de transcrição estão *down*-regulados na sua maioria, bem como os processos de modificações de proteínas. As rotas biossintéticas dos hormônios em ‘Sunki Maravilha’ em condições de seca são semelhantes às apresentadas em ‘Sunki Tropical’. Os DEGs para os hormônios ácido abscísico (ABA), ácido indolacético (IAA) e o etileno estão *up*-regulados, visto que o hormônio brassinosteróides (BA) está ausente e os demais *down*-regulados. O sistema redox de ‘Sunki Maravilha’ também mostra-se eficiente sob tratamento de déficit hídrico, com a maioria dos DEGs envolvidos com a expressão da enzima dismutase, moléculas do ascorbato e glutathione *up*-regulados.

Os receptores quinases (Figura 7D) como os WAK(quinase associada à parede), RLK (motivo de extensina), LysM (motivo de lisina), entre outros, representados na figura, estão com expressão reprimida em ‘Sunki Maravilha’ no tratamento de seca, sendo esse processo representado por 55 DEGs.

DISCUSSÃO

No presente estudo a técnica de RNA-Seq foi usada para identificar as diferenças no transcriptoma das raízes das tangerineiras ‘Sunki Maravilha’ e ‘Sunki Tropical’ tendo como copa, a laranja ‘Valencia’ em condições de déficit hídrico, o que permitiu explorar genes que desempenhem um papel crucial na tolerância desses porta-enxertos à seca.

‘Sunki Maravilha’ e ‘Sunki Tropical’ são duas seleções de tangerineiras ‘Sunki’ identificadas e caracterizadas na Embrapa Mandioca e Fruticultura e Sunki “Tropical” tem sido utilizada como alternativas de porta-enxertos na diversificação dos

pomares comerciais da citricultura. Esses porta-enxertos possuem uma elevada taxa de poliembrionia, cerca de 100%, o que é excelente sob o ponto de vista de introduzi-las como porta-enxertos comerciais, são resistentes a fatores bióticos, a exemplo do fungo *Phytophthora* spp, causador da doença da podridão e gomose em plantas cítricas, além de possuírem diferentes estratégias de sobrevivência a desidratação, sendo a tolerância à seca da ‘Sunki Tropical’ similar à do limoeiro ‘Cravo’ (Soares Filho et al., 2002; 2003; Cunha Sobrinho et al., 2013; Santana-Vieira et al., 2016; Carvalho et al.; 2019)

Os Genes diferencialmente expressos (DEGs) foram identificados entre amostras de raízes de ‘Sunki Maravilha’ e ‘Sunki Tropical’, em condições de restrição hídrica. Foram encontrados mais de 3000 transcritos considerados diferencialmente expressos, e estes estão envolvidos em mais de 100 processos biológicos e função molecular, na sua maioria, enriquecidos na função da oxidoreductase, fosforilação de proteínas, regulação transcricional, processos de ligação e resposta ao estresse oxidativo (Figura S2 e S3). Isso implica que os genes relacionados com as funções desempenham um papel fundamental nas respostas dos porta-enxertos durante a imposição de déficit hídrico.

Um total de 40 DEGs no Volcano Plot de ‘Sunki Maravilha’ e ‘Sunki Tropical’ de acordo com $p < 0.001$ e $\log FC > 2$ ou < -2 foram destacados. Genes responsivos à seca com $\log FC > 2$, como: orange1.1g032636m.g relacionado com a quitinase; orange1.1g025761m.g responsável pelo transporte de açúcar; orange1.1g003471m.g / orange1.1g002925m.g síntese de carboidratos e orange1.1g025810m.g / orange1.1g025837m.g que correspondem a codificação da proteína Expansina – Like B1, apresentaram regulação positiva para ambos genótipos de tangerineiras ‘Sunki’ (Tabela S1 e S2 < <https://doi.org/10.5281/zenodo.3560651>>).

Estudos que relatam o perfil transcriptômico de plantas cítricas sob seca, também identificaram DEGs relacionados ao metabolismo de parede celular, a exemplo das Expansinas, que em condições de seca, modifica a parede celular afrouxando-a, através da sua extensibilidade ou plasticidade (Gonçalves et al., 2019). Outros estudos relatam que a superexpressão de genes da família da Expansina em trigo sob o controle de um promotor induzido ao estresse em plantas de tabaco transgênicas, atribuiu tolerância ao estresse hídrico (Li et al., 2013; Gall et al., 2015). Essa expressão diferencial de genes que codificam proteínas de parede celular, como a Expansina, tornam-se genes candidatos de interesse em plantas cítricas com diferentes estratégias de sobrevivência à seca.

O gene orange1.1g038511m.g, que codifica expressão de proteínas Heat shock (HSPA1_8), foi regulado positivamente e identificado apenas em ‘Sunki Tropical’ (Tabela S2 <<https://doi.org/10.5281/zenodo.3560651>>). As proteínas Heat Shock exercem papel protetor em plantas submetidas a condições de estresse abiótico, protegendo as outras proteínas da desnaturalização durante o estresse (Nakomoto e Vígh, 2007). O acúmulo de proteínas Heat Shock em plantas cítricas está relacionado com tolerância à seca em genótipos contrastantes submetidos ao déficit hídrico e térmico (Balfagón et al., 2018).

As análises de redes (PPI), junto aos processos de clusterização feitas no presente estudo, permitem selecionar dentro das redes *up* e *down*-reguladas de ‘Sunki Maravilha’ e Sunki Tropical’ em condições de seca, grupos de proteínas com alta interação relacionadas a processos biológicos bem definidos e complexos proteicos que participam de maquinarias moleculares.

Proteínas exclusivas envolvidas em processos metabólicos de hexose e do ABA, além de proteína de transportes, foram encontrados na rede PPI *up*-regulada de ‘Sunki Maravilha’ em tratamento de déficit hídrico. Este resultado corrobora os resultados encontrados por Santana-Vieira et al., (2016), que afirmam que ‘Sunki Maravilha’ em condições de seca, exibe maiores concentrações de ABA, o que induz tolerância à seca, e acúmulo de carboidratos, importantes para o sistema antioxidante. Por outro lado, proteínas exclusivas *up*-reguladas em ‘Sunki Tropical’, estão relacionadas a processos metabólicos, biossíntese de giberelina e brassinosteróides. Souza et al., (2017) também identificaram em suas redes PPI de plantas cítricas sob seca, proteínas relacionadas à via de sinalização mediada por brassinosteróides. Esses compostos são responsáveis pelo fortalecimento do fotossistema II, auxiliam no aumento da expressão de proteínas antioxidantes e estão envolvidos em vários processos de desenvolvimento das plantas (Farududdin et al., 2014; Lima et al., 2017). Em citros, esses esteroides estão associados e em sintonia com as auxinas, ao crescimento de células e desenvolvimento do sistema radicular durante a imposição do déficit hídrico (Souza et al. 2017).

É possível observar que as proteínas *down*-reguladas para os dois porta-enxertos, na sua grande maioria, são exclusivas, mostrando que em condições de deficiência hídrica, cada genótipo utiliza mecanismos de sobrevivência diferentes em resposta ao déficit hídrico. Com exceção das proteínas relacionadas ao desenvolvimento de raiz e

órgãos e ao processo catabólico de pectina, que são em comum entre os dois porta-enxertos, ‘Sunki Maravilha’ e ‘Sunki Tropical’.

Estudos com tangerineiras ‘Sunki’ afirmam que sob condições ideais, a porção aérea da planta é proporcional ao tamanho do sistema radicular. Sendo assim, nesses estudos, foram registrados que a ‘Sunki’, em especial a ‘Sunki Maravilha’, apresenta menor taxa de crescimento e que isto pode estar associado à maior concentração de ABA, que aumenta nas raízes dessa planta durante condições de déficit hídrico quando comparado a outros porta-enxertos (Neves et al. 2013; Oliveira et al., 2015). É válido ressaltar que no presente estudo, proteínas relacionadas ao ABA foram *up*-reguladas em ‘Sunki Maravilha’.

As proteínas identificadas e agrupadas nos diferentes clusters nas redes PPI de ‘Sunki Maravilha’ e Sunki Tropical’, sejam *up*- ou *down*-reguladas, estão relacionadas aos módulos funcionais e complexos proteicos descritos por Wang et al., (2010) e Spirin e Mirny (2003), respectivamente. Os Módulos funcionais são grupos de proteínas cujas interações ocorrem em local ou tempo distintos, como proteínas de sinalização e vias metabólicas. Já os complexos proteicos participam de maquinarias moleculares que ocorrem no mesmo local. No presente estudo, observa-se uma mistura desses módulos junto às proteínas, o que é típico de redes biológicas, assim como apresentados nos estudos de Souza et al., (2017) com redes de PPI com plantas cítricas quando submetidas ao déficit hídrico.

A visão geral do metabolismo representada no MapMan para ‘Sunki Maravilha’ e ‘Sunki Tropical’ demonstra que muitas vias do metabolismo estão *down*-reguladas nas raízes em condições de déficit hídrico. A expressão dos DEGs reduzida nas raízes presente no metabolismo poder estar associada com a intensidade e duração da restrição hídrica, visto que as raízes percebem primeiramente os diferentes tipos de estresse, sendo críticas para as plantas absorverem água e nutrientes (Zhang et al., 2016).

Alguns genes relacionados ao metabolismo de carboidratos foram regulados em ambos os genótipos de tangerineiras ‘Sunki’, cujos produtos estão relacionados as atividades enzimáticas (HIPS2, AtGol2, ATTPS11), rafinose (AtSTS) e trealose (orange1.1g017025m) (Tabela S3 e S7 <<https://doi.org/10.5281/zenodo.3560655>>). Foi demonstrado que a imposição de déficit hídrico altera as concentrações desses açúcares em plantas cítricas, que atuam como osmoprotetores, estabilizam as membranas

celulares e mantém o turgor celular; mecanismos chaves para sobrevivência em condições de seca (Santana-Vieira et al., 2016; Gonçalves et al., 2019).

A trealose é um importante metabólito de sinalização nas respostas ao estresse abiótico em condição de seca, no entanto em ‘Sunki Maravilha’ apresentou regulação negativa para a trealose e em ‘Sunki tropical’, esse gene não foi detectado no transcriptoma. Os níveis de trealose mudam paralelamente em relação à sacarose, que é o principal produto da fotossíntese e o principal transporte de açúcares nas plantas (Lunn et al., 2014). Sendo assim, essa regulação negativa de trealose em ‘Sunki Maravilha’ e indetecção em ‘Sunki Tropical’, tanto de sacarose, consequentemente de trealose, pode está associado à regulação negativa dos genes relacionados à fotorrespiração em ambos genótipos (Tabela S3 e S7 <<https://doi.org/10.5281/zenodo.3560655>>).

A regulação positiva de rafinose em ‘Sunki Maravilha’ e ‘Sunki Tropical’ expostas ao déficit, pode estar associada à sinalização e eliminação de ROS (Espécies Reativas de Oxigênio). Estudos relatam que além de osmoprotetores, os carboidratos solúveis como a rafinose, exercem função antioxidante, na eliminação de ROS em genótipos tolerantes ao estresse em plantas (Nishizawa et al., 2008; Keunen et al., 2013; ElSayed et al., 2014).

A eficiência da resposta celular do sistema redox de ‘Sunki Maravilha’ e ‘Sunki Tropical’ (Tabela S4 e S8 <<https://doi.org/10.5281/zenodo.3560655>>) também foi demonstrada com a regulação positiva dos genes ACHT4 com função de oxiredutase, APX1, APX2, CAT2 e ATCCS (orange1.1g020436m), relacionados com a expressão das enzimas ascorbato peroxidase, catalase e superóxido dismutase, respectivamente. A eficiência do sistema antioxidativo enzimático para eliminação de ROS é observada na expressão dos genes relacionados às enzimas antioxidantes, a exemplo da superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase em plantas em condições de seca. Isso certamente ajuda garantir o equilíbrio e produção de ROS e consequentemente a sobrevivência da planta (Caverzan et al., 2016).

Outros DEGs relacionados à resposta celular, modulados pelo estresse hídrico foram responsivos ao estresse abiótico, mais precisamente ao estresse pelo déficit hídrico. A sua maioria em ‘Sunki Tropical’ (Tabela S8 <<https://doi.org/10.5281/zenodo.3560655>>), estão reprimidos, no entanto, o gene ERD (Early Response to Dehydration), é induzido em Sunki Maravilha’ (Tabela S4

<<https://doi.org/10.5281/zenodo.3560655>>). O gene *ERD* (ERD4) é responsivo à desidratação precoce em plantas com funções funcionais na tolerância e desenvolvimento do estresse (Rai et al., 2015). Em estudos com plantas cítricas em condições de seca, a ‘Sunki Maravilha’ mostrou possuir um sistema mais eficiente para se proteger contra danos causados pela seca, ou seja, um mecanismo de proteção para garantir a sobrevivência em condições de restrição hídrica, tolerando a desidratação, em relação a outros porta-enxertos, a exemplo do limoeiro ‘Cravo’, que tem características similares à ‘Sunki Tropical’ (Soares Filho et al. 2002; 2003; Santana – Vieira et al., 2016).

DEGs envolvidos nas vias de sinalização hormonal de auxina (IAA), ácido abscísico (ABA), etileno, ácido jasmônico (JA), giberelina (GA), ácido salicílico (SA) e brassinosteróides também foram identificados (Tabela S5 e S9 <<https://doi.org/10.5281/zenodo.3560655>>).

Os genes relacionados à via de sinalização hormonal responsiva ao etileno apresentam regulação negativa, tanto em ‘Sunki Maravilha’(Tabela S5) quanto em ‘Sunki Tropical’(Tabela S9), corroborando os encontrados para o perfil transcriptômico de plantas cítricas descritos por Gonçalves et al., (2019), como também relatado anteriormente em Gimeno et al., (2009) para tangerina, que a sinalização de etileno em citros é inibida pela seca.

Uma regulação negativa também foi observada para ‘Sunki Tropical’ em relação ao gene AA03, responsivo à sinalização de ABA. O gene AAO3 desempenha um papel crítico na síntese do ABA, que auxilia a adaptação das plantas ao estresse hídrico, sendo determinantes em folhas e sementes (Seo et al., 2000;2004; Zhang et al., 2016). No entanto, numerosos genes responsivos à sinalização do ABA, como CCD1, NCED3, HVA22E, apresentaram-se induzidos em condições de seca nos dois genótipos de tangerineiras ‘Sunki’ (Tabela S5 e S9 <<https://doi.org/10.5281/zenodo.3560655>>). Diante dos resultados, esse DEG atua como importante elemento na biossíntese e percepção do ABA.

Os DEGs relacionados à fotossíntese foram mais reduzidos (75%) em ‘Sunki Maravilha’ do que em ‘Sunki Tropical’ (66%), sugerindo que os processos relacionados à fotossíntese foram afetados pela condição de déficit hídrico, neste último (Tabela S3 e S7 <<https://doi.org/10.5281/zenodo.3560655>>). A regulação negativa de genes associados ao aparato fotossintético é mais comum em genótipos sensíveis, do que os

tolerantes ao déficit, como relatado no perfil transcriptômico de trevo vermelho em condições de estresse hídrico, descrito por Yates et al. (2014). No entanto, Muthusamy et al., (2016) analisando os transcritos de bananeira também em condições de déficit, afirmou que isso pode variar, pois depende de vários fatores, como sensibilidade ao estresse e o tipo de espécie vegetal.

O déficit hídrico induziu a expressão diferencial de TFs (Transcription Factors) em ‘Sunki Maravilha’ (Tabela S5 <<https://doi.org/10.5281/zenodo.3560655>>) e ‘Sunki Tropical’ (Tabela S9 <<https://doi.org/10.5281/zenodo.3560655>>). Um total de 64 e 203 DEGs, respectivamente, relacionados aos TFs, foi identificado. Os TFs são críticos nas respostas e tolerância ao estresse por restrição hídrica, pois estão envolvidos na indução ou não desses genes candidatos (Gonçalves et al., 2019).

Os TFs codificados no presente estudo estão distribuídos nas famílias MYB, AP2, bZIP e NF-Y. A maioria dos DEGs relacionados estão com regulação induzida em condições de déficit para ‘Sunki Maravilha’ e ‘Sunki Tropical’. MYB é a maior família de TFs regulada pelo déficit hídrico nos dois genótipos de tangerineiras, principalmente em ‘Sunki Tropical’. Esses resultados estão consistentes com estudos anteriores que indicam que esses TFs são cruciais nas respostas das plantas em condições de estresse hídrico (Muthusamy et al., 2016). No entanto, a família bZIP só apresentou genes codificados em ‘Sunki Maravilha’. Fatores de transcrição desta família foram superexpressados em tabaco, que induziu tolerância à seca em plantas transgênicas, sendo considerado um gene candidato importante para o melhoramento molecular de plantas tolerantes à seca (Huang et al., 2010).

Os TFs com regulação positiva da família AP2 foram induzidos em ‘Sunki Maravilha’ e ‘Sunki Tropical’. Em estudos com citros também foi observado o acúmulo de DEGs para esses TFs, que são capazes de aumentar a tolerância das plantas em relação ao estresse (Gonçalves et al., 2019).

Segundo Muthusamy et al., (2016), em condições de seca, genótipos tolerantes tendem a apresentar uma maior redução de TFs. Isso também foi observado em genótipos de sorgo tolerantes, investigado por Fracasso et al., (2016). Diante dos nossos resultados os dois genótipos de tangerineiras, ‘Sunki Maravilha’ e ‘Sunki Tropical’, apresentaram 78% e 81% dos TFs codificados reduzidos, respectivamente. Este comportamento afirma as diferentes estratégias de sobrevivência à seca que as plantas

cítricas podem apresentar, concentrando-se em prevenir ou tolerar a desidratação (Santana-Vieira et al., 2016).

Além dos TFs, várias proteínas kinases (PKs) também foram diferencialmente expressas em resposta à condição de déficit hídrico em ‘Sunki Maravilha’ e ‘Sunki Tropical’. Cinquenta e cinco e 147 DEGs foram identificados para os genótipos de tangerineira ‘Sunki’, ‘Sunki Maravilha’ e ‘Sunki Tropical’, respectivamente, com a maioria deles apresentando regulação negativa (Tabela S6 e S10 <<https://doi.org/10.5281/zenodo.3560655>>) em resposta ao déficit hídrico. Os DEGs *down*-regulados que codificam PKs em ‘Sunki Maravilha’(Tabela S6) e ‘Sunki Tropical’(Tabela S10) são diferentes na sua maioria, o que indica a existência de vias distintas de cascata de transdução de estresse, assim como, observado nos genótipos analisados por Muthusamy et al., (2016). Contudo, é amplamente reconhecido que as PKs estão envolvidas em vias de transdução de sinal nas respostas abióticas ao estresse, a exemplo da via de percepção dos sinais de estresse, fosforilação de proteínas, por isso, podem considera-las alternativas de genes candidatos à tolerância ao déficit hídrico em citros.

CONCLUSÃO

O perfil transcriptômico analisado neste estudo avança nossa compreensão da biologia das plantas cítricas em condições de déficit hídrico, contribuindo para a expansão da base molecular, com diferentes alternativas de porta – enxertos, como ‘Sunki Maravilha’ e Sunki Tropical’, que com base nos nossos resultados assumem diferentes estratégias de sobrevivência à seca. Os resultados do transcriptoma dos porta-enxertos ‘Sunki Maravilha’ e ‘Sunki Tropical’ foram funcionalmente diversos e quanto a suas respostas em relação às funções no metabolismo, respostas celulares, regulação e respectivas proteínas com alta interação envolvidas em processos biológicos, diferencialmente expressos durante a imposição do déficit hídrico. A tolerância à seca induzida pelos porta-enxertos inclui respostas positivas de genes relacionados a processos antioxidantes, biossíntese do ABA, proteínas associadas ao desenvolvimento de raízes, metabolismo de parede celular, sinalização de TFs e PKs. Além disso, genes responsivos ao metabolismo de carboidratos, respostas aos estresses bióticos e abióticos. Com isso, podemos afirmar que a ‘Sunki Maravilha’ quando exposta ao déficit hídrico tende a tolerar a desidratação e ‘Sunki Tropical’ a evitar a desidratação

causada pela seca. Investigações futuras para explorar o potencial dos genes diferencialmente expressos desse estudo fazem-se necessárias, a fim de elucidar seus papéis funcionais e contribuir para o melhoramento genético dos citros e expansão da cultura.

REFERÊNCIAS

Balfagón D, Zandalinas SI, Baliño P, Muriach M, Gómez-Cadenas A (2018) Involvement of ascorbate peroxidase and heat shock proteins on citrus tolerance to combined conditions of drought and high temperatures. *Plant physiology and biochemistry*, 127, 194-199.

Bassanezi RB, Bergamin Filho A, Amorin L, Gimenes-Fernandes N, Gottwald TR, Bové JM (2003) Spatial and temporal analyses of Citrus sudden death as a tool to generate hypotheses concerning its etiology. *Phytopathology*. 93: 502–12.

Boscariol-Camargo RL, Berger IJ, Souza AA, Amaral AM, Carlos EF, Freitas-Astúa J, Takita MA, Targon MLPN, Medina CL, Reis MS, Machado MA (2007) In silico analysis of ESTs from roots of Rangpur lime (*Citrus limonia* Osbeck) under water stress. *Genet Mol Biol*. 2007;30:906–16.

Caverzan A, Casassola A, Brammer S P (2016) Antioxidant responses of wheat plants under stress. *Genetics and molecular biology*, v. 39, n. 1, p. 1-6.

Cunha Sobrinho A P, Passos OS, Soares Filho W dos S (2013) Cultivares porta-enxerto. In: Cunha Sobrinho AP, Magalhães AF, Souza A da S, Passos OS, Soares Filho W dos S. (Ed.). *Cultura dos citros*. Brasília, DF: Embrapa, 2013.

Chaves MM, Oliveira MM (2004) Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *J Exp Bot*.55:2365–84.

Claeys H. & Inze D (2013) The agony of choice: how plants balance growth and survival under water-limiting conditions. *Plant Physiology* **162**, 1768–1779.

de Carvalho LM, de Carvalho HW, de Barros I, Martins CR, Soares Filho WDS, Girardi, EA, Passos OS (2019) New scion-rootstock combinations for diversification of sweet orange orchards in tropical hardsetting soils. *Scientia horticulturae*, 243, 169-176.

de Souza JD, de Andrade Silva EM, Coelho Filho MA, Morillon R, Bonatto D, Micheli, F, da Silva Gesteira A. (2017). Different adaptation strategies of two citrus scion/rootstock combinations in response to drought stress. *PloS one*, 12(5), e0177993.

ElSayed AI, Rafudeen MS, Gollack D (2014) Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: protection against abiotic stress. *Plant Biology* **16**, 1–8.

Faostat (2019) FAOSTAT online database. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/en/#data>>.

Fariduddin Q, Yusuf M, Ahmad I, Ahmad A (2014) Brassinosteroids and their role in response of plants to abiotic stresses. *Biologia Plantarum*, 58(1), 9-17.

Fracasso A, Trindade LM, Amaducci S (2016) Drought stress tolerance strategies revealed by RNA-Seq in two sorghum genotypes with contrasting WUE. *BMC Plant Biol.* 16:115. doi:10.1186/s12870-016-0800-x

Gall HL, Philippe F, Domon JM, Gillet F, Pelloux J, Rayon C (2015) Cell wall metabolism in response to abiotic stress. *Plants*. 4:112–66.

Gonçalves LP, Camargo RLB, Takita MA, Machado MA, dos Soares Filho WS Costa MG (2019) Rootstock-induced molecular responses associated with drought tolerance in sweet orange as revealed by RNA-Seq. *BMC genomics*, 20(1), 110.

Gimeno J, Gadea J, Forment J, Pérez-Valle J, Santiago J, Martínez-Godoy MA, Talón M (2009) Shared and novel molecular responses of mandarin to drought. *Plant molecular biology*, 70(4), 403-420.

Huang X S, Liu JH, Chen XJ (2010) Overexpression of PtrABF gene, a bZIP transcription factor isolated from *Poncirus trifoliata*, enhances dehydration and drought tolerance in tobacco via scavenging ROS and modulating expression of stress-responsive genes. *BMC plant biology*, 10(1), 230.

Keunen E, Peshev D, Vangronsveld J, Ende WVD, Cuypers A (2013) Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. *Plant, Cell and Environment* **36**, 1242–1255.

Li C, Li Y, Bai L, Zhang T, He C, Yan Y, Yu X (2014) Grafting-responsive miRNAs in cucumber 883 and pumpkin seedlings identified by high-throughput sequencing at whole genome level. *Physiol Plant*.151:406–22.

Lima JV & Lobato AKS(2017) Brassinosteroids improve photosystem II efficiency, gas exchange, antioxidant enzymes and growth of cowpea plants exposed to water deficit. *Physiology and molecular biology of plants*, 23(1), 59-72.

Lunn JE, Delorge I, Figueroa CM, Van Dijck, P, Stitt, M (2014) Trehalose metabolism in plants. *The Plant Journal*, 79(4), 544-567.

Muthusamy M, Uma S, Backiyarani S, Saraswathi MS, Chandrasekar A (2016) Transcriptomic changes of drought-tolerant and sensitive banana cultivars exposed to drought stress. *Frontiers in plant science*, 7, 1609.

Nakamoto H & Víggh L (2007) The small heat shock proteins and their clients. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64: 294–306.

Neves DM, Coelho-Filho MA, Belleite BS, Silva MFGF, Souza DT, Soares-Filho WS, Costa MGC, Gesteira AS (2013) Comparative study of putative 9-cisepoxycarotenoid dioxygenase and abscisic acid accumulation in the responses of Sunki mandarin and Rangpur lime to water deficit. *Mol Biol Rep*. 40:5339–49.

Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S (2008). Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiol.* 147, 1251–1263. doi:10.1104/pp.108.122465

Oliveira TM, Da Silva FR, Bonatto D, Neves DM, Morillon R, Maserti BE, Gesteira, A. S (2015) Comparative study of the protein profiles of Sunki mandarin and Rangpur lime plants in response to water deficit. *BMC plant biology*, 15(1), 69.

Rai AN, Tamirisa S, Rao KV, Kumar V, Suprasanna P (2016) RETRACTED ARTICLE: Brassica RNA binding protein ERD4 is involved in conferring salt, drought tolerance and enhancing plant growth in Arabidopsis. *Plant molecular biology*, 90(4-5), 375-387.

Salekdeh GH, Reynolds M, Bennett J, Boyer J (2009) Conceptual framework for drought phenotyping during molecular breeding. *Trends Plant Sci.* 14:488–96.

Santana-Vieira DDS, Freschi L, da Hora Almeida LA, De Moraes DHS, Neves DM, Dos Santos LM, da Silva Gesteira, A (2016) Survival strategies of citrus rootstocks subjected to drought. *Scientific reports*, 6, 38775.

Sentelhas PC. Agrometeorologia dos citros (2005). In: Mattos Junior D, Negri JR, Pio RM, Pompeu Junior J, editors. *Citros*. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag. p. 317–44.

Soares Filho WS, Diamantino MSAS, Moitinho EDB, Cunha Sobrinho AP da, Passos OS (2002) ‘Tropical’: uma nova seleção de tangerina ‘Sunki’. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal*, v. 24, n. 1, pp. 127-132.

Soares Filho WS, Cunha Sobrinho AP, Passos OS, Moitinho EDB (2003) ‘Maravilha’: uma nova seleção de tangerina ‘Sunki’. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal*, v. 25, n. 2, pp. 268-271.

Sousa EMR, Suzart C, Costa SN, Costa MGC, de Almeida AAF, Coelho Filho MA, da Silva Gesteira A (2019) Transcriptomic analysis related to the flowering of the citrus hybrid Microcitrangemonia. *Current Plant Biology*, 18, 100097.

Spirin V, Mirny LA (2003) Protein complexes and functional modules in molecular networks. *PNAS*.100.

Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu JK (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal*, 45(4), 523-539.

Wang J, Li M, Deng Y, Pan Y(2010) Recent advances in clustering methods for protein interaction networks.*BMC Genomics*.11(3):S10.

Zhang Y, Barthe G, Grosser JW, Wang, N (2016) Transcriptome analysis of root response to citrus blight based on the newly assembled Swingle citrumelo draft genome. *BMC genomics*, 17(1), 485.

Material Suplementar

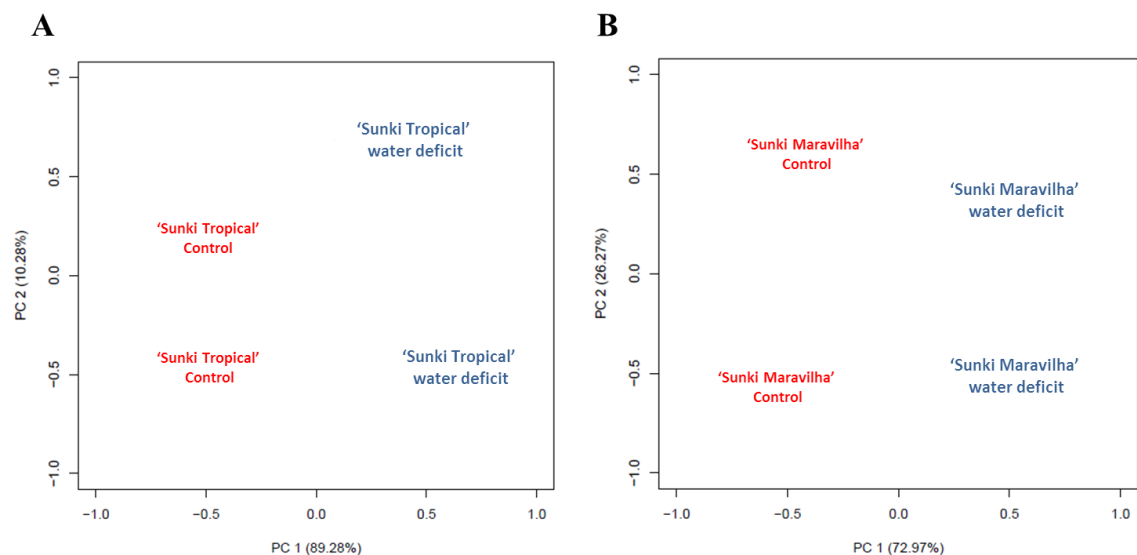


Figura Suplementar 1: Análise de componentes principais (PCA) que confirmam a reprodutibilidade do sequenciamento. A – representa as réplicas biológicas de ‘Sunki Tropical’ nos tratamentos controle e no déficit hídrico; B – representa ‘Sunki Maravilha’ nos tratamentos controle e déficit hídrico e suas

respectivas réplicas. Os componentes principais (PC1 e PC2) são mostrados com a porcentagem de variância que explica a variação encontrada nos diferentes tratamentos.

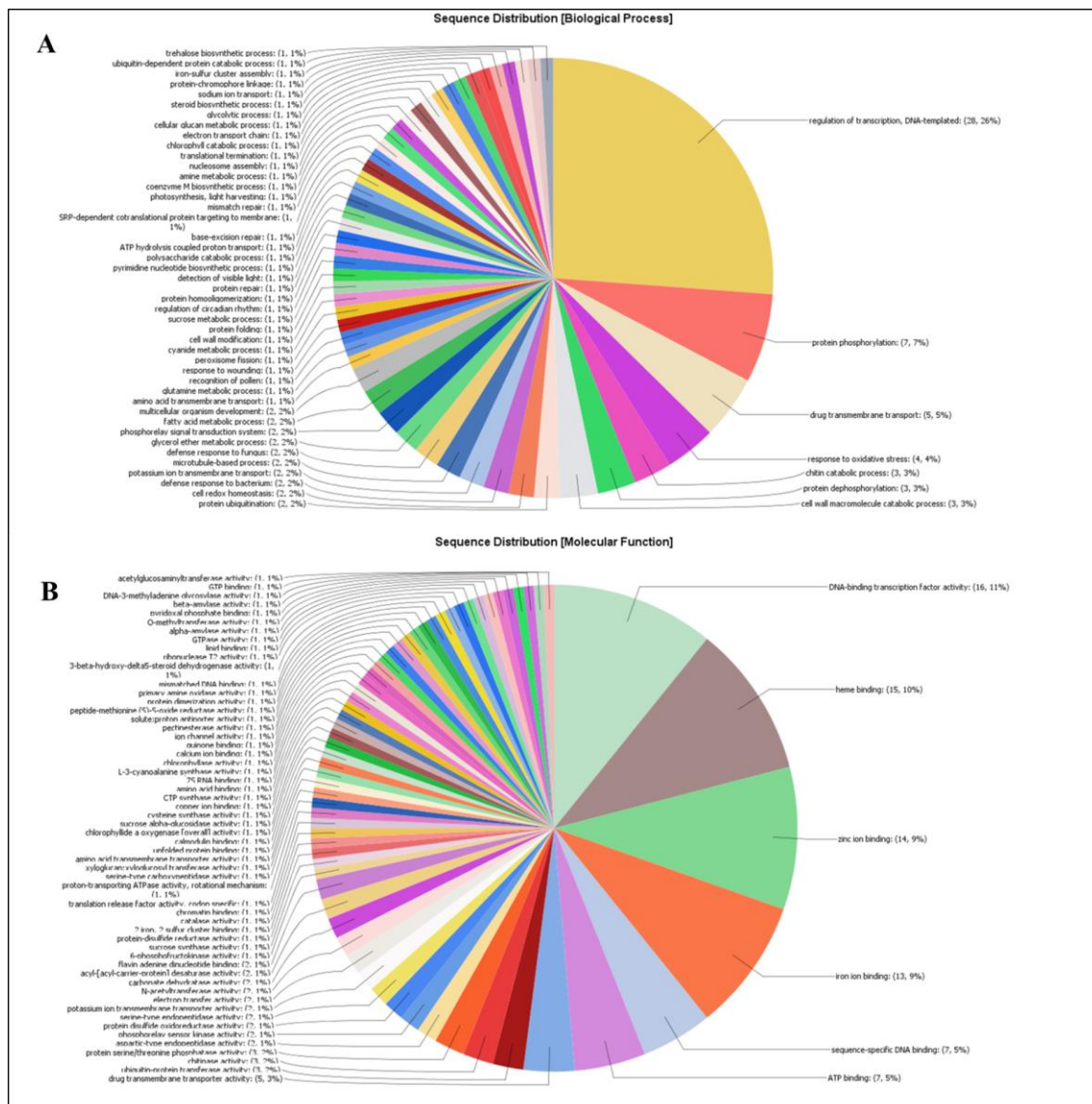


Figura Suplementar 2: Análises de Processos Biológicos (A) e Funções Moleculares (B) em ‘Sunki Tropical’ quando comparados à ‘Sunki Maravilha’ ambos em condições de deficiência hídrica (WD), utilizou – se o software BLAST2GO.

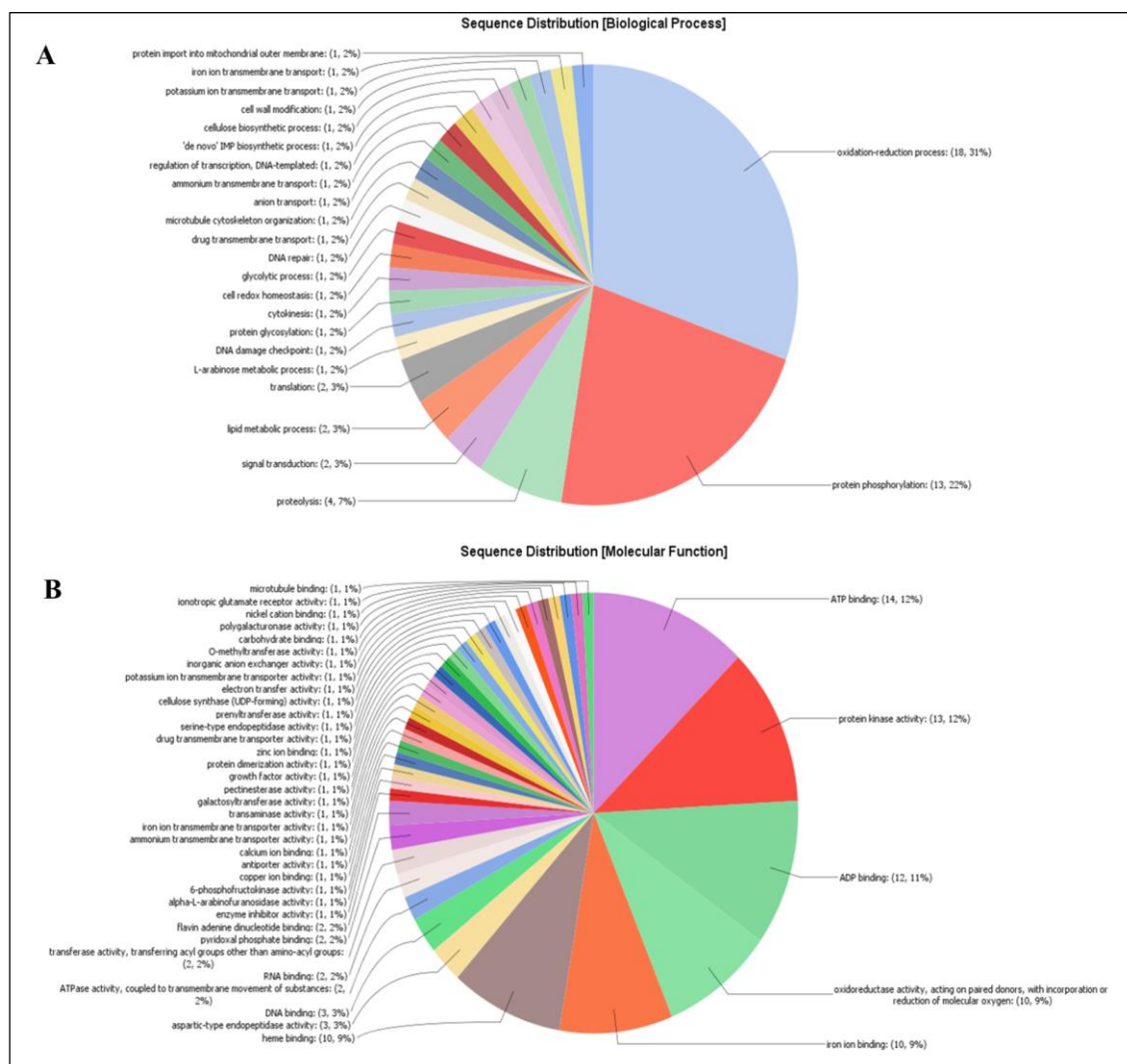


Figura Suplementar 3: Análises de Processos Biológicos (A) e Funções Moleculares (B) em ‘Sunki Maravilha’ quando comparados à ‘Sunki Tropical’ ambos em condições de deficiência hídrica (WD), utilizou – se o software BLAST2GO.

CAPÍTULO 3

Bases epigenéticas envolvidas no estresse por seca em plantas: um olhar sistemático

Bases epigenéticas envolvidas no estresse por seca em plantas: um olhar sistemático

Ariana S. Santos¹; Valter Cruz-Magalhães²; Dayse Drielly S. Santana-Vieira³; Cláudia F. Ferreira^{4*} e Abelmon S. Gesteira^{4*}

¹Departamento de Biologia, Centro de Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus – Bahia. ²Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras – Minas Gerais. ³Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Oeste do Pará, Juruti – Pará. ⁴Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas – Bahia.

*Correspondence: Cláudia Fortes Ferreira - claudia.ferreira@embrapa.br

Abelmon da Silva Gesteira - abelmon.gesteira@embrapa.br

Resumo: A seca é considerada um fator de estresse abiótico multidimensional. Para tolerar a desidratação, as plantas fazem uso de mecanismos fisiológicos e, principalmente moleculares. Exposições recorrentes a essas condições permitem que as plantas respondam mais rápido a um novo estresse (em comparação com plantas que não foram previamente expostas), por meio de mudanças adaptativas nos padrões de expressão gênica, evidenciando sua capacidade de “memória” e consequentemente adaptação às mudanças ambientais. O envolvimento das bases epigenéticas como efeitos responsivos das plantas em condições de seca e seu papel na “memória” do estresse em plantas foi investigado por meio de uma revisão sistemática. As buscas foram feitas em três bancos de dados: Scopus, PubMed e Web Of Science. A revisão sistemática foi conduzida com auxílio do software StArt (versão 3.3), e um protocolo previamente estabelecido com critérios de inclusão e exclusão de estudos foi utilizado. A revisão sistemática permitiu compreender que os mecanismos epigenéticos conferem tolerância a seca e que eles estão envolvidos na “memória” do estresse transgeracional em plantas. No entanto, novas pesquisas com o uso de técnicas metodológicas devem ser direcionadas à compreensão do papel dos ncRNAs como mecanismos epigenéticos, além de tentar elucidar as questões vinculadas a herdabilidade e estabilidade dessas modificações epigenéticas induzidas pela seca.

Palavras – chave: Epigenética; memória do estresse; tolerância a seca, revisão sistemática.

INTRODUÇÃO

As plantas são organismos sésseis que estão expostas frequentemente a diferentes estressores ambientais, sejam bióticos ou abióticos. Elas buscam sobrevivência a partir da modulação da maquinaria fisiológica e molecular, que envolve vias metabólicas, fatores de transcrição e regulação da expressão gênica (Rabara et al., 2014; Gayacharam e Jadel, 2013).

A restrição hídrica, caracterizada pela seca, é um dos principais fatores abióticos que tem limitado o desenvolvimento dos vegetais e consequentemente a produção agrícola mundial. Diante do atual cenário das mudanças climáticas globais, espera-se que essa restrição aumente em intensidade, frequência e extensão geográfica (Farooq, et al., 2012; Gonçalves et al., 2019).

Para tolerar a seca, as plantas ativam mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares complexos, que são controlados por múltiplos genes induzidos pela desidratação (Abid et al., 2017).

Nos últimos anos, estudos tem destacado o envolvimento de mecanismos epigenéticos nas respostas das plantas ao estresse biótico e/ou abiótico (Liu et al., 2015). Esses mecanismos são caracterizados por marcas químicas que regulam a expressão gênica sem alterar a sequência nucleotídica do DNA. Metilação no DNA, modificação de histonas, regulação da cromatina e RNA não codificadores (nRNAs), são processos descritos como mecanismos epigenéticos (Meyer, 2015; Crisp et al., 2016).

Embora, outros mecanismos estejam subjacentes as respostas das plantas aos efeitos ambientais, os mecanismos epigenéticos são considerados principais candidatos, devido o seu potencial de sensibilidade ambiental (Downen et al. 2012).

As condições ambientais estressoras que elicitam as plantas, a exemplo da seca, oscilam quanto à frequência, intensidade e duração. Isso exige uma capacidade adaptativa, que a longo ou curto prazo, as plantas podem mostrar como uma “memória” responsiva ao estresse (Lafon – Placette et al., 2017; Morgado et al., 2017). Curiosamente, estudos tem demonstrado que essa “memória” do estresse em plantas é mediada por mecanismos epigenéticos. No entanto, ainda não está claro se ou como os mecanismos epigenéticos estão envolvidos no efeito de “memória” seja ela transgeracional ou de curta duração (Pecinka e Scheid 2012).

O apoio empírico a essa hipótese permanece escasso, o que faz necessário uma ampla pesquisa na literatura para preencher lacunas, a fim de ofertarem novas compreensões. Sendo assim, esse artigo contribui para esse desafio através de uma revisão sistemática.

A revisão sistemática é uma estratégia que permite compilar e sistematizar pesquisas depositadas em bancos de dados, a fim de analisar o estado da arte sobre um determinado assunto, gerando novas conclusões e perspectivas (Santos et al., 2018). No presente trabalho foi realizada a primeira revisão sistemática cujo objetivo principal é compreender as bases epigenéticas envolvidas na tolerância a seca e na “memória” do estresse em plantas.

MATERIAIS E MÉTODOS

O software *State of the Art by Systematic Review* - StArt (versão 3.3), desenvolvido pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) foi utilizado para realizar a revisão sistemática, composta em três etapas: Planejamento, Execução e Sumarização (Figura 1). Abaixo segue as descrições das etapas.

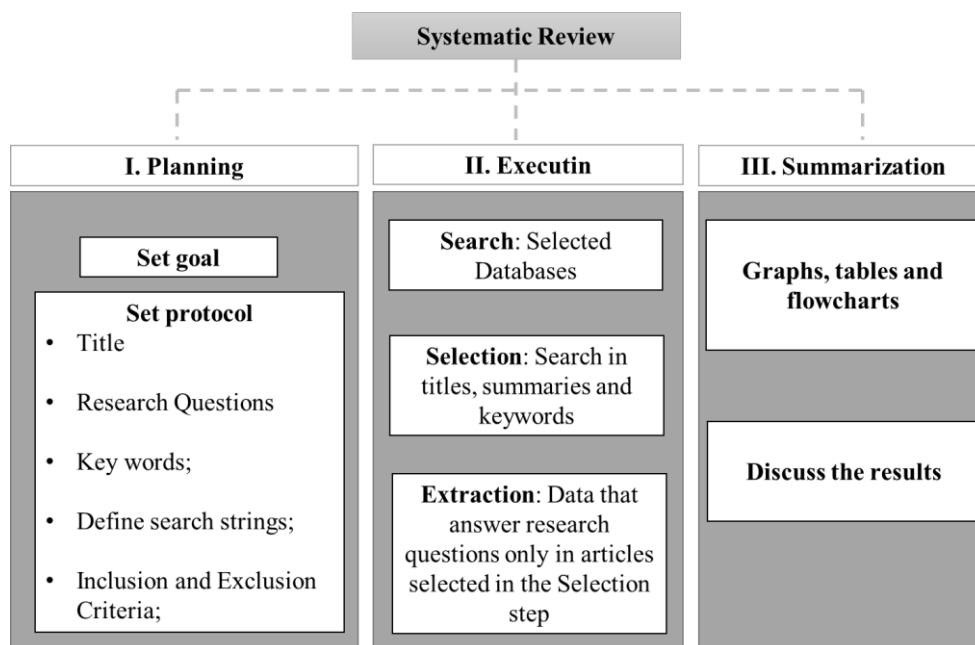


Figura 1: Esquema apresentando o resumo das etapas para execução da revisão sistemática com o uso do software StArt (versão 3.3).

I. Planejamento: Nesta etapa o objetivo da revisão sistemática foi definido para que o protocolo, que funciona como um guia da revisão sistemática, fosse estabelecido. Neste protocolo (<https://doi.org/10.5281/zenodo.3558765>) foram definidos títulos, questões de pesquisas, palavras – chave, ‘strings de busca’ e os critérios de inclusão e

exclusão dos estudos. A revisão sistemática sintetizou as referências coletando dados sobre as perguntas apresentadas na Tabela 1, a fim de entender e solucionar os problemas relacionados a essa revisão.

Tabela 1: Questões formuladas e utilizadas na pesquisa da revisão sistemática com o software StArt (versão 3.3).

Research Questions	
Q1	What are the epigenetic bases involved in the memory of stress caused by water deficit in plants?
Q2	What are the main species studied?
Q3	Where were the main studies related to water deficit tolerance based on epigenetic mechanisms?
Q4	Which epigenetic components confer drought tolerance on plants?
Q5	Do epigenetic components confer stress memory in plants?

II. Execução: Foram selecionados previamente os seguintes bancos de dados: Scopus, PubMed e Web Of Science. A seleção se baseou no melhor espectro de trabalhos selecionados. A busca automática nos bancos de dados foi realizada com base em três strings de busca (Figura 2). Para torna as buscas mais expressivas, conectores booleanos, como o AND foi utilizado, a fim de agrupar as partes principais da pesquisa.

A pesquisa automática nas bases de dados buscou nos estudos os temas centrais da revisão a partir dos títulos, resumos e palavras – chave. Os resultados foram importados no formato BIBTEX, compatível com o software StArt.

Search Strings
"epigenetic" AND "drought tolerance"; "epigenetic" AND "water deficit"; "epigenetic" AND "drought stress".

Figura 2: Strings de busca utilizadas nas bases de dados para selecionar os estudos da revisão sistemática.

Os artigos selecionados e importados para o software StArt, passaram por uma nova seleção com base nos critérios de inclusão e exclusão (Tabela 2) da revisão sistemática, e também por uma classificação que usa como critérios: aceitar, rejeitar ou

excluir (por está duplicado) os artigos, determinada pelo StArt. Considerando apenas os trabalhos aceitos na etapa de seleção foi possível iniciar a etapa de extração, que se baseia numa leitura íntegra dos estudos buscando respostas para as questões de pesquisas, visando à construção da revisão sistemática.

Tabela 2: Critérios estabelecidos e utilizados para incluir ou excluir estudos no processo da revisão sistemática.

Inclusion criteria	Exclusion Criteria
Papers in English;	Theses, dissertations, reports or manuals;
Primary papers;	Review papers;
Papers that have search strings in the title, summary, or keywords;	Papers that are not aligned with the objective of the systematic review.
Papers that are aligned with the objective of the systematic review.	

III. Sumarização: Nesta etapa final os resultados são compilados, analisados e sumarizados em tabelas, fluxogramas, gráficos, nuvem de palavras para compor a revisão sistemática.

RESULTADOS

As strings de busca foram eficientes para selecionar um total de 408 artigos nas bases de dados (Figura 3 A). A base de dados Web Of Science contribuiu com 56% de artigos para esta revisão, seguido das bases Scopus e PubMed com 30% e 14%, respectivamente (Figura 3B). A string com mais eficiência de busca nas três bases de dados foi “epigenetic” AND “drought stress”, que compilou 76, 34 e 114 estudos na Scopus, Pub Med e Web Of Science, respectivamente (Figura 3 A).

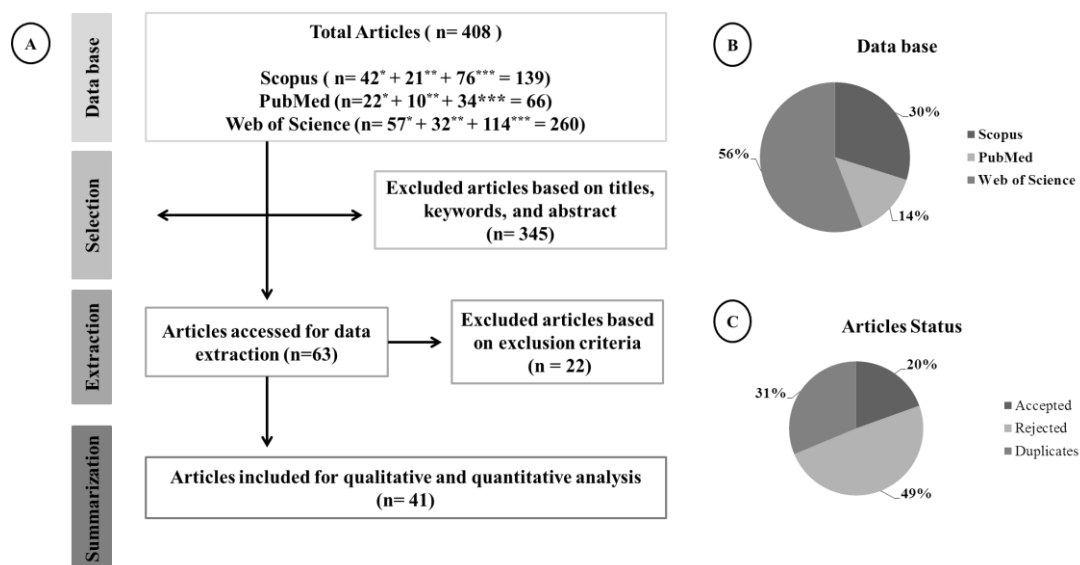


Figura 3: Sistematização dos estudos selecionados (A); Frequência de estudos por base de dados (B); Estudos classificados conforme critérios do software StArt (C).

Os 408 artigos foram importados para o programa StArt e na etapa de seleção foram excluídos 80% desses artigos, com base nos títulos, resumos e palavras – chave. Os artigos excluídos foram classificados como rejeitados (49%) e duplicados (31%) (Figura 3 C). Sendo assim, 63 artigos (20%) foram aceitos e selecionados para a etapa de extração dos dados, que com base nos critérios de inclusão e exclusão, foram classificados 41 artigos para a construção da revisão sistemática (<https://doi.org/10.5281/zenodo.3558759>). O total de estudos que foram importados para o StArt, abrangeram publicações dos anos 1998 a 2019, variando no número de estudo conforme mostrado na Figura 4.

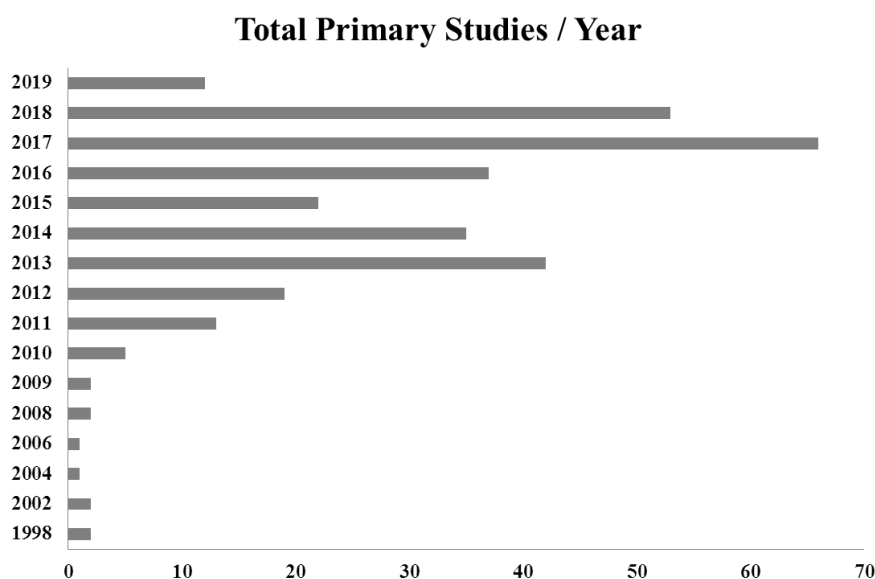


Figura 4: Frequência do total dos estudos primários (408) por ano importados para o Software StArt.

A Figura 5 representa a frequência das principais palavras que apareceram nos estudos selecionados para a fase de extração. A nuvem de palavras considera palavras do título, palavras-chave e resumos dos artigos. Os tamanhos das palavras variam de acordo com sua frequência e representatividade nos estudos, isto convalida a eficiência dos estudos selecionados para extrair as respostas para a revisão sistemática.



Figura 5: Nuvem de palavras com base nos artigos selecionados para fase de extração dos dados.

A frequência das principais espécies estudadas nos 41 artigos selecionados está representada na Figura 6 A. As espécies vegetais com frequência mais alta, submetidas

a condições de deficiência hídrica, visando entender seus comportamentos epigenéticos, são as de maior importância econômica como *Oryza sativa* estudada em 12% dos estudos, *Citrus*, *Triticum aestivum*, *Populus*, *Vitis vinífera* L., investigadas em 2%, 5%, 9% e 5%, respectivamente, como também plantas modelos como a *Arabidopsis* (7%) e *Solanum lycopersicum* (7%).

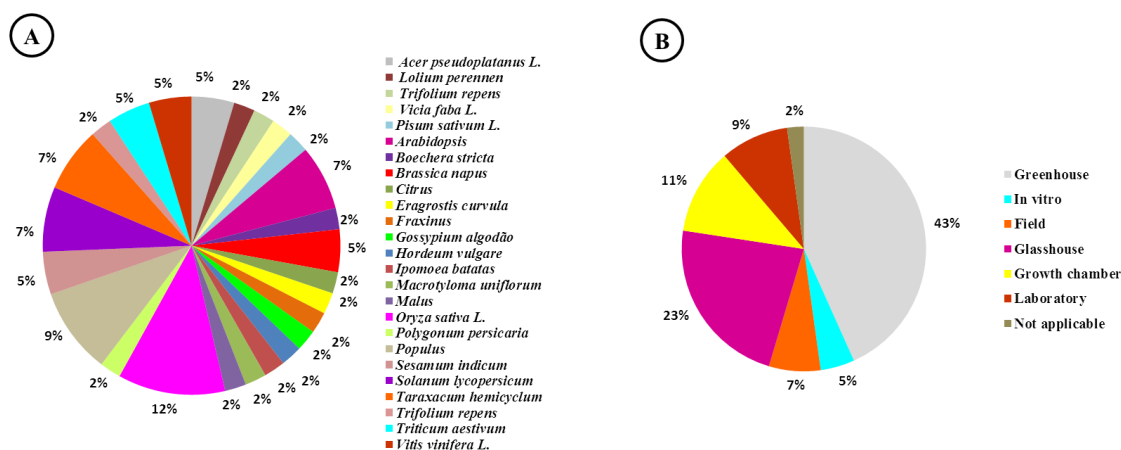


Figura 6: Frequência das espécies mais utilizadas nos estudos extraídos (A); Frequência de ambientes de estudo para aplicação do déficit hídrico (B).

Os experimentos nos quais foram testadas as condições de déficit hídrico se concentraram principalmente em casa de vegetação, ambiente experimental presente em 43% do total dos 41 estudos analisados. Outros ambientes controlados como, estufa e câmara de crescimento, apresentaram frequência de 23% e 11%, respectivamente, nos estudos. Poucos experimentos em campo foram realizados (Figura 6 B). A maioria das pesquisas foi desenvolvida na China, aproximadamente 35% do total de 41 estudos, seguido da Argentina, Estados Unidos da América, Índia, França e Brasil, com 13%, 10%, 8%, 5% e 3% (Figura 7).

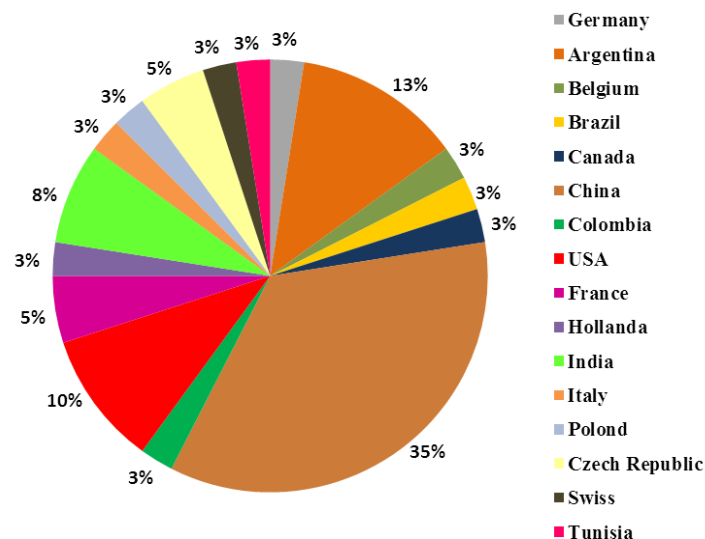


Figura 7: Principais países que produzem estudos sobre a seca associada aos mecanismos epigenéticos.

As bases epigenéticas mais exploradas nos estudos selecionados são expostas na Figura 8. Um percentual de 88,3% dos artigos investigam a metilação do DNA para identificar respostas relacionadas à seca e a memória do estresse e/ou transgeracional. Seguido da modificação da cromatina e acetilação de histonas com 4,5%. O mecanismo pouco explorado em buscas dessas respostas foi o RNA não codificantes (ncRNA) associados aos mecanismos epigenéticos, com 2,3% de frequência no total de estudos. Esses mecanismos são investigados com intenção de entendê-los e relaciona-los ao estresse em plantas por deficiência hídrica, alguns desses estudos também associaram os mecanismos epigenéticos a uma possível memória do estresse nas plantas.

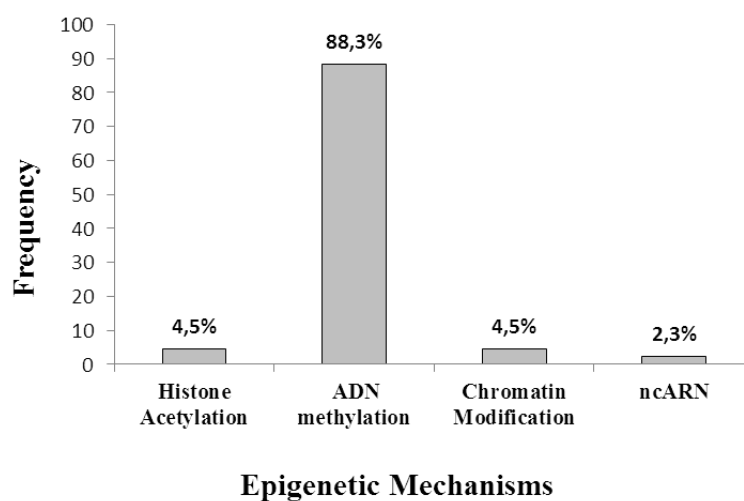


Figura 8: Frequência dos mecanismos epigenéticos mais abordados nos estudos para identificação de respostas relacionadas à seca e a memória do estresse e/ou transgeracional.

O método mais utilizado para entender os mecanismos epigenéticos frente às respostas envolvidas na tolerância à seca das plantas e possível desenvolvimento de memória do estresse foi a técnica MSAP (Amplificação de Polimorfismos Sensível a Metilação) com 36,4% no total de 41 estudos (Figura 9).

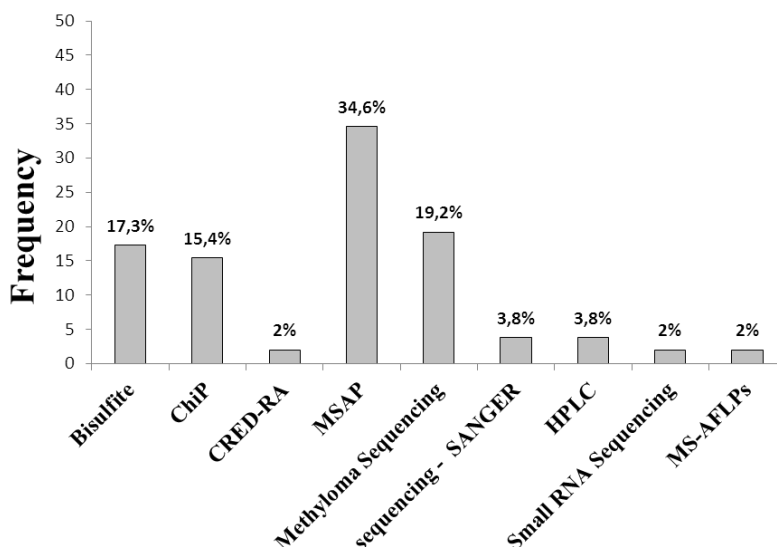


Figura 9: Frequência das principais técnicas para identificar marcas epigenéticas. Bissulfito; ChIP (Imunoprecipitação de Cromatina); CRED-RA (Digestão por Enzima de Restrição Acoplada e Amplificação Aleatória); MSAP (Amplificação de Polimorfismo Sensível a Metilação); Sequenciamento do Metiloma; SANGER (Método de Sequenciamento Sanger); HPLC (Cromatografia Líquida de Alta eficiência); MS – AFLPS (Amplificação de Polimorfismo Sensível a Metilação por marcador AFLP).

Métodos de sequenciamento do Metiloma (19,2%) também apresentou frequência bem acentuada entre os estudos, seguido do Bisulfito com 17,3% e Imunoprecipitação de cromatina (ChIP), 15,4%. Os demais métodos aplicados como: sequenciamento por SANGER, HPLC, CRED-RA, sequenciamento de Small RNA e MS – AFLPs, apresentaram frequência de 3,8 % e 2% (Figura 9).

Os estudos que analisaram expressão gênica representam 58,5% do total, estes associaram a expressão diferencial de alguns genes (Tabela 3) aos mecanismos epigenéticos. A maioria dos genes listados na Tabela 3 estão envolvidos em respostas a tolerância à seca.

Tabela 3: Genes responsivos a tolerância à seca que apresentam expressão diferencial associada aos mecanismos epigenéticos.

Genes	Functions regulated by drought associated epigenetic mechanisms	Authors
<i>AAO2</i>	Involved in Absciscic Acid Biosynthesis (ABA)	Colaneri et al., 2013
<i>NCED3</i>		
<i>ABA1</i>		
<i>AF063227.1</i>	Involved in water stress responses with retrotransposon function	Tang et al., 2014
<i>AJ535884.1</i>	Potentially drought related retroposson function	Bhardwaj et al., 2013
<i>AREB1</i>	Drought related transcription factor	Li et al., 2018
<i>Asr1</i>	Desiccation stress inducer and LEA superfamily protein coder	Gonzalez et al., 2013
<i>Asr1</i>	Desiccation stress inducer and LEA superfamily protein coder	Gonzalez et al., 2011
<i>C3H</i>	Transcription Factor Related to Water Stress Responses	Liang et al. 2014
<i>PHD</i>		
<i>MYB</i>		
<i>ARF</i>		
<i>bZIP</i>		
<i>Changwu134</i>	Related to Abiotic Stress Responses	Fei et al., 2017
<i>CHL 24 1</i>	Related to signal transduction	Labra et al., 2014
<i>DQ776899.1</i>	Binding factor responsive to dehydration 1 (cbf-1).	Bhardwaj et al., 2013
<i>FmaCO</i>	Growth and metabolism related	Zeng et al., 2014
<i>FmaEF1A</i>		
<i>FmaHSP70</i>		
<i>FmaWRKY2</i>		
<i>HSP17</i>	Heat Shock Protein, involved in drought responses	Temel et al., 2017
<i>LEA</i>	Related to dehydration responsive element binding protein.	Li - Cong et al., 2017
<i>LOC_01g03040</i>	Responsive to drought, protein expression	Shaik et al., 2012
<i>LOC_04g41340</i>	Drought responsive	Shaik et al., 2012
<i>LOC_10g10180</i>	Responsive to drought, methyltransferase domain	Shaik et al., 2012
<i>LOC_Os02g24190</i>	Involved in stress response	Zheng et al., 2013
<i>LOC_Os03g44380</i>	Involved in stress response	Zheng et al., 2013
<i>LOC_Os03g44380</i>	Involved in ABA biosynthesis and drought response	Zheng et al., 2013
<i>LOC_Os03g50210</i>	Involved in stress response	Zheng et al., 2013
<i>LOC_Os03g57790</i>	Involved in stress response	Zheng et al., 2013
<i>LOC_Os05g49100</i>	Involved in stress response	Zheng et al., 2013
<i>LOC_Os07g32880</i>	Responsive to drought, ATP synthase gamma chain.	Shaik et al., 2012
<i>LOC_Os12g07810</i>	Involved in stress response	Zheng et al., 2013
<i>MYBR1</i>	Transcription factors involved in physiological and biochemical stress responses	Colaneri et al., 2013
<i>ZFHD1</i>		
<i>ABF2</i>		
<i>HSF4</i>		
<i>NAC</i>	Stress responsive	Wang et al. 2016
<i>NCED</i>	Responsive in Absciscic Acid Biosynthesis	De Giovanni et al, 2015
<i>PtrNAC006</i>	Drought responsive	Li et al., 2018
<i>PtrNAC007</i>		
<i>PtrNAC120</i>		
<i>RING-H2</i>	Response to water stress	Lafon-Placette et al. 2018
<i>LOC_Os03g12290</i>	Drought tolerance related	Zheng et al., 2017
<i>TaGAPC1</i>	Related to osmotic and NaCl stress responses	Fei et al., 2017
<i>VjCDPK</i>	Potentially drought-related	Abid et al., 2017
<i>VjLOX</i>		
<i>VjABC</i>		
<i>VjGH</i>		
<i>WRKY</i>	Multistress regulated transcription factor	Wang et al., 2016
<i>XM_003567334.1</i>	Responsive to water stress	Tang et al., 2014
<i>XM_003580827.1</i>	Responsive to water stress, regulating peroxidase expression	Tang et al., 2014
<i>Zhengyin1</i>	Related to Abiotic Stress Responses	Fei et al., 2017

Apenas um artigo desta revisão apresentou processos biológicos ou funções moleculares afetados pelos mecanismos epigenéticos metilação ou desmetilação do DNA, associados aos Small RNAs em plantas sob condição de seca, esses processos são listados na Tabela 4.

Tabela 4: Genes Ontology com processos biológicos e moleculares enriquecidos afetados por mecanismos epigenético em plantas em condições de seca.

GO id	Term	Author
GO:0009414	Response to water deprivation	Morgado et al., 2017
GO:0009751	Response to salicylic acid	
GO:0009862	Systemic acquired resistance, salicylic ...	
GO:0009725	Response to hormone	
GO:0009755	Hormone-mediated signaling pathway	
GO:0009914	Hormone transport	
GO:0006950	Response to stress	
GO:0080134	Regulation of response to stress	
GO:0080136	Priming of cellular response to stress	
GO:0009628	Response to abiotic stimulus	
GO:0009611	Response to wounding	

De acordo com os 41 estudos analisados nesta revisão, 97,7% afirmaram que os componentes epigenéticos conferem tolerância às plantas em condições de déficit hídrico. Apenas 17% dos estudos citaram sobre a “memória” do estresse em plantas, no entanto, 39% relacionaram a “memória” transgeracional em plantas com mecanismos epigenéticos, 46,3% dos estudos relacionaram o envolvimento dos mecanismos epigenéticos na “memória” em plantas (Figura 10).

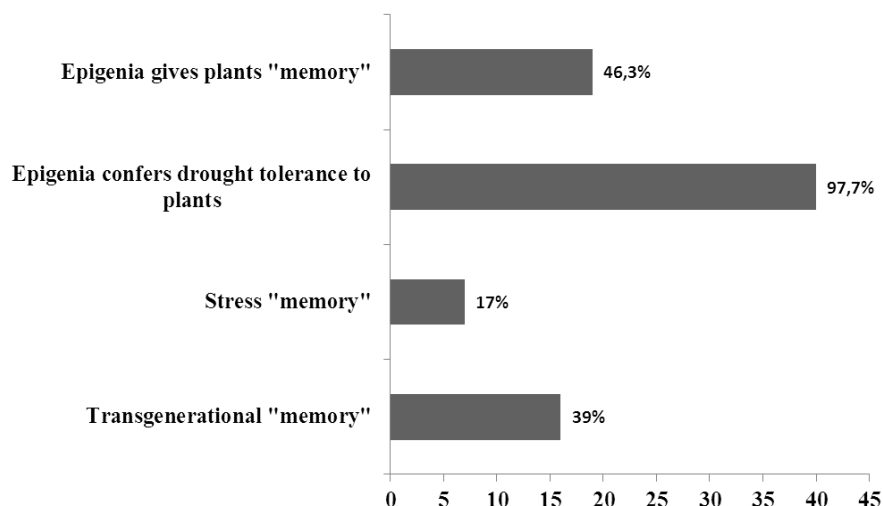


Figura 9: Frequência dos estudos com base no total dos 41 selecionados para a revisão sistemática.

DISCUSSÃO

Esta revisão sistemática apresenta dados compilados de artigos que investigaram os mecanismos epigenéticos envolvidos no estresse por seca em plantas, onde são reveladas novas compreensões das bases epigenéticas como mecanismos de sobrevivência das plantas em condições de seca.

Os vegetais são frequentemente perturbados por diferentes estressores ambientais e buscam a sobrevivência a partir de mudanças na expressão gênica que consequentemente modulam toda suas maquinarias (Gayacharam e Joel, 2013; Wang et al. 2015). Com mudanças climáticas previstas, a seca tem se tornado um dos principais fatores que afeta diretamente a homeostase das plantas e suas múltiplas funcionalidades, principalmente aquelas de maiores interesses para a produção agrícola mundial. É esperado que a restrição hídrica aumente em intensidade, frequência e extensão geográfica, como resultados do aquecimento global (Farooq, et al., 2012; Gonçalves et al., 2019).

Visto que, a limitação da água tornou-se a principal ameaça para o rendimento das culturas em todo mundo, as principais espécies de plantas sistematizadas na presente revisão, são plantas de cultivos de interesse agrônomo, destacando, *Oryza sativa*, *Citrus*, *Triticum aestivum*, *Populus* e *Vitis vinífera* L., Estudos com arroz (Wang et al., 2010) afirmam que o estresse hídrico é a restrição que mais limita a produção da cultura na maioria dos sistemas alimentados por chuva no mundo. O comportamento de

plantas modelos, frente a seca e aos mecanismos epigenéticos, também foram analisados, a exemplo de *Arabidopsis*, que é uma planta primitiva que enfrenta os estresses por escassez de água, desde que colonizaram os habitats (González et al., 2013). Sendo assim, entender e manipular a plasticidade do epigenoma das plantas sob seca direcionará esforços para aumentar a eficiência do uso do sistema agrícola mundial, e sistemas de conservação frente as mudanças ambientais (Colaneri e Jones, 2013).

As espécies de plantas estudadas nas experimentações sofreram déficit hídrico em ambiente controlado, como casa de vegetação, estufa e câmara de crescimento, onde a suspensão da irrigação é mais precisa, fazendo com que a taxa de transpiração exceda a taxa de absorção de água pelas raízes das plantas, o que caracteriza o déficit hídrico (Moreno-Fonseca, 2009; Li et al., 2013). A imposição de déficit hídrico em condições de campo foi pouco abordada, geralmente essa condição descreve melhor a realidade do cultivo das plantas, no entanto, requer instalações experimentais onerosas (Santos et al., 2018).

O déficit hídrico já é um problema mundial, afetando diretamente os países que tem o setor agrícola como base da economia, a exemplo da União Europeia, EUA e Brasil (Guedes, 2009). Com base nisso, essa revisão detectou um viés geográfico, visto que os estudos analisados se concentraram amplamente na Ásia, América do Norte e na Europa, enquanto países do continente Africano e América do Sul apresentaram poucas pesquisas. Essa tendência pode ser explicada pela riqueza econômica desses países, que podem direcionar pesquisas, a fim de solucionar suas principais problemáticas (Leimu e Koricheva, 2005; Kettenring e Adams, 2011). Apenas um estudo, 2% do total de 41, foi desenvolvido no Brasil (Neves et al., 2017), sendo que, as principais causas das perdas na agricultura brasileira são por seca ou excesso de chuva (Guedes, 2009).

Estudos de diversos países selecionados nesta revisão abordam a metilação do DNA como a principal base epigenética envolvida na tolerância a seca e uma possível “memória” das plantas, a qual apresentou maior frequência (88,3%). Isto, provavelmente por ser o primeiro mecanismo epigenético descrito em plantas, consequentemente o mais estudado (Abid et al., 2017). Law e Jacobsen (2010) sugeriram que diferente dos outros mecanismos epigenéticos, a metilação do DNA pode ser responsável pela manutenção da estabilidade do genoma, além de manter um padrão específico de expressão gênica por meio da divisão celular.

A metilação do DNA é caracterizada pelo adição de grupos metil (CH₃) à posição do carbono 5 do anel aromático da citosina do DNA, que através da ação das metiltransferases de DNA (DNMT) formam a 5 metilcitosina (Abid et al., 2017). As plantas apresentam metilação na citosina em três contextos de sequência: CG, CHG e CHH (onde H = A, T ou C) (Law e Jacobsen, 2010; Sanchez e Mackenzie, 2016; Xu et al., 2018). Estudos tem confirmado que modificações no padrão de metilação do DNA em plantas alteram a expressão de genes envolvidos em respostas aos estresses por seca, como: em arroz (Wang et al., 2011; Zheng et al., 2013, 2014; Garg et al., 2015), feijão (Abid et al., 2017), citros (Neves et al., 2017), maçã (Xu et al., 2018).

A seca é capaz de induzir alterações na metilação do DNA por meio da hipometilação ou hipermetilação em várias espécies de vegetais, como apresentado em estudos com cevada (Chwialkowska et al., 2016) e o azevém (Tang et al., 2014). Gayacharan e Joel (2013). Analisando os genótipos de arroz, foi observado que os genótipos mais sensíveis à seca apresentam um nível mais alto de metilação (hipermetilação) do que os genótipos de arroz tolerantes à seca (hipometilação). Esses resultados corroboram os achados de Neves et al., (2017), que analisando genótipos de plantas cítricas em condições recorrentes de seca, afirmam que genótipos tolerantes hipometilam seu DNA sob seca e os considerados susceptíveis hipermetilam.

Outras bases epigenéticas como acetilação da histona, modificação da cromatina e ncRNA foram pouco estudadas, sendo assim, exigem mais pesquisas sobre esses mecanismos, principalmente os associados ao ncRNA, que segundo os nossos resultados, apenas 2,3% dos artigos relataram.

Estudos desta revisão, como o de Li et al., (2019), analisaram o resíduo 9 de lisina acetilada em todo o genoma do enriquecimento de histona H3 (H3K9ac) em *Populus trichocarpa* sob condição de seca. Os resultados revelaram que os elementos responsivos ao ácido abscísico (ABA) nos promotores dos genes *PtrNAC006*, *PtrNAC007* e *PtrNAC120* em resposta a seca, tem expressão diferencial regulada por H3K9ac. Com isso podemos sugerir que o mecanismo epigenético, acetilação da histona, mais precisamente a H3K9ac é um marcador epigenético de cromatina de ativação gênica, como visto também outros trabalhos em outros eucariotos, incluindo plantas (Kurdistani et al., 2004 ; Kouzarides, 2007 ; Shahbazian e Grunstein, 2007, Li et al., 2019).

O mecanismo epigenético, modificação na cromatina esteve presente em 4,5% das pesquisas da presente revisão. Em estudos feito com canola, Verkes e colaboradores (2015) observaram que modificações na cromatina, ocorrência de trimetilação da histona 3 lisina – 4 (H3k4me3), estão associadas a regulação da expressão diferencial gênica como efeito do déficit hídrico. Os resultados mostraram que o enriquecimento dessas modificações foram maiores em plantas de canola sob seca do que em relação ao controle (plantas irrigadas), confirmando a relação da cromatina modificada (H3k4me3) com o fator estressor do ambiente. Isto pode fornecer evidências para o uso de episeleções em futuros estudos, como também o uso desse mecanismo como marcas preparatórias para respostas mais eficientes e rápidas das plantas na percepção do estresse.

Esforços eficazes devem ser feitos para realizar novos estudos que investiguem como os RNA não codificadores (ncRNA) estão associados as bases epigenéticas, visto que nessa revisão sistemática foi possível compilar apenas 2,3% de investigações que o abordasse. Uma análise epigenômica realizada em tomate, mostrou a presença de metilação no contexto de sequência CHH (onde H = A, T ou C) concentrada preferencialmente em elementos transponíveis e nos elementos repetitivos não codificadores, com isso foi possível observar que juntos com as DRM2 (DNA metiltransferases 2), pequenos RNAs interferentes mantinha as metilações do DNA no contexto de sequência CHH (González et al., 2011).

Analisando a “memória” transgeracional em dente de leão, Morgado et al., 2017, também detectaram a influência dos small RNAs entre os genes responsivos ao estresse por seca. O estudo ilustrara os small RNAs como um sinal epigenético que viajou entre as gerações de dente de leão preservando respostas eficazes contra o estresse. As principais bases epigenéticas supracitadas foram detectadas com o uso de técnicas como a MSAP, Bissulfito, Sequenciamento do Metiloma e ChiP. As duas primeiras técnicas apresentam custos mais baratos, a MSAP é caracterizada pelo uso de enzimas de restrição, sendo aplicada em estudos para detecção de metilação no genoma das plantas, variação epigenética somaclonal, metilação de citosina durante vários estágios de desenvolvimento e resistência a estresses bióticos e abióticos (Ashikawa, 2001 ; Sha et al., 2005 , Bednarek et al., 2017 ; Abid et al., 2017). No entanto, existem diferentes abordagens para interpretação dos seus dados (Schulz et al., 2013 ; Fulneček e Kovařík, 2014; Bednarek et al. 2017; Dossa et al., 2018), contudo, não é possível a identificação

do gene que sofre a modificação epigenética. O procedimento de bissulfito também é detectado para identificar 5 - metilcitosinas, entretanto, esta técnica permite uma resolução mais alta, pois é capaz de detectar todos os resíduos de citosina do genoma da planta (González et al., 2011).

O sequenciamento do metiloma e a imunoprecipitação da cromatina (ChIP) são técnicas bastante precisas, que detectam o gene que sofre as modificações epigenéticas, sejam elas em nível de DNA ou histonas, porém são bastante onerosas. Talvez por isso a frequência de estudos que investiguem modificações na cromatina e estabeleçam o epigenoma de plantas em condições estressoras tenham sido tão baixos na presente sistematização.

As marcas epigenéticas são oriundas de grupamentos químicos como metil, acetil, assim como ubiquitinas e fósforos, e quando atuam nas histonas, em regiões da cromatina ou do genoma, alteram a expressão diferencial gênica por influências ambientais. Entretanto, a depender da região gênica que ocorre essas modificações, os componentes epigenéticos podem conferir tolerância às plantas (Niciura et al., 2014).

Mais de 50 genes candidatos foram indicados como potenciais marcadores epigenéticos para tolerância à seca nas espécies de plantas investigadas, genes que na sua maioria apresentaram metilação ou acetilação na sua sequência. Os genes *AAO2*, *NCED3*, *ABA1*, envolvidos na biossíntese do ácido abscísico (ABA), tiveram suas funções reguladas pela metilação no DNA em *Arabidopsis*, sob condições de seca (Colaneri e Jones, 2013). A expressão de genes responsivos à seca em arroz, como *LOC_01g03040*, *LOC_04g41340*, *LOC_Os02g24190*, *LOC_Os03g44380*, também apresentaram regulação mediada pela metilação do DNA (Shaik e Ramakrishna, 2012; Zheng et al., 2013). Genes relacionados aos fatores de transcrição, em condição de seca apresentaram marcas epigenéticas que também modularam sua expressão diferencial, tais como *C3H*, *MYB*, *ARF*, *bZIP*, *HSF4*, *WRKY* (Colaneri e Jones, 2013; Liang et al. 2014; Wang et al., 2016).

Morgado et al., (2017) identificaram termos GO (Gene Ontology) para gerações de dente de leão em ambiente de seca. Termos GO envolvidos em processos biológicos e funções moleculares, a exemplo do GO:0009725 (Responsivos a hormônios), GO:0006950 (Resposta ao estresse), GO:0080136 (*Priming* celular), GO:0009628 (resposta a estímulos abióticos) foram afetados por mecanismos epigenéticos (metilação ou desmetilação) associados aos small RNAs. Foi observado

que subconjuntos de genes que mostraram mudanças mais fortes na abundância de small RNA foi significativamente enriquecidos por vários termos de GO.

Ainda de acordo com Morgado et al., (2017), essas modificações podem mostrar efeitos a longo prazo para as plantas em condições estressoras e, em alguns casos, uma “memória” de estresse pode persistir por gerações, possivelmente mediada por mecanismos epigenéticos garantindo sua sobrevivência. No entanto, existem poucos estudos documentados que abordem a “memória” de estresse ou “memória” de efeitos transgeracionais, além disso, ainda não está claro se os mecanismos epigenéticos estão envolvidos ou como estariam envolvidos nos tipos de “memória” em plantas.

No entanto, com base nos resultados dessa revisão sistemática, as pesquisas experimentais mostram que os mecanismos epigenéticos estão sim relacionados à “memória” em plantas. No entanto, 39% os associaram a uma “memória” transgeracional e apenas 17% à “memória” do estresse.

A “memória” do estresse em plantas é considerada mecanismos de detecção elaborados, mediados por cascatas de sinalização e redes de transcrição de genes que respondam a fatores estressores ambientais. Um dos mais conhecidos sistema de “memória” do estresse em plantas é o *priming*, termo anteriormente utilizados apenas para lembrar eventos passados causados por patógenos, e que atualmente se estendeu para qualquer tipo de estresse, seja biótico ou abiótico (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki 2005; Fu e Dong 2013; Kinoshita e Seki, 2014). Dessa forma, lembrar (*priming*) de perturbações passadas e usar os mecanismos armazenados para se adaptar a novos desafios, é bastante vantajoso para as plantas (Kinoshita e Seki, 2014).

O *priming* irá atuar em níveis fenotípicos das plantas, sem introduzir alterações nas sequências do DNA, portanto é considerado um evento reversível e de duração curta, podendo variar de dias a semanas (Lämke e Bäurle, 2017). Para todos os casos que tentam relacionar a “memória” do estresse a efeitos epigenéticos, uma base epigenética deve ser confirmada. Considerando o conceito que os fenômenos epigenéticos são reversíveis e hereditários, por meio das divisões celulares, sem alteração na sequência do DNA, nossa revisão sistemática identificou que os 17% dos estudos que trataram de “memória” do estresse não analisaram sequência de gerações, apenas se basearam nas respostas induzidas pela seca para admitir que a sobrevivência das plantas ao ambiente estressor está relacionada com a “memória” do estresse possivelmente induzida pelos mecanismos epigenéticos analisados (Shaik e

Ramakrishna, 2012; De Giovanni et al., 2015; Wang et al., 2016; Neves et al., 2017; Marfil et al., 2019).

Embora diferentes mecanismos possam estar subjacentes a “memória” de estresse das plantas gerada pelos efeitos ambientais, é possível que esse efeito do estresse induzido por mecanismos epigenéticos, seja uma “memória” transgeracional, devido a capacidade dos mecanismos epigenéticos serem potencialmente sensíveis ao ambiente e hereditário (Downen et al. 2012; Cortijo et al., 2014; Crisp et al. 2016 ;).

Um exemplo da “memória” ao estresse transgeracional foi apresentando por Morgado et al., (2017), onde foram analisadas gerações de dente-de-leão apomíticos em condições de seca. A prole da primeira geração de plantas expostas ao estresse apresentaram fenótipos modificados e diferentes perfis de metilação do DNA, sugerindo potencial para herança epigenética transgeracional induzida pelo ambiente.

González et al., (2018) com base nas suas observações afirmaram que a variação epigenética está pelo menos, parcialmente envolvida nos efeitos transgeracionais investigados. O estudo feito com *Trifolium repens* sob cinco tipos de ambientes estressores, entre eles, contaminação no solo, competição acima do solo e seca, associados a cinco genótipos e suas gerações, apresentaram como resultados que os efeitos transgeracionais são genótipo – específico para esta espécie, e que as alterações nas metilações do DNA foram induzidas pelo ambiente e herdável, mediando os efeitos transgeracionais. Além disso, também concluíram pela análise da variação da metilação do genoma que a seca foi um dos ambientes estressores que desencadeou o TGE mais forte.

Usando tratamentos de restrição hídrica em *Arabidopsis thaliana*, Ganguly et al., (2017) investigaram o metiloma dessas plantas dentro de uma geração e por secas sucessivas em cinco gerações. É mostrado no estudo que, embora os epialelos associados à seca no metiloma foram detectados dentro de uma geração, eles não se correlacionaram totalmente com a expressão de genes responsivos à seca. De seis características analisadas quanto à “memória” do estresse transgeracional, as gerações descendentes de linhagens estressadas por seca mostraram um efeito de “memória” em relação ao aumento da dormência das sementes que persistiu em uma geração não estressada. Para eles, apesar do grande interesse na “memória” do estresse em plantas, como um potencial substancial para melhorar a agricultura, ainda faz-se necessário novas investigações.

CONCLUSÕES

Esta revisão fornece novos *insights* sobre os impactos da seca no comportamento molecular responsivos de alguns vegetais. Além disso, apresentamos que os mecanismos epigenéticos conferem tolerância à seca e que são um dos fatores moleculares que induz a “memória” do estresse transgeracional em plantas. No entanto, a fim de obter uma melhor compreensão da herdabilidade e estabilidade dessas modificações epigenéticas induzidas pela seca, será necessário empregar metodologias avançadas em estudos futuros, a fim de que seja possível responder sobre qual o papel das tensões ambientais na adaptação e evolução dos mecanismos epigenéticos em plantas.

Essa revisão sistemática destacou o que existe de mais avançada no estudo da memória gênica relacionada ao estresse. Além disso, também apresentou lacunas que podem direcionar pesquisas futuras a exemplo da necessidade de explorar mais o envolvimento dos ncRNAs nas bases epigenéticas, como fator responsivo a tolerância a seca em plantas; e do direcionamento de esforços para o uso dos genes já identificados na regulação das marcas epigenéticas, em cunho biotecnológicos.

REFERÊNCIA

- Abid G, Mingeot D, Muhovski Y, Mergeai G, Aouida M, Abdelkarim S, Jebara M. (2017) Analysis of DNA methylation patterns associated with drought stress response in faba bean (*Vicia faba* L.) using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Environmental and Experimental Botany*, 142, 34-44.
- Ashikawa I (2001) Surveying CpG methylation at 5'-CCGG in the genomes of rice cultivars, *Plant Mol. Biol.* 45, 31–39.
- Bednarek PT, Orłowska R, Niedziela A (2017) A relative quantitative methylation-sensitive amplified polymorphism (MSAP) method for the analysis of abiotic stress, *BMC Plant Biol.* 17 - 79.
- Colaneri AC & Jones AM (2013) Identificação quantitativa em todo o genoma do DNA de locais diferencialmente metilados em mudas de *Arabidopsis* que crescem com diferentes potenciais hídricos. *PloS um* , 8 (4), e59878.
- Crisp PA, Ganguly D, Eichten SR, Borevitz JO, Pogson BJ (2016) Reconsidering plant memory: intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. *Sci Adv.* 2(2):e1501340
- Cortijo S, Wardenaar R, Colome-Tatche M, Gilly A, Etcheverry M, Labadie K, Caillieux E, Hospital F, Aury J-M, Wincker P (2014) Mapping the epigenetic basis of complex traits. *Science* 343(6175):1145–1148.
- De Giovanni C, Di Rienzo V, Miazzi M, Fanelli V, Blanco A, Montemurro C (2014). A DNA Methylation Survey of NCED Genes in *Vitis vinifera* L. under Stress Conditions. In XI International Conference on Grapevine Breeding and Genetics 1082 (pp. 277-283).
- Dossa K, Mmadi MA, Zhou R, Zhou Q, Yang M, Cisse N, Zhang X (2018) The contrasting response to drought and waterlogging is underpinned by divergent DNA methylation programs associated with gene expression in sesame. *bioRxiv*, 362905.

Dowen RH, Pelizzola M, Schmitz RJ, Lister R, Dowen JM, Nery JR, Dixon JE, Ecker JR (2012) Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(32):E2183–E2191.

Farooq M, Hussain M, Wahid A, Siddique KHM (2012). Drought stress in plants: an overview. In *Plant responses to drought stress* (pp. 1-33). Springer, Berlin, Heidelberg.

Fu ZQ & Dong X(2013) Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64: 839–863.

Fulneček J & Kovařík A (2014) How to interpret Methylation Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP) profiles? *BMC Genet.* 15 - 2.

Ganguly DR, Crisp PA, Eichten S R, Pogson BJ (2017) The Arabidopsis DNA methylome is stable under transgenerational drought stress. *Plant physiology*, 175(4), 1893-1912.

Garg R, Chevala VVSN, Shankar R, Jain M (2015). Divergent DNA methylation patterns associated with gene expression in rice cultivars with contrasting drought and salinity stress response. *Sci. Rep.* 5, 1–16.

Gayacharan & Joel, AJ (2013) Epigenetic responses to drought stress in rice (*Oryza sativa* L.). *Physiology and molecular biology of plants*, 19(3), 379-387.

Gonçalves LP, Camargo R LB, Takita MA, Machado MA, dos Soares Filho WS, Costa MG (2019) Rootstock-induced molecular responses associated with drought tolerance in sweet orange as revealed by RNA-Seq. *BMC genomics*, 20(1), 110.

González RM, Ricardi MM, Lusem ND (2011). Atypical epigenetic mark in an atypical location: cytosine methylation at asymmetric (CNN) sites within the body of a non-repetitive tomato gene. *BMC plant biology*, 11(1), 94.

González RM, Ricardi MM, Lusem ND (2013). Epigenetic marks in an adaptive water stress-responsive gene in tomato roots under normal and drought conditions. *Epigenetics*, 8(8), 864-872.

González APR, Preite V, Verhoeven K J, Latzel V (2018) Transgenerational effects and epigenetic memory in the clonal plant *Trifolium repens*. *Frontiers in plant science*, 9.

Guedes, ÍMR (2009) Mudanças climáticas globais e a produção de hortaliças. Embrapa Hortaliças-Outras publicações técnicas (INFOTECA-E).

Kettenring KM & Adams CR (2011) Lessons learned from invasive plant control experiments: a systematic review and meta-analysis. *Journal of applied ecology*, 48(4), 970-979.

Kinoshita T & Seki M (2014) Epigenetic memory for stress response and adaptation in plants. *Plant and Cell Physiology*, 55(11), 1859-1863.

Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128: 693–705.

Kurdistani SK, Tavazoie S, Grunstein M (2004) Mapping global histone acetylation patterns to gene expression. *Cell* 117: 721–733.

Lafon-Placette C, Le Gac L, Chauveau D, Segura V, Delaunay A, Lesage-Descauses MC, Bogeat-Triboulot M B (2017) Changes in the epigenome and transcriptome of the poplar shoot apical meristem in response to water availability affect preferentially hormone pathways. *Journal of experimental botany*, 69(3), 537-551.

Lämke J & Bäurle I (2017) Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants. *Genome biology*, 18(1), 124.

Law JA & Jacobsen SE (2010) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.* 11, 204–220.

Leimu R & Koricheva J (2005) What determines the citation frequency of ecological papers? *Trends in Ecology and Evolution*, 20, 28–32.

Li LF, Wang HY, Zhang C, Wang XF, Shi FX, Chen W-N, (2013) Origins and Domestication of Cultivated Banana Inferred from Chloroplast and Nuclear Genes. PLoS ONE. 8: 1–11.

Li S, Lin YCJ, Wang P, Zhang B, Li M, Chen S, Dai X (2019) The AREB1 Transcription Factor Influences Histone Acetylation to Regulate Drought Responses and Tolerance in *Populus trichocarpa*. The Plant Cell, 31(3), 663-686.

Liang D, Zhang Z, Wu H, Huang C, Shuai P, Ye CY, Yin W (2014) Single-base-resolution methylomes of *Populus trichocarpa* reveal the association between DNA methylation and drought stress. In BMC genetics (Vol. 15, No. 1, p. S9). BioMed Central.

Marfil C, Ibañez V, Alonso R, Varela A, Bottini R, Masuelli R, Berli F(2019). Changes in rapevine DNA methylation and polyphenols content induced by solar ultraviolet-B radiation, water deficit and abscisic acid spray treatments. Plant physiology and biochemistry, 135, 287-294.

Morgado L, Preite V, Oplaat C, Anava S, Ferreira de Carvalho J, Rechavi O, Verhoeven KJ (2017). Small RNAs reflect grandparental environments in apomictic dandelion. Molecular biology and evolution, 34(8), 2035-2040.

Moreno-Fonseca LP (2009) Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Uma revisão. Agronomía Colombiana, Bogotá, v.27, n.2, p.179-191.

Neves DM, da Hora Almeida LA, Santana-Vieira DDS, Freschi L, Ferreira CF, dos Santos Soares Filho W, da Silva Gesteira A (2017) Recurrent water deficit causes epigenetic and hormonal changes in citrus plants. Scientific reports, 7(1), 13684.

Niciura SCM & Saraiva NZ. (Eds.). (2014). Epigenética: bases moleculares, efeitos na fisiologia e na patologia, e implicações para a produção animal e a vegetal. Embrapa.

Pecinka A & Mittelsten Scheid O (2012) Stress-induced chromatin changes: a critical view on their heritability. Plant & Cell Physiology 53, 801–808.

Rabara RC, Tripathi P, Rushton PJ (2014). The potential of transcription factor-based genetic engineering in improving crop tolerance to drought. *OMICS* 18, 601–614.

Sanchez R & Mackenzie SA (2016). Genome-Wide discriminatory information patterns of cytosine DNA methylation. *Int. J. Mol. Sci.* 17

Schulz B, Eckstein RL, Durka W (2013) Scoring and analysis of methylation-sensitive amplification polymorphisms for epigenetic population studies, *Mol. Ecol. Resour.* 13, 642–653.

Sha AH, Lin XH, Huang JB, Zhang DP (2005) Analysis of DNA methylation related to rice adult plant resistance to bacterial blight based on methylation-sensitive AFLP (MSAP) analysis, *Mol. Genet. Genom.* 273, 484–490.

Shahbazian MD & Grunstein M (2007) Functions of sitespecific histone acetylation and deacetylation. *Annu. Rev. Biochem.* 76: 75–100.

Shaik R & Ramakrishna W (2012) Bioinformatic analysis of epigenetic and microRNA mediated regulation of drought responsive genes in rice. *PLoS One*, 7(11), e49331.

Santos AS, Amorim EP, Ferreira CF, Pirovani CP(2018) Water stress in *Musa* spp.: A systematic review. *PloS one*, 13(12)

Tang XM, Tao X, Wang Y, Ma DW, Li D, Yang H, Ma XR (2014). Analysis of DNA methylation of perennial ryegrass under drought using the methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) technique. *Mol. Genet. Genomics* 289, 1075–1084.

Verkest A, Byzova M, Martens C, Willems P, Verwulgen T, Slabbinck B, Peeters, M (2015) A seleção para melhorar a eficiência no uso de energia e a tolerância à seca em canola resulta em alterações distintas no transcriptoma e epigenoma. *Fisiologia vegetal* , 168 (4), 1338-1350.

Wang WS, Pan YJ, Zhao XQ, Dwivedi D, Zhu LH, Ali J, Li ZK (2010) Drought-induced site-specific DNA methylation and its association with drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of experimental botany*, 62(6), 1951-1960.

Wang W, Pan YJ, Zhao XQ, Dwivedi D, Zhu LH, Ali J, Fu BY, Li ZK (2011) Drought-induced site-specific DNA methylation and its association with drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 62, 1951–1960.

Wang W, Huang F, Qin Q, Zhao X, Li Z, Fu B (2015) Comparative analysis of DNA methylation changes in two rice genotypes under salt stress and subsequent recovery. *Biochemical and biophysical research communications*, 465(4), 790-796.

Wang W, Qin Q, Sun F, Wang Y, Xu D, Li Z, Fu B (2016) Genome-wide differences in DNA methylation changes in two contrasting rice genotypes in response to drought conditions. *Frontiers in plant science*, 7, 1675.

Xu J, Zhou S, Gong X, Song Y, van Nocker S, Ma F, Guan Q (2018) Single-base methylome analysis reveals dynamic epigenomic differences associated with water deficit in apple. *Plant biotechnology journal*, 16(2), 672-687.

Yamaguchi-Shinozaki K & Shinozaki K (2005) Organization of cisacting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant Sci.* 10: 88–94.

Zheng X, Chen L, Li M, Lou Q, Xia H, Wang P, Li T, Liu H, Luo L, (2013). Transgenerational variations in DNA methylation induced by drought stress in two rice varieties with distinguished difference to drought resistance. *PLoS One* 8, e80253.

Zheng X, Chen L, Lou Q, Xia H, Li M, Luo L, (2014). Changes in DNA methylation pattern at two seedling stages in water saving and drought-resistant rice variety after drought stress domestication. *Rice Sci.* 21, 262–270.

CONCLUSÕES GERAIS

A restrição hídrica recorrente induz metilações no DNA da copa Limeira ácida ‘Tahiti’ quando enxertada em limão ‘Cravo’ e ‘Sunki Maravilha’, hipometilando e hipermetilando, respectivamente, seu genoma;

As modificações epigenética, bem como a eficiência do sistema antioxidativo enzimáticos das plantas cítricas, desencadeadas por seca recorrente, podem preparar as plantas para exposições futuras de restrição hídrica;

Os porta-enxertos ‘Sunki Maravilha’ e ‘Sunki Tropical’ mostraram-se como alternativas de porta-enxertos para diversificação dos pomares de citros de regiões secas;

Os genes diferencialmente regulados por seca são genes candidatos à tolerância a seca que podem ser utilizados em trabalhos futuros para o melhoramento da citricultura;

A “memória” do estresse ou transgeracional em plantas sob condições de seca foi compreendida com a sistematização de estudos primários, bem como o envolvimento das bases epigenéticas nesse efeito.

REFEÊNCIAS

- Ahuja I, de Vos RC, Bones AM, Hall RD. (2010). Plant molecular stress responses face climate change. *Trends in plant science*, 15(12), 664-674.
- Allario T, Brumos J, Colmenero – Flores JM, Iglesias DJ, Pina JA, Navarro L, Morillon R. (2013). Tetraploid Rangpur lime rootstock increases drought tolerance via enhanced constitutive root abscisic acid production. *Plant, cell & environment*. Vol. 36(4), 856-868.
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS.(2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal Experimental Botany*. Vol.53, p.1331-1341, 2002.
- Anders S. & HUBER, W. (2010) . Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*. Vol. 11 : R106 .
- Apel K, Hirt H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*. Vol. 55, p. 373-99.
- Argamasilla R, Gómez-Cadenas A, Arbona V.(2014). Metabolic and regulatory responses in citrus rootstocks in response to adverse environmental conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*. Vol. 33(2), 169-180.
- Asada K. & Takahashi M. "Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis," in *Photoinhibition: Topics of Photosynthesis*. Kyle DJ, Osmond CB, Arntzen CJ. (1987). Elsevier. Vol.9, p. 227-287.
- Asada K.(1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. Vol. 50, p. 601-639.

Barrett HC, Rhodes AM. (1976). A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives. *Systematic Botany*. Vol. 1: 105:136

Bartel DP. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. Vol. 136(2), 215-233.

Bassan MM, Mourão Filho FDAA, Alves RF, Bezerra DF, Couto HTZ, Jacomino AP. (2016). Beneficiamento pós-colheita de lima ácida 'Tahiti' afeta sua qualidade e conservação. *Ciência Rural*. Vol. 46(1), 184-190.

Bassanezi RB, Gimenes-Fernandes N, Massari CA. (2002). Resultados do levantamento detalhado da morte súbita dos citros na região afetada: junho a setembro de 2002. Araraquara: Fundecitrus. Vol.9.

Blokhina O, Fagerstedt KV. (2010). Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Physiology Plant*. Vol. 138, 447-462

Bonifacio A, Martins MO, Ribeiro CW, Fontenele AV, Carvalho FE, Margis-Pinheiro M and Silveira JÁ. (2011). Role of peroxidases in the compensation of cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants under abiotic stress. *Plant Cell Environment*. Vol. 34:1705-1722.

Boyko AI, Kovalchuk. (2011). Genome instability and epigenetic modification- Heritable responses to environmental stress? *Curr. Opin. Plant Biol*. Vol. 14, 260-266.

Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E. (2000). "Responses to abiotic stresses," in *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. Vol. 1158-1203.

Brennecke J, Aravin AA, Stark A, Dus M, Kellis M, Sachidanandam R, Hannon GJ. (2007). Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell*. Vol. 128(6):1089-103.

Brossa R, Pintó-Marijuan M, Francisco R, López-Carbonell M, Chaves MM, Alegre, L. (2015). Redox proteomics and physiological responses in *Cistus albidus* shrubs subjected to long-term summer drought followed by recovery. *Planta*. Vol. 241(4), 803-822.

Bruce TJA, Matthes MC, Napier JA, Pickett JA. (2007), Stressful 'memories' of plants: evidence and possible mechanisms. *Plant Sci*. Vol. 173: 603-608.

Camporeale G, Oommen AM, Griffin JB, Sarath G, Zemleni J. (2007). K12-biotinylated histone H4 marks heterochromatin in human lymphoblastoma cells. *J Nutr Biochem*. Vol. 18:760-768.

Cantuarias-Avilés T, Mourão Filho, FDAA, Stuchi ES, da Silva SR, Espinoza-Nuñez, E. (2011). Horticultural performance of 'Folha Murcha' sweet orange onto twelve rootstocks. *Scientia Horticulturae*. Vol. 129 p.259-265.

Carvalho LM de, Carvalho HWL de, Barros I, de Martins CR, Soares Filho WS, Girardi EA, Passos, OS. (2019). Novas combinações de porta-enxertos para a diversificação de pomares de laranja doce em solos tropicais difíceis. *Scientia Horticulturae*, 243, 169-176. doi: 10.1016 / j.scienta.2018.07.032

Castel SE & Martienssen RA. (2013). RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nature Reviews Genetics*. Vol. 14(2), 100.

Caverzan A, Casassola A, Brammer SP. (2016). Antioxidant responses of wheat plants under stress. *Genetics and molecular biology*. Vol. 39(1), 1-6.

Chaves MM & Oliveira MM. (2004). Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture, *J. Exp. Bot.* Vol. 55, 2365-2384.

Cheeseman JM .(2007). Hydrogen peroxide and plant stress: a challenging relationship. *Plant Stress*. Vol. 1, p. 4-15

Chi YH, Paeng SK, Kim MJ, Hwang GY, Melencion SMB, Oh HT, Lee SY. (2013). Redox-dependent functional switching of plant proteins accompanying with their structural changes. *Frontiers in plant science*. Vol. 4, 277.

Chinnusamy V & Zhu JK. (2009). Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Current opinion in plant biology*. Vol. 12(2), 133-139.

Claeys H & Inze D.(2013). The agony of choice: how plants balance growth and survival under water-limiting conditions. *Plant Physiology*. Vol. 162, 1768-1779 .

Clarendon Press Kovtun Y, Chiu WL, Tena G and Sheen J. (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci*. Vol. 97:2940-2945.

Clark MB & Mattick JS (2011). Long noncoding RNAs in cell biology. In *Seminars in cell & developmental biology*. Vol. 22, No. 4, pp. 366-376

Conesa A, Madrigal P, Tarazona S, Gomez-Cabrero D, Cervera A, McPherson A, Mortazavi A. (2016). A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome biology*. Vol 17(1), 13.

Costa EDBO & Pacheco C. (2013). Epigenética: regulação da expressão gênica em nível transcricional e suas implicações. *Seminário Ciências Biológicas e da Saúde*. Vol 34(2), 125-136.

Crisp PA, Ganguly D, Eichten SR, Borevitz J O, Pogson BJ (2016). Reconsidering plant memory: intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. *Science advances*. Vol. 2(2), e1501340.

Cronn R, Knaus BJ, Liston A, Maughan PJ, Parks M, Syring JV, Udall J. (2012). Targeted enrichment strategies for next-generation plant biology. *American Journal of Botany*. Vol. 99(2), 291-311.

Cunha Sobrinho APDA, Passos OS, Soares Filho WDOSS. (2011). Seleção para cultivares porta-enxerto para o Nordeste brasileiro. In: Almeida CODE, Passos OS, Cunha Sobrinho APDA, Passos OS, Soares Filho W DOSS (Ed.). *Citricultura brasileira em busca de novos rumos: desafios e oportunidades na região Nordeste*. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura p. 73-100.

Curk F, Ollitrault F, Garcia-Lor A. Luro F, Navarro L, Ollitrault P. (2016). Phylogenetic origin of limes and lemons revealed by cytoplasmic and nuclear markers. *Annals of botany*. Vol. 117(4), 565-583.

Da Silva MJR, Paiva APM, Junior AP, Sánchez CAPC, Callili D, Moura MF, Tecchio MA. (2018). Yield performance of new juice grape varieties grafted onto different rootstocks under tropical conditions. *Scientia horticultrae*. Vol. 241, 194-200.

Das K & Roychoudhury A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*. Vol. 2, 53.

DAT J, Vandenabeele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Vol. 57, p. 779-795.

De Pinto MC & De Gara L.(2004).Changesintheascorbatemetabolismof apoplastic andsymplasticspacesareassociatedwithcelldifferentiation. *J. Exp. Bot.* Vol. 55, 2559-2569.doi:10.1093/jxb/erh253

De Souza JD, De Andrade Silva EM, Coelho Filho MA, Morillon R, Bonatto D, Micheli F, Da Silva Gesteira A. (2017). Different adaptation strategies of two citrus scion/rootstock combinations in response to drought stress. *PloS one*. Vol. 12(5), e0177993.

Ding Y, Fromm M, Avramova Z. (2012). Multiple exposures to drought 'train' transcriptional responses in *Arabidopsis*. *Nat. Commun*. Vol. 3: 740.

Donadio LC, Mourão Filho FAA, Moreira CS. (2005). Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: Mattos Júnior D, De Negri JD, Pio RM, Pompeu Júnior J (Ed.). *Citros*. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, pp.1-18.

Ducatti C. (2005). Drought Tolerance is Associated with Rooting Depth and Stomatal Control of Water Use in Clones of *Coffea canephora*. *Annals of Botany*. Vol. 96, pp. 101-108.

Fang DQ, Roose ML. (1997). Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics*, Amsterdam Vol.95, p 408-417.

Fantappie M. (2013). Epigenética e memória celular. *Revista Carbono*, 3.

Faostat (2019) FAOSTAT online database. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/en/#data>>.

Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. In *Sustainable agriculture* (pp. 153-188).

Somerville C, Briscoe J. (2001). *Genetic engineering and water*, Springer, Dordrecht. Science. Vol. 292, 2217.

Feil R & Berger F. (2007). Convergent evolution of genomic imprinting in plants and mammals. *TRENDS in Genetics*. Vol. 23(4), 192-199.

Feinberg AP, Tycko B. (2004) The history of cancer epigenetics. *Nature Reviews: Cancer*, London Vol. 4, p. 143 -153.

Figueiredo JO, Stuchi, ES, Donadio LC, Sempionato OR. (2002). Oorta-enxertos para a Lima-ácida-'Tahiti'na região de Vebedouro, sp. *Rev. Bras. Frutic*. Vol. 24(1).

Foyer CH (2018). Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. *Environmental and experimental botany*. Vol. 154, 134-142.

Gayacharan A & Joel J. (2013). Epigenetic responses to drought stress in Rice (*Oryza sativa* L). *Physiology and Molecular Biology of Plants*. Vol. 19, 379-387.

Gayet JP, Salvo Filho A. (20003). Colheita e beneficiamento. In: Mattos Junior D. de et al. Lima ácida 'Tahiti'. Campinas: Instituto Agrônômico p.147-162.

Gibbs WW. (2007) Além do DNA. *Scientific American Brasil*, São Paulo, n. 16, Edição Especial, Genoma: o código da vida, p. 44-51.

Gill SS & Tuteja N.(2010).Reactiveoxygenspeciesandantioxidantmachinery in abioticstresstoleranceincropplants. *PlantPhysiol.Biochem*.Vol 48, 909-930.

Gill SS, Khan NA, Anjum NA, Tuteja N. (2011). Plant Nutrition and Abiotic Stress Tolerance III, *Plant Stress* 5(Special Issue 1).

Gonçalves LP, Alves TF, Martins CP, de Sousa AO, dos Santos IC, Pirovani C P, Girardi EA. (2016). Rootstock-induced physiological and biochemical mechanisms of drought tolerance in sweet orange. *Acta physiologiae plantarum*. Vol 38(7), 174.

Gonçalves LP, Camargo RLB, Takita MA, Machado MA, dos Soares Filho WS, Costa MG. (2019). Rootstock-induced molecular responses associated with drought tolerance in sweet orange as revealed by RNA-Seq. *BMC genomics*. Vol 20(1), 110.

González RM, Ricardi MM, Iusem N D. (2013). Epigenetic marks in an adaptive water stress-responsive gene in tomato roots under normal and drought conditions. *Epigenetics*. Vol. 8(8), 864-872.

Gratão PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA. (2005) Making the life of heavy metal stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*. Vol. 32, p. 481-494.

Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M, Blood PD, Bowden J. (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat Protoc*. Vol. 8:1494-512.

Halliwell B & Gutteridge JMC. (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*.

Hartmann HT, Kester DE, Davies Junior FT, Geneve RL. (2011). *Plant propagation: principles and practices*. 8th. ed. Boston: Prentice-Hall. pp 915 .

Herman JJS & Sultan E. (2011). Adaptive transgenerational plasticity in plants: Case studies, mechanisms, and implications for natural populations. *Front. Plant Sci*. Vol. 2, 102.

Howell PMJR, Liu S, Ren S, Behlen C, Fodstad O, Riker AI. (2009). Epigenetics in human melanoma. *Cancer Control: Journal of the Moffitt Cancer Center, Tampa*. Vol. 16, n. 6, p. 200- 218.

IBGE: Disponível em: <http://www.ibge.gov.br> Acesso em 06 de junho de 2019.

Inze A, Vanderauwera S, Hoeberichts FA, Vandenabeele W, Van Gaeve T and Van Breusegem F. (2012). A subcellular localization compendium of hydrogen peroxide-induced proteins. *Plant Cell Environment*. Vol. 35:308-320.

Jacques FM, Guo SX, Su T, Xing YW, Huang YJ, Liu YSC, Zhou ZK. (2011). Quantitative reconstruction of the Late Miocene monsoon climates of southwest China:

a case study of the Lincang flora from Yunnan Province. *Palaeogeography*. Vol. 304, 318-327 (2011).

Jensen PJ, Makalowska I, Altman N, Fazio G, Praul C, Maximov S N, McNellis TW. (2010). Rootstock-regulated gene expression patterns in apple tree scions. *Tree Genetics & Genomes*. Vol. 6(1), 57-72.

Jirtle RL, Skinner MK. (2007). Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature Reviews Genetics*, London. Vol. 8, p. 253-262.

Jones HG. (2012). How do rootstocks control shoot water relations?. *New Phytologist*. Vol. 194(2), 301-303.

Kaikkonen MU, Lam MTY, Glass CK. (2011). Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovascular Research*. Vol. 90, 430-440.

Kar RK . (2011). Plant responses to water stress: Role of reactive oxygen species. *Plant Signaling & Behavior*. doi: <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17729>

Kinoshita T, Seki M. (2014). Epigenetic memory for stress response and adaptation in plants. *Plant and Cell Physiology*. Vol. 55(11), 1859-1863.

Koepke T, Dhingra A. (2013). Rootstock scion somatogenetic interactions in perennial composite plants. *Plant cell reports*. Vol. 32(9), 1321-1337.

Lima HHCD. (2014). Estudo do efeito de adsorvente alternativo de casca de laranja pera rio (*Citrus sinensis* L. osbeck) na adsorção de corante têxtil vermelho reativo BF-4G.

Liu XY, Li J, Liu MM, Yao Q, Chen J.Z. (2017). Transcriptome profiling to understand the effect of Citrus rootstocks on the growth of 'Shatangju' Mandarin. *PloS One*. Vol. 12(1), e0169897.

Liu X, Li J, Huang M, Chen J. (2015). Mechanisms for the influence of citrus rootstocks on fruit size. *Journal of agricultural and food chemistry*. Vol. 63(10), 2618-2627.

Lovrečić L, Maver A, Zadel M, Peterlin, B. (2013). The role of epigenetics in neurodegenerative diseases. In *Neurodegenerative Diseases*. IntechOpen.

Ma YZ. (2013). Two wheat glutathione peroxidase genes whose products are located in chloroplasts improve salt and H₂O₂ tolerances in *Arabidopsis*. *PLoS One*. Vol. 8:e73989.

Madlung A, Comai L. (2004). The effect of stress on genome regulation and structure. *Ann Bot*. Vol. 94:481-495.

Magalhães Filho JR, do Amaral LR, Machado DFSP, Medina CL, Machado EC. (2008). Deficiência hídrica, trocas gasosas e crescimento de raízes em laranjeira 'Valência' sobre dois tipos de porta-enxerto. *Bragantia*. Vol. 67, p.75-82.

Mahajan S & Tuteja N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch Biochem Biophys*. Vol. 444:139-158.

MAPA - Ministério da agricultura e produção animal. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/citrus>. Acesso em: 08 de junho de 2019.

Marfil C, Ibañez V, Alonso R, Varela A, Bottini R, Masuelli R, Berli F. (2019). Changes in grapevine DNA methylation and polyphenols content induced by solar ultraviolet-B radiation, water deficit and abscisic acid spray treatments. *Plant physiology and biochemistry*. Vol 135, 287-294.

Martin JA, Wang Z. (2011). Next-generation transcriptome assembly. *Nature Reviews Genetics*. Vol. 12, 671-682.

Martin J, Bruno VM, Fang Z, Meng X, Blow M, Zhang T, Wang Z. (2010). Rnnotator: an automated de novo transcriptome assembly pipeline from stranded RNA-seq reads. BMC Genomics. Vol. 11, 663.

Matos MM. (2007). A cultura do pinhão-mansô (*Jatropha curcas*) no Brasil. MAPA, p. 29.

Mattick JS, Amaral PP, Dinger ME, Mercer TR, Mehler MF. (2009). RNA regulation of epigenetic processes. Bioessays. Vol. 31(1), 51-59.

Mattos Junior D, Negri JD, Figueiredo JO, Pompeu Junior J. (2005). CITROS: principais informações e recomendações de cultivo. Versão eletrônica do Boletim Técnico 200 (IAC).

McDowell N, Pockman WT, Allen CD, Breshears DD, Cobb N, Kolb T, Yezzer EA. (2008). Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? New Phytologist. Vol. 178, 719-739.

Melnyk CW & Meyerowitz EM. (2015). Plant grafting. Current Biology. Vol 25(5), R183-R188.

Menezes-Benavente L, Teixeira FK, Kamei CLA and Margis-Mercer TR, Mattick JS. (2013). Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation. Nature Structural & Molecular Biology. Vol. 20, 300-307.

Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. Plant Cell Environ. Vol. 33, 453-467.

Mittler R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science. Vol. 7, p. 405-410.

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science*. Vol. 9(10), 490-498.

Mohammad F, Mondal T, Guseva N, Pandey GK, Kanduri C. (2010). Kcnq1ot1 noncoding RNA mediates transcriptional gene silencing by interacting with Dnmt1. *Development*. Vol. 137(15), 2493-2499.

Møller IM, Jensen PE, Hansson A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* Vol. 58, 459-481.

Mullineaux PM & Baker NR. (2010). Oxidative stress: antagonistic signaling for acclimation or cell death?. *Plant physiology*. Vol. 154(2), 521-525.

Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. (2014). The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. *Frontiers in plant science*. Vol. 5, 170.

Nathan D, Ingvarsdottir K, Sterner DE, Bylebyl GR, Dokmanovic M, Dorsey JA, Whelan KA, Krsmanovic M, Lane WS, Meluh PB. (2006). Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes Dev.* Vol. 20:966-976.

Neill S, Desikan R and Hancock J. (2002). Hydrogen peroxide signalling. *Curr Opin Plant Biol.* Vol. 5:388-395.

Neves DM, Filho MAC, Bellete BS, Silva MFGE, Souza DT, dos S. Soares Filho W, Gesteira AS. (2013). Estudo comparativo da acumulação de dioxigenase 9-cis-epoxicarotenoide putativa e acúmulo de ácido abscísico nas respostas de tangerina Sunki e limoeiro 'Cravo' ao déficit hídrico. *Molecular Biology Reports*, 40 (9), 5339-5349. doi: 10.1007 / s11033-013-2634-z

Neves DM, da Hora Almeida LA, Santana-Vieira DDS, Freschi L, Ferreira CF, Soares Filho SW, Gesteira SA . 2017. Recurrent water deficit causes epigenetic and hormonal changes in citrus plants. *Scientific Reports*. Vol 7(1), 13684.

Neves MF & Jank MS. (2006). *Perspectivas da cadeia produtiva da laranja no Brasil*. São Paulo.

Neves MF, Kalaki RB, Trombin VG. (2010). *O Retrato da Citricultura Brasileira*, Citrus BR.

Niciura SCM & Saraiva NZ. (Eds.). (2014). *Epigenética: bases moleculares, efeitos na fisiologia e na patologia, e implicações para a produção animal e a vegetal*. Embrapa.

O'Neil ST, Emrich SJ. (2013). Assessing De Novo transcriptome assembly metrics for consistency and utility. *BMC Genomics*. Vol. 14, 12.

Oliveira TM, da Silva FR, Bonatto D, Neves DM, Morillon R, Maserti BE, Gesteira, AS. (2015). Estudo comparativo dos perfis protéicos das plantas de tangerina Sunki e limão Cravo em resposta ao déficit hídrico. *BMC Plant Biology*, 15 (1), 69. doi: 10.1186 / s12870-015-0416-6

Ozsolak F & Milos PM. (2011) RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nature Rev. Genet*. Vol. 12, 87-98.

Pang CH & Wang BS. "Oxidative stress and salt tolerance in plants". In *Progress in Botany*, U. Lüttge, W. Beyschlag, and J. Murata. Springer, p. 231-245, 2008.

Passaia G, Caverzan A, Fonini LS, Carvalho FEL, Silveira JAG and Margis-Pinheiro M. (2014) Chloroplastic and mitochondrial GPX genes play a critical role in rice development. *Biol Plantarum*. Vol. 58:375-378.

Pastor V, Luna E, Mauch-Mani B, Ton J, Flors V. (2013). Primed plants do not forget. *Environ. Exp. Bot*. Vol. 94: 46-56.

Paulsen M, Tierling S, Walter J. (2008). DNA methylation and the mammalian genome. *Epigenetics*. Vol. 1-21.

Pedroso FKJV, Prudente DA, Bueno ACR, Machado EC, Ribeiro RV (2014) Drought tolerance in citrus trees is enhanced by rootstock-dependent changes in root growth and availability carbohydrate. *Environ Exp Bot*. Vol. 101:26-35.

Perl-Treves R, Perl A. (2002). Oxidative stress: an introduction. *Oxidative Stress in Plants*.

Pinheiro M. (2004). Salt stress induces altered expression of genes encoding antioxidant enzymes in seedlings of a Brazilian indica rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci*. Vol. 166:323-331.

Pinheiro HA, Damatta FM, Chaves ARM, Loureiro ME, Pio RM, Figueiredo JO, Stuchi ES, Cardoso SAB. Variedades copas. In: Mattos Junior D, Negri JD, Pio RM, Pompeu Junior J. (Ed.). *Citros*. Campinas: IAC; FUNDAG, 2005. Cap. 3, p.39-60.

Pisoschi AM & Pop A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*. Vol. 97, 55-74.

Polle A. (2001). Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate peroxidase-glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step analysis. *Plant Physiol* Vol. 126, 445-462 towards flux.

Pompeu Junior J. (2005). Porta-enxertos. *Citros*. Centro APTA Citros Sylvio Moreira, cap. 4, p. 62-104.

Raghavendra AS, Gonugunta VK, Christmann A, Grill E. (2010). ABA perception and signalling. *Trends in plant science*. Vol.15(7), 395-401.

Resende MLV, SALGADO SML, CHAVES ZM. (2003). Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatologia Brasileira*. Vol. 28, p. 123-130.

Ribeiro CW, Carvalho FEL, Rosa SB, Alves-Ferreira M, Andrade CMB, Ribeiro-Alves M, Silveira JAG, Margis R and Margis-Pinheiro M. (2012). Modulation of genes related to specific metabolic pathways in response to cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants. *Plant Biol*. Vol. 14:944-955.

Richards EJ. (2006). Inherited epigenetic variation: revisiting soft inheritance. *Nature Reviews:Genetics*, London. Vol. 7, p. 395-401.

Robertson G, Schein J, Chiu R, Corbett R, Field M, Jackman SD, Griffith M. (2010). De novo assembly and analysis of RNA-seq data. *Nature Methods*. Vol. 7, 909-912.

Rodriguez-Gamir J, Primo-Millo E, Forner JB, Angeles Forner-Giner M. (2010). Citrus rootstock responses to water stress. *Scientia Horticulturae*. Vol. 126, 95-102.

Romero P, Navarro JM, Pérez-Pérez J, García-Sánchez F, Gómez-Gómez A, Porras I, Botía P. (2006). Deficit irrigation and rootstock: their effects on water relations, vegetative development, yield, fruit quality and mineral nutrition of Clemenules mandarin. *Tree Physiology*. Vol. 26, 1537-1548.

Rosa SB, Caverzan A, Teixeira FK, Lazzarotto F, Silveira JA, Ferreira-Silva SL, Abreu-Neto J, Margis R and Margis-Pinheiro M. (2010). Cytosolic APx knockdown indicates na ambiguous redox responses in rice. *Phytochemistry*. Vol. 71:548-558.

Sah SK, Reddy KR, Li J. (2016). Absciscic acid and abiotic stress tolerance in crop plants. *Frontiers in plant science*. Vol. 7, 571.

Salekdeh GH, Reynolds M, Bennett J, Boyer J. (2009). Conceptual framework for drought phenotyping during molecular breeding. *Trends Plant Sci*. Vol. 14:488-96.

Santana-Vieira DDS, Freschi L, da Hora Almeida LA, De Moraes D S, Neves DM, Dos Santos LM, Gesteira SA . (2016). Survival strategies of citrus rootstocks subjected to drought. Scientific reports. Vol 6, 38775.

Santos-Rosa H, Kirmizis A, Nelson C, Bartke T, Saksouk N, Cote J, Kouzarides T. (2009). Histone H3 tail clipping regulates gene expression. Nat Struct Mol Biol. Vol. 16(1): p. 17-22.

Santos IC, de Almeida AAF, Pirovani CP, Costa MGC, Belleto BS, Freschi L, da Silva Gesteira, A. (2017). Acúmulo diferencial de flavonóides e fitohormônios resultantes da interação copa / porta-enxerto de plantas cítricas submetidas à desidratação / reidratação. Fisiologia vegetal e bioquímica. Vol. 119 , 147-158.

Scandalios JG. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. Vol. 38, p. 995-1014.

Schinor EH, Siviero A, Cristofani-Yaly M, Marengo S, Pompeu Junior J, Machado MA. (2011). Caracterização agrônômica e molecular de acessos de Citrus Sunki do Banco de Germoplasma de Citros do Centro APTA Citros Sylvio Moreira. Citrus Research & Technology. Vol. 32, p. 27-37.

Scora RW. (1975). On the history and origin of Citrus. Bulletin of the Torrey Botanical Club. Vol. 102, n. 6, p. 369-375.

Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M.(2012).Reactiveoxygen species, oxidativedamage,andantioxidativedefensemechanisminplantsunder stressfulconditions. J. Bot. doi:10.1155/2012/217037.

Simpson CR, Nelson SD, Melgar JC, Jifon J, King SR, Schuster G, Volder A. (2014). Growth response of grafted and ungrafted citrus trees to saline irrigation. Scientia Horticulturae. Vol. 169, 199-205.

Slesak I, Libik M, Karpinska B, Karpinski S and Miszalski Z. (2007). The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to stresses environmental. *Acta Biochim Pol.* Vol. 5:39-50.

Soares Filho WS, Diamantino MSAS, Moitinho EDB, Cunha Sobrinho APD. (2002). 'Tropical': uma nova seleção de tangerina 'Sunki'. *Revista Brasileira de Fruticultura.* Vol. 24, p. 127-132.

Soares Filho WS, Sobrinho APC, Passos OS, Moitinho, EDB. (2003). Maravilha, uma nova seleção de tangerina Sunki. *Revista Brasileira de Fruticultura,* Vol. 25, p.268-271.

Sreenivasulu N, Sopory SK, Kishor K. (2007). Deciphering the regulatory mechanisms of abiotic stress tolerance in plants by genomic approaches. *Gene.* Vol. 388, pp. 1-13. 2.

Sridhar VV, Kapoor A, Zhang K, Zhu J, Zhou T, Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK. (2007). Control of DNA methylation and heterochromatic silencing by histone H2B deubiquitination. *Nature.* Vol. 447:735-738.

Surget-Groba Y & Montoya-Burgos, JI. (2010). Optimization of de novo transcriptome assembly from next-generation sequencing data. *Genome Res.* Vol. 20, 1432-1440.

Swingle WT & Reece PC in “The Citrus Industry”. History, World Distribution, Botany, and Varieties Vol. 1 (eds Reuther, W. et al.) 190-430 (Univ. California, 1967).
Talbert PB & Henikoff S. (2006). Spreading of silent chromatin: inaction at a distance. *Nature Reviews: Genetics,* London. Vol. 7, p. 793-803.

Tang XM, Tao X, Wang, Y, Ma DW, Li D, Yang H, Ma XR. (2014). Analysis of DNA methylation of perennial ryegrass under drought using the methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) technique. *Molecular Genetics and Genomics.* Vol. 289, 1075-1084.

Temel A, Janack B, Humbeck K. (2017). Drought Stress-related physiological changes and histone modifications in barley primary leaves at HSP17 gene. *Agronomy*. Vol. 7(2), 43.

Torres MA, Dangl JL, Jones JD. (2002). Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 99(1), 517-522.

Tost J. (2010). DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. *Molecular biotechnology*. Vol. 44(1), 71-81.

Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR Pimentel H, Salzberg SL, Rinn JL, Pachter L. (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature protocols*. Vol. 7, 562-78.

Tricker PJ, Lopez CM, Gibbings G, Hadley P, Wilkinson MJ. (2013). Transgenerational, dynamic methylation of stomata genes in response to low relative humidity. *Int. J. Mol. Sci*. Vol. 14: 6674-6689.

Tuberosa R, Salvi S.(2006). Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. *Trends in Plant Science*. Vol. 11, N° 8, pp. 405-412.

Tzarfati R, Ben-Dor S, Sela I, Goldschmidt EE. (2013). Graft-induced changes in microRNA expression patterns in Citrus leaf petioles. *Open Plant Sci*. Vol 7, 17-23.

Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu JK. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal*. Vol. 45(4), 523-539.

Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhy J, Zhu J.K. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal*. Vol. 45, p. 523-539.

Waggoner D. (2007). Mechanisms of disease: epigenesis. *Seminars in Pediatric Neurology*, Philadelphia. Vol. 14, p. 7-14.

Wang W, Huang F, Qin Q, Zhao X, Li Z, Fu B. (2015). Comparative analysis of DNA methylation change in two Rice genotypes under salt stress and subsequent recovery. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 465, 790-796.

Wang X, Cai X, Xu C, Wang Q, Dai S. (2016). Drought-responsive mechanisms in plant leaves revealed by proteomics. *International journal of molecular sciences*. Vol. 17(10), 1706.

Wang,Z, Gerstein M, Snyder M. (2009). RNA-seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Rev. Genet*. Vol. 10, 57-63.

Waterland NL, Campbell CA, Finer JJ, Jones ML. (2010). Absciscic acid application enhances drought stress tolerance in bedding plants. *Hort Sci*. Vol. 45, 409-413.

Weidman JR, Dolinoy DC, Murphy SK, Jirtle RL. (2007). Cancer susceptibility: epigenetic manifestation of environmental exposures. *The Cancer Journal*, Philadelphia. Vol. 13, n.1, p. 9-16, 2007.

Wendling I, Zanette F, Rickli-Horsti HC, CONSTANTINO V. (2017). Produção de mudas de araucária por enxertia. Embrapa Florestas-Capítulo em livro científico (ALICE).

Wery J, Silim SN, Knights EJ, Malhotra RS, Cousin R. (1994). Screening techniques and sources and tolerance to extremes of moisture and air temperature in cool season legumes, *Euphytica*. Vol. 73, 73-83.

Wu GA, Terol J, Ibanez V, López-García .(2018). Genomics of the origin and evolution of Citrus. *Nature*. Vol. 554(7692), 311.

Xavier A, Wendling I, Silva RL. (2013). *Silvicultura clonal: princípios e técnicas*. 2. ed. Viçosa, MG: Ed. da UFV. 2013. p. 279.

Xiao M, Zhang Y, Chen X et al. (2013). Transcriptome analysis based on next-generation sequencing of non-model plants producing specialized metabolites of biotechnological interest. *Journal of Biotechnology*. Vol. 166, 122-134.

Yu K, Xu Q, Da X, Guo F, Ding Y, Deng X. (2012). Transcriptome changes during fruit development and ripening of sweet orange (*Citrus sinensis*). *BMC Genomics*. Vol. 13: 10.

Zandalinas SI, Balfagón D, Arbona V, Gómez-Cadenas A. (2017). Modulation of antioxidant defense system is associated with combined drought and heat stress tolerance in citrus. *Frontiers in plant science*. Vol. 8, 953.

Zhang K, Sridhar VV, Zhu J, Kapoor A, Zhu JK. (2017). Distinctive core histone post-translational modification patterns in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*. Vol. 11:e1210.

Zhang X, Breksa AP, Mishchuk DO, Slupsky CM. (2011). Elevation, rootstock, and soil depth affect the nutritional quality of mandarin oranges. *J Agr Food Chem*. Vol. 11; 59: 2672 - 2679.

Zhang J, Jia W, Yang J, Ismail A M. (2006). Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crops Research*. Vol. 97, 111-119.

Zhao QY, Wang Y, Kong YM, Luo D, Li X, Hao P. (2011). Optimizing de novo transcriptome assembly from short-read RNA-Seq data: a comparative study. *BMC bioinformatics*. Vol. 12(14), S2.

Zingaretti SM, Inácio MC, de Matos Pereira L, Paz TA, de Castro França S. (2013).
Water stress and agriculture. In Responses of Organisms to Water Stress. IntechOpen.