



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL**

**PRISCILA DA CONCEIÇÃO DE SOUZA BRAGA**

**RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS DURANTE O CRESCIMENTO E  
PRODUÇÃO EM GENÓTIPOS DE CRAMBE SOB DÉFICIT HÍDRICO**

Vitória - ES

2019

PRISCILA DA CONCEIÇÃO DE SOUZA BRAGA

**RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS DURANTE O CRESCIMENTO E  
PRODUÇÃO EM GENÓTIPOS DE CRAMBE SOB DÉFICIT HÍDRICO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Antelmo Ralph Faqueto

Co-orientador: Dr. João Paulo R. Martins

Co-orientador: Prof. Dr. Robson Bonomo

Vitória - ES

2019

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

B813r

Braga, Priscila da Conceição de Souza, 1987-

Respostas morfofisiológicas durante o crescimento e produção em genótipos de crambe sob déficit hídrico / Priscila da Conceição de Souza Braga. - 2019.

150 f. : il.

Orientador: Antelmo Ralph Falqueto.

Coorientadores: Robson Bonomo, João Paulo Rodrigues Martins.

Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais.

1. *Crambe abyssinica*. 2. floração. 3. fluorescência da clorofila a. 4. germinação. 5. memória ao estresse hídrico. 6. tolerância a seca. I. Falqueto, Antelmo Ralph. II. Bonomo, Robson. III. Martins, João Paulo Rodrigues. IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais. V. Título.

CDU: 57

---

Priscila da Conceição de Souza Braga

**“Respostas morfofisiológicas durante o crescimento e produção em genótipos de crambe sob déficit hídrico”**

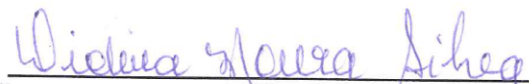
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutora em Biologia Vegetal.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2019.

Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Antelmo Ralph Falqueto (PPGBV-UFES)  
Orientador e Presidente da Comissão



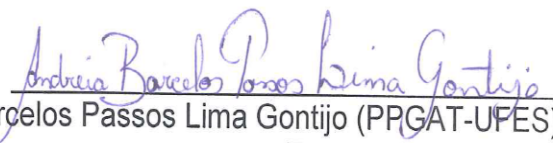
Profª. Dra. Diolina Moura Silva (PPGBV-UFES)  
Examinadora interna



Profª. Dra. Camilla Rozindo Dias Milanez (PPGBV-UFES)  
Examinadora interna



Prof. Dr. Fábio Luiz Partelli (PPGAT-UFES)  
Examinador externo



Profª. Dra. Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo (PPGAT-UFES)  
Examinadora externa

*À Deus, ao meu querido esposo, Wilkerson Mcalister,  
aos meus pais, Cloves e Rose, irmã Pricislayne e sobrinha Beatriz  
e a todos que fizeram desse sonho uma realidade.*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES);

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal (PPGBV);

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), que subsidiou a bolsa de pesquisa e projeto de pesquisa;

À Trindade Santa (Deus, Jesus Cristo e o Espírito Santo) pela força e oportunidade de realizar esse sonho. Como está escrito em Salmos 16:5:6 - “Senhor, tu és a minha porção e o meu cálice; és tu que garantes o meu futuro. As divisas caíram em lugares agradáveis: Tenho uma bela herança”;

Ao prof. Dr. Antelmo Ralph Falqueto, por ter aceitado me orientar, pela amizade, pelo incentivo, confiança, dedicação, por todo seu empenho em todo tempo;

Ao Dr. João Paulo Rodrigues Martins, por ter aceitado me co-orientar, por seus conselhos, apoio nas análises estatísticas, cortes e dados anatômicos e por sua amizade;

Ao prof. Dr. Robson Bonomo, por ter aceitado me co-orientar, pelo apoio e contribuições, durante e após o período experimental;

A Fundação MS para pesquisa e difusão de tecnologias agropecuárias (FMS) pela disponibilidade das sementes de crambe e suporte técnico necessários durante o estudo;

A todos os professores e profissionais do Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, pelo conhecimento transmitido, dedicação e valiosas contribuições;

À profa. Dra. Diolína Moura Silva e prof. Dr. Fabio Luiz Partelli pela participação na banca de qualificação e pelos aconselhamentos na defesa;

Aos membros da banca, que aceitaram corrigir este trabalho e por todas as contribuições;

Aos técnicos da Fazenda experimental Alex Campanharo e Gleison Oliosi, pelo auxílio e disposição a todo o momento;

Aos colegas Railda Martins Borges, Lucas de Almeida Leite, Vinícius Fonseca dos Santos, Ana Carolina Lopes Francisco de Oliveira, Thais Santana do Nascimento, Yasmin de Assis

Faria, Jéssica Sayuri Hassuda Santos e Débora da Silva Magevski, pelo suporte durante o período experimental, sem vocês teria sido muito mais difícil;

Aos colegas do Laboratório de Ecofisiologia Vegetal e Cultura de Tecidos, pelo acolhimento e incentivo;

À Thayna dos Santos Silva pelo auxílio durante a montagem do laminário e na captura das imagens;

E agora, as pessoas mais especiais na minha vida, sem vocês não teria chegado até aqui;

Ao meu querido e amado esposo Wilkerson Mcalister Coelho Braga, por acreditar em mim, muitas vezes mais do que eu mesma, pelo incentivo e apoio em todos os momentos;

Aos meus pais Cloves de Souza e Rosicler da Conceição de Souza, irmã Pricislayne da Conceição de Souza e sobrinha Beatriz de Souza Braga, pelas orações e compreensão quando não pude estar perto;

Ao meu sogro Daniel Braga e sogra Ester Maria Coelho Braga, pelas orações e incentivo.

A todos, muito obrigada!

## RESUMO

Crambe (*Crambe abyssinica* Hochst, Brassicaceae) é uma cultura anual nativa da região mediterrânea da Etiópia e tem sido cultivada em algumas regiões tropicais e subtropicais. Por não competir com oleaginosas utilizadas na alimentação humana, tem sido uma cultura inovadora no setor de agronegócio brasileiro com potencial supridor de óleo vegetal isolante. Atualmente, novos genótipos têm sido testados a fim de expandir e melhorar a produtividade da cultura no Brasil. O objetivo deste estudo foi avaliar a tolerância de genótipos de crambe ao déficit hídrico quanto aos aspectos fisiológicos, anatômicos e de produção nas diferentes fases do seu desenvolvimento. Os resultados obtidos contribuirão para a expansão da cultura para regiões caracterizadas por baixa precipitação, como o Estado do Espírito Santo. Quatro experimentos foram instalados: Capítulo 1 – este experimento foi realizado em sala de crescimento e comparou a germinação e crescimento inicial de cinco genótipos de crambe (FMS Brilhante, FMS CR 1203, 1307, 1312 e 1326) submetidos ao déficit hídrico induzido por solução de polietilenoglicol. Neste experimento, a germinação e o vigor de sementes de crambe foram prejudicados pela redução do potencial de  $-0,4$  MPa. O genótipo FMS CR 1203 é o mais tolerante ao estresse hídrico, enquanto os FMS CR 1307 e 1312 são os mais sensíveis. Capítulo 2 – este experimento foi realizado em casa de vegetação, investigou e comparou os efeitos do déficit hídrico no crescimento vegetativo sobre as características fotossintéticas utilizando à análise cinética da fluorescência transiente da clorofila *a* em dois genótipos de crambe: FMS CR 1307 e 1326. Sob déficit hídrico, os genótipos de crambe apresentaram repostas fotoquímicas diferenciadas. O genótipo FMS CR 1326 apresentou maior vantagem em termos de estabilidade e eficiência na utilização de energia sob supressão hídrica, enquanto o genótipo FMS CR 1307 parece possuir maior fotoproteção do FSI. Capítulo 3 – este experimento foi realizado em casa de vegetação e avaliou o desempenho do crambe (FMS Brilhante, FMS CR 1307 e 1326) sob condições limitantes de água por exposições prévias ao déficit hídrico. As repetidas exposições ao déficit hídrico nas plantas de crambe resultaram em alterações morfofisiológicas das plantas, refletindo em um melhor desempenho fotoquímico acoplado a moderados ajustes anatômicos, indicando aclimação diferencial (memória ao déficit hídrico) sob déficit hídrico. O genótipo FMS CR 1307 apresentou melhor desempenho fotoquímico, confirmando a existência de memória ao déficit hídrico no FSII. Capítulo 4 - este experimento foi realizado em casa de vegetação e investigou o efeito do déficit hídrico intenso aplicado no início do estágio do florescimento sobre as características fisiológicas e produção de grãos de crambe (FMS CR 1307 e FMS CR 1326), bem como a possível dormência das sementes da progênie em decorrência ao déficit hídrico.



O déficit hídrico resultou em efeitos negativos sobre o aparato fotoquímico das plantas, além de reduções na condutância estomática. Ainda, essas alterações nas respostas fisiológicas das plantas refletiram em redução da produção dos grãos e inibição da germinação da progênie. O genótipo FMS CR 1307 apresentou melhor ajuste fotoquímico durante o período de déficit hídrico e recuperação, confirmando tolerância fotoquímica sob déficit hídrico. Diante destes resultados, é possível concluir de forma geral que as alterações fisiológicas e anatômicas contribuíram de forma positiva para que o genótipo FMS CR 1307 apresentasse maior tolerância à deficiência hídrica nos tratamentos testados.

**Palavras-chave:** *Crambe abyssinica*• floração• fluorescência da clorofila *a*• germinação• memória ao estresse hídrico• tolerância a seca

## ABSTRACT

*Crambe* (*Crambe abyssinica* Hochst, Brassicaceae) is an annual crop native to the Mediterranean region of Ethiopia and it has been cultivated in some tropical and subtropical regions. Because it does not compete with oilseeds used in human consumption, it has been an innovative crop in the Brazilian agribusiness sector with a potential supply of insulating vegetable oil. Currently, new genotypes have been tested in order to expand and improve crop productivity in Brazil. The aim of this study was to evaluate the tolerance of crambe genotypes to water deficit in terms of physiological, anatomical and, production aspects in the different development phases. The results obtained will contribute to the crop expansion to regions characterized by low precipitation, such as the State of Espírito Santo. Four experiments were installed: Chapter 1 – this experiment was carried out in a growth room and compare the germination and initial growth of five crambe genotypes (FMS Brilhante, FMS CR 1203, 1307, 1312 and, 1326) submitted to the water deficit induced by polyethylene glycol solution. In this experiment, the germination and vigor index of crambe seeds were hampered by the reduction in the potential to -0.4 MPa. The genotype FMS CR 1203 is the most tolerant to water stress, whereas FMS CR 1307 and 1312 are the most sensitive. Chapter 2 – this experiment was carried out in a greenhouse, investigated and compared the effects of water deficit on vegetative growth on photosynthetic characteristics using kinetic analysis of transient chlorophyll a fluorescence in two crambe genotypes: FMS CR 1307 and 1326. Under water deficit, the crambe genotypes showed differentiated photochemical responses. The FMS CR 1326 genotype presented greater advantage in terms of stability and energy efficiency under water suppression, whereas the FMS CR 1307 genotype appears to have higher PSI photoprotection. Chapter 3 - this experiment was carried out in a greenhouse and evaluated the performance of crambe (FMS Brilhante, FMS CR 1307 and, 1326) under water limiting conditions by previous exposures to water deficit. The repeated exposures to the water deficit in the crambe plants resulted in morpho-physiological changes of the plants, reflecting in a better photochemical performance coupled with moderate anatomical adjustments, indicating differential acclimation (memory to the water deficit) under water deficit. The FMS CR 1307 genotype presented better photochemical performance, confirming the existence of water deficit memory in PSII. Chapter 4 - this experiment was carried out in a greenhouse and investigated the effect of the intense water deficit applied at the beginning of the flowering stage on the physiological characteristics and production of crambe grains (FMS CR 1307 and FMS CR 1326) as well as possible dormancy of the progeny seeds due to water deficit. The water deficit resulted in negative effects on the photochemical apparatus of

plants, as well as reductions in stomatal conductance. Furthermore, these changes in the physiological responses of crambe plants reflected reduced grain yield and inhibition in germination the progeny. The FMS CR 1307 genotype presented better photochemical adjustment during the period of water deficit and recovery, confirming photochemical tolerance under water deficit. In view of these results, it is possible to conclude in general that the physiological and anatomical changes contributed positively for the FMS CR 1307 genotype to present greater tolerance to water deficiency in the treatments tested.

**Keywords:** chlorophyll *a* fluorescence• *Crambe abyssinica*• drought tolerance• flowering• germination• photosystem II• water deficit memory

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo do crambe ( <i>Crambe abyssinica</i> ), cultivar FMS Brilhante, na região de Maracaju, MS. ....	22
Figura 2: Imagens de plantas de crambe: plantas em desenvolvimento (A), florescimento (B) e frutos (C). ....	23
<b>CAPÍTULO 1 - GERMINATION AND SEEDLING GROWTH OF FIVE CRAMBE (<i>Crambe abyssinica</i> HOCHST.) GENOTYPES SUBMITTED TO WATER DEFICIT INDUCED BY POLYETHYLENE GLYCOL</b> .....	39
Figure 1: Gemination (A), normal seedlings (B) and germination speed index – GSI (C) of <i>Crambe abyssinica</i> seeds, genotypes FMS Brilhante, FMS CR 1203, 1307, 1312 and 1326, under different osmotic potentials .....	54
Figure 2: Seedlings of different genotypes of crambe (FMS Brilhante, FMS CR 1203, 1307, 1312 and 1326) under different osmotic potentials (0, -0.2, -0.4, -0.5 and -0.6 MPa).....	55
Figure 3: Root length (A) and hypocotyl length (B) of <i>Crambe abyssinica</i> Hochst. seedlings, genotypes FMS Brilhante, FMS CR 1203, 1307, 1312 and 1326, under different osmotic potentials.....	56
Figure 4: Total fresh matter (A) and water content of seedlings (B) of <i>Crambe abyssinica</i> Hochst. seedlings, genotypes FMS Brilhante, FMS CR 1203, 1307, 1312 and 1326, under different osmotic potentials. ....	57
Figure 5: Principal component analysis generation plot considering all osmotic potentials treatments and the genotypes of <i>Crambe abyssinica</i> , FMS Brilhante, FMS CR 1203, 1307, 1312 and 1326 .....	59
<b>CAPÍTULO 2 -DIFFERENTIAL RESPONSE OF PHOTOSYSTEM II AND I PHOTOCHEMISTRY IN LEAVES OF TWO <i>Crambe abyssinica</i> HOCHST. GENOTYPES SUBMITTED TO WATER DEFICIT</b> .....	60
Figure 1: Leaf relative water content (RWC) of two <i>C. abyssinica</i> genotypes submitted to water deficit .....	80
Figure 2: Stomatal flow rate $g_s$ (A) and chlorophyll <i>a</i> and <i>b</i> (B) index of two genotypes of <i>C. abyssinica</i> submitted to water deficit .....	81
Figure 3: Kinetic difference of $V_{OP}$ (A), $V_{OK}$ (B), $V_{OJ}$ (C) and $V_{OI}$ (D) obtained through the double normalization of the O-P phase ( $\Delta V_{OP}=V_{OP(treatment)}-V_{OP(control)}$ ), O-K ( $\Delta V_{OK}=V_{OK(treatment)}-V_{OK(control)}$ ) and O-I ( $\Delta V_{OI}=V_{OI(treatment)}-V_{OI(control)}$ ) respectively, in two genotypes of crambe FMS CR 1307 and FMS CR 1326 submitted to water deficit .....	82

Figure 4: Transient chlorophyll fluorescence in the O-I phase ( $V_{OI} = F_t - F_0 / (F_t - F_0)$ ) (A), I-P ( $V_{IP} = F_t - F_i / (F_m - F_i)$ ) (B) and kinetic difference VIP ( $\Delta V_{IP} = V_{IP(\text{treatment})} - V_{IP(\text{control})}$ ) (C), respectively, in two genotypes of Crambe FMS CR 1307 and FMS CR 1326 submitted to the water deficit. ....	83
Figure 5: Leaf model showing specific flows by reaction center (RC) of leaves of two genotypes of <i>C. abyssinica</i> FMS CR 1307 and 1326 control (A and B) and water deficit (C and D) .....	84
Figure 6: Maximum quantum yield of primary photochemistry of PSII ( $\phi_{P0}$ ) (A) and photosynthetic performance index ( $PI_{\text{total}}$ ) (B) of two <i>C. abyssinica</i> genotypes submitted to water deficit. ....	85
<b>CAPÍTULO 3 - PHYSIOLOGICAL AND ANATOMICAL RESPONSES OF <i>Crambe abyssinica</i> TO REPEATED EXPOSURE TO WATER DEFICIT</b> .....	86
Figure 1: Leaf relative water content (RWC) (a), Stomatal flow rate $g_s$ (b) and electrolyteleakage (EE) (c) of three <i>C. abyssinica</i> genotypes submitted to repeated water deficit. ....	104
Figure 2: Fluorescence intensity (a), $V_{OJ}$ (b), and $V_{OK}$ (c) obtained through the double normalization of the O-J ( $\Delta V_{OJ} = V_{OJ(\text{treatment})} - V_{OJ(\text{control})}$ ) and O-K ( $\Delta V_{OK} = V_{OK(\text{treatment})} - V_{OK(\text{control})}$ ) respectively, of three <i>C. abyssinica</i> genotypes submitted to repeated water deficit. ....	105
Figure 3: Cross sections of <i>C. abyssinica</i> genotypes submitted to repeated exposures of water deficit ...	109
Figure 4: Palisade parenchyma (a) and number of xylem vessels (b) of three <i>C. abyssinica</i> genotypes submitted to repeated water deficit. ....	110
<b>CAPÍTULO 4 - EFEITOS DO DÉFICIT HÍDRICO INTENSO APLICADO NO INÍCIO DO FLORESCIMENTO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS ECOFISIOLÓGICAS E DE PRODUÇÃO DE GRÃOS DE DOIS GENÓTIPOS DE CRAMBE E AVALIAÇÃO DA DORMÊNCIA NA PROGÊNIE</b> .....	111
Figura 1: Temperatura do ar (colunas – escala da ordenada principal à esquerda) e déficit de pressão de vapor (DPV) (linha – escala ordenada secundária à direita) durante a exposição do déficit hídrico e posterior recuperação no período do início da floração de dois genótipos de crambe, FMS CR 1326 (A) e FMS CR 1307 (B).. ....	121
Figura 2: Condutância estomática $g_s$ (colunas – escala da ordenada principal à esquerda) em relação à umidade do solo (linha – escala ordenada secundária à direita) de dois genótipos de	

<i>C. abyssinica</i> , FMS CR 1326 (A) e FMS CR 1307 (B) submetidos ao déficit hídrico e posterior recuperação, CI – plantas continuamente irrigadas e DH – déficit hídrico.....	122
Figura 3: Índice de clorofila de dois genótipos de <i>C. abyssinica</i> , FMS CR 1326 (A) e FMS CR 1307 (B) submetidos ao déficit hídrico e posterior recuperação, CI – plantas continuamente irrigadas e DH – déficit hídrico .....	123
Figura 4: Fluorescência transiente da clorofila <i>a</i> de dois genótipos de <i>C. abyssinica</i> , FMS CR 1326 (A) e FMS CR 1307 (B) submetidos ao déficit hídrico e posterior recuperação. A fluorescência variável relativa entre $F_0$ e $F_M$ mostrando a fluorescência relativa variável no ponto J ( $V_J$ ) e o ponto I ( $V_I$ ) em função dos tratamentos de déficit hídrico (inversão), DH – déficit hídrico e RH – recuperação hídrica. ....	125
Figura 5: Diferença cinética de $V_{OJ}$ (A, B e E) e $V_{OK}$ (C, D e F) obtidos através da dupla normalização da fase O-J ( $\Delta V_{OJ} = V_{OJ}(\text{tratamento}) - V_{OJ}(\text{controle})$ ) e O-K ( $\Delta V_{OK} = V_{OK}(\text{tratamento}) - V_{OK}(\text{controle})$ ) respectivamente, em dois genótipos de crame FMS CR 1326 e FMS CR 1307 submetidas a déficit hídrico e posterior recuperação, DH – déficit hídrico e RH – recuperação hídrica.....	127
Figura 6: Gráfico de radar dos parâmetros da fluorescência transiente da clorofila <i>a</i> deduzidos a partir da análise do teste JIP de plantas de dois genótipos de crame FMS CR 1326 (A) e FMS CR 1307 (B) submetidas a déficit hídrico e posterior recuperação, DH – déficit hídrico e RH – recuperação hídrica... ..	128
Figura 7: Número de vaso xilemático foliar de dois genótipos de <i>C. abyssinica</i> , FMS CR 1326 e FMS CR 1307 submetidos ao déficit hídrico e posterior recuperação CI – plantas continuamente irrigadas e DH – déficit hídrico... ..	130
Figura 8: Índice de velocidade de germinação – IVG e Germinação (%) (inversão), de progênie de dois genótipos de <i>C. abyssinica</i> , FMS CR 1326 e FMS CR 1307 submetidos ao déficit hídrico e posterior recuperação, S1CI – plantas continuamente irrigadas e S1DH – déficit hídrico.....	132

## LISTA DE TABELAS

<b>CAPÍTULO 1 - GERMINATION AND SEEDLING GROWTH OF FIVE CRAMBE (<i>Crambe abyssinica</i> HOCHST.) GENOTYPES SUBMITTED TO WATER DEFICIT INDUCED BY POLYETHYLENE GLYCOL .....</b>	<b>39</b>
Table 1: Degree of seed moisture of different genotypes <i>Crambe abyssinica</i> Hochst.....	53
Table 2: Total dry matter of different genotypes <i>Crambe abyssinica</i> Hochst. under different osmotic potentials .....	58
<b>CAPÍTULO 3 - PHYSIOLOGICAL AND ANATOMICAL RESPONSES OF <i>Crambe abyssinica</i> TO REPEATED EXPOSURE TO WATER DEFICIT .....</b>	<b>86</b>
Table 1: JIP test parameters of dark-adapted leaves of three <i>C. abyssinica</i> genotypes submitted to repeated water deficit.....	106
Table 2: Growth of <i>C. abyssinica</i> genotypes submitted to repeated water deficit .....	107
Table 3: Anatomical structure of <i>C. abyssinica</i> genotypes submitted to repeated water deficit.....	108
<b>CAPÍTULO 4 - EFEITOS DO DÉFICIT HÍDRICO INTENSO APLICADO NO INÍCIO DO FLORESCIMENTO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS ECOFISIOLÓGICAS E DE PRODUÇÃO DE GRÃOS DE DOIS GENÓTIPOS DE CRAMBE E AVALIAÇÃO DA DORMÊNCIA NA PROGÊNIE.....</b>	<b>111</b>
Tabela 1: Crescimento das plantas e produção de grãos de dois genótipos de <i>C. abyssinica</i> , FMS CR 1326 e FMS CR 1307 submetidos ao déficit hídrico e posterior recuperação, CI – plantas continuamente irrigadas e DH – déficit hídrico .....	131

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL .....	19
2. OBJETIVO GERAL.....	21
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	22
4.1 A cultura do crambe .....	22
4.2 Efeito do déficit hídrico nas plantas .....	25
4.3 Memória ao déficit hídrico .....	27
CAPÍTULO 1 - GERMINATION AND SEEDLING GROWTH OF FIVE CRAMBE ( <i>Crambe abyssinica</i> HOCHST.) GENOTYPES SUBMITTED TO WATER DEFICIT INDUCED BY POLYETHYLENE GLYCOL .....	39
ABSTRACT.....	40
INTRODUCTION .....	40
MATERIALS AND METHODS.....	42
RESULTS AND DISCUSSION .....	44
CONCLUSIONS .....	48
REREFENCES .....	49
CAPÍTULO 2 - DIFFERENTIAL RESPONSE OF PHOTOSYSTEM II AND I PHOTOCHEMISTRY IN LEAVES OF TWO <i>Crambe abyssinica</i> HOCHST. GENOTYPES SUBMITTED TO WATER DEFICIT .....	60
ABSTRACT.....	61
RESUMO.....	61
INTRODUCTION .....	62
MATERIALS AND METHODS.....	64
<i>Plant grown conditions and treatments</i> .....	64
<i>Leaf relative water content (RWC), stomatal conductance (g<sub>s</sub>) and Chl index</i> .....	65
<i>Chl a fluorescence: OJIP transientes and JIP-test</i> .....	65
<i>Statistical analysis</i> .....	66
RESULTS .....	66
<i>RWC, g<sub>s</sub> and Chl index</i> .....	66
<i>OJIP Chl a fluorescence and normalizations</i> .....	67
<i>JIP-test</i> .....	68
DISCUSSION .....	69



CONCLUSIONS .....	74
REREFENCES .....	75
CAPÍTULO 3 - PHYSIOLOGICAL AND ANATOMICAL RESPONSES OF <i>Crambe abyssinica</i> TO REPEATED EXPOSURE TO WATER DEFICIT .....	86
ABSTRACT.....	87
INTRODUCTION .....	87
MATERIALS AND METHODS.....	89
<i>Plant grown and experimental design</i> .....	89
<i>Leaf relative water content (RWC), stomatal conductance (<math>g_s</math>) and extravasation of electrolytes</i> .....	90
<i>Chlorophyll a fluorescence analysis</i> .....	91
<i>Analysis of growths</i> .....	91
<i>Leaf anatomy analysis</i> .....	91
<i>Statistical analysis</i> .....	91
RESULTS .....	92
<i>Leaf relative water content (RWC), stomatal conductance (<math>g_s</math>) and extravasation of electrolytes (EE)</i> .....	92
<i>Chlorophyll a fluorescence transient</i> .....	92
<i>Analysis of growth</i> .....	93
<i>Leaf anatomy</i> .....	94
DISCUSSION.....	94
CONCLUSIONS .....	98
REREFENCES .....	99
CAPÍTULO 4 - EFEITOS DO DÉFICIT HÍDRICO INTENSO APLICADO NO INÍCIO DO FLORESCIMENTO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS ECOFISIOLÓGICAS E DE PRODUÇÃO DE GRÃOS DE DOIS GENÓTIPOS DE CRAMBE E AVALIAÇÃO DA DORMÊNCIA NA PROGÊNIE .....	111
RESUMO.....	112
ABSTRACT.....	113
INTRODUÇÃO .....	115
MATERIAL E MÉTODOS .....	117
2.1 <i>Material vegetal e design experimental</i> .....	117
2.2 <i>Umidade do solo e déficit pressão de vapor (DPV)</i> .....	118
2.3 <i>Condutância estomática, índice de clorofila e fluorescência da clorofila a</i> .....	118

2.4 Anatomia foliar.....	118
2.5 Crescimento da planta e produção de grãos.....	119
2.6 Germinação da progênie.....	119
2.7 Análise estatística.....	120
3. RESULTADOS.....	121
3.1 Condições de temperatura e déficit de pressão de vapor (VPD) na casa de vegetação.....	121
3.2 Condutância estomática ( $g_s$ ) e umidade do solo.....	121
3.3 Índice de clorofila e fluorescência transiente da clorofila a – OJIP e teste JIP .	123
3.4 Anatomia foliar.....	130
3.5 Crescimento da planta e produção de grãos.....	131
3.6 Germinação da progênie.....	132
4. DISCUSSÃO.....	134
5. CONCLUSÕES.....	141
6. REFERÊNCIAS.....	142
CONCLUSÕES GERAIS.....	149
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	150

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O déficit hídrico é um dos fatores ambientais mais importantes e complexos que limitam a germinação de sementes (VIÇOSI et al., 2017), o crescimento e o desenvolvimento de plântulas/plantas (MACHADO et al., 2017; LANG et al., 2018). O estresse por seca ocorre quando a água disponível no solo é reduzida e a transpiração foliar continua mesmo quando não há água adicional pela chuva ou pela irrigação (MATHOBO et al., 2017). O estresse hídrico na germinação reduz a pressão de turgescência das células, afetando negativamente a expansão e o crescimento das células (BEWLEY e BLACK, 1994). A disponibilidade de oxigênio, trocas gasosas e síntese de enzimas e hormônios, translocação e assimilação de reservas no endosperma e embrião também são reduzidas (MARCOS-FILHO, 2005), o que resulta em redução no índice de velocidade de germinação (KADER e JUTZI, 2002).

Em plantas, o déficit hídrico é caracterizado pelo o fechamento dos estômatos, a fim de evitar a desidratação por perda de água pela transpiração (MARCOS et al., 2018). No entanto, o fechamento dos estômatos reduz a fixação do CO<sub>2</sub>, que, por sua vez, desequilibra as reações fotoquímicas e bioquímicas da fotossíntese (FLEXAS et al., 2012), podendo causar danos aos centros de reação do fotossistema II (FSII) e, conseqüentemente, reduzir sua eficiência (MEHTA et al., 2010), além de causar perda de turgescência, diminuição do crescimento celular, que, conseqüentemente, reduz o crescimento da planta (JALEEL et al., 2009). Ainda, reduções no número de vasos xilemáticos devido a uma maior predisposição à embolia (GUHA, et al., 2018) e aumento da espessura do parênquima paliçádico a fim de proteger as folhas contra a perda de água, podem ser observados em decorrência ao déficit hídrico (BACELAR et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2018).

No estágio fenológico do florescimento, o déficit hídrico também resulta em conseqüências negativas (ZHANG et al., 2017). Segundo Mathobo et al. (2017), uma das principais causas na perda de produção é o estresse hídrico, causado pela senescência das flores, impedindo o desenvolvimento de flores (aborto) e, conseqüentemente, a redução do número de grãos. Além disso, o déficit hídrico pode causar impactos negativos às sementes da progênie, como danos no desenvolvimento do embrião, reduzindo a germinabilidade das sementes da progênie (SHI et. al., 2018; FAROOQ et al., 2017).

Na natureza, as plantas são expostas a episódios recorrentes de seca, com gravidade e duração distinta (MENEZES-SILVA et al., 2017). Estudos sobre pré-exposição ou ciclos repetidos em vários estresses abióticos (déficit hídrico, salinidade, alta temperatura) mostraram melhorar a tolerância das plantas a exposições futuras, o que é conhecido como

"memória ao estresse" (ZHANG et al., 2018, MARCOS et al., 2018; HU et al., 2016, HU et al., 2015a). Segundo Ding et al. (2013), a ativação de uma memória em resposta a um ambiente desfavorável pode facilitar a resposta da planta a futuras exposições a esse ambiente. Contudo, essa adequação às condições ambientais de estresse, como déficit hídrico, pode variar em função do genótipo. Dessa forma, considerando que os recursos hídricos podem ser limitados e as altas taxas de consumo de água pela agricultura podem ser mitigados através da seleção de genótipos tolerantes ao déficit hídrico (PORCH et al., 2009), identificar espécies/genótipos com capacidade de adaptação a ambientes com restrição hídrica é uma valiosa estratégia para se obter incremento na produtividade (ARAÚJO et al., 2013; VASCONCELOS et al., 2018).

O *Crambe abyssinica* Hochst. (crambe) é uma oleaginosa pertencente à família Brassicaceae com características promissoras para uso industrial devido ao seu elevado teor de óleo (30–35%) e conteúdo de ácido erúico (63-64%) (LALAS et al., 2012; WANG et al., 2000), além de possui um enorme potencial de produção de matéria-prima de biodiesel (OLIVEIRA et al., 2015). Ainda, possui muitas vantagens agronômicas, como baixas necessidades nutricionais, uma alta plasticidade morfológica que reduz a improdutividade dos ramos (BASSEGIO et al., 2016; ZANETTI et al., 2016), permitindo a rotação de culturas. Atualmente, apenas o genótipo FMS Brilhante está registrado no Brasil. No entanto, segundo Pitol et al. (2012), novos genótipos têm sido testados a fim de expandir a cultura e melhorar a produtividade da cultura no país.

No Brasil, a região Centro-Oeste é a principal região produtora de crambe, onde a produtividade varia de 1.000 a 1.500 kg ha<sup>-1</sup> (Fundação MS 2014) (BATISTA et al., 2018). No entanto, o Espírito Santo tem sido uma das áreas selecionadas para a expansão da cultura. Esse estado possui características climáticas como altas temperaturas e redução de chuvas em determinado período do ano (PEIXOTO et al., 2008), similar a várias outras regiões no país. Considerando o contexto acima, a hipótese desse estudo é que o déficit hídrico causa impactos negativos nos parâmetros fisiológicos e anatômicos do crambe, resultando em redução no crescimento e produção de grãos. No entanto, os genótipos estudados exibirão diferenças na tolerância ao déficit hídrico, sendo possível a expansão da cultura em ambientes com recorrência ao déficit hídrico. Este estudo teve por objetivo investigar as características fisiológicas e anatômicas de genótipos de crambe, visando traçar relações entre a eficiência de absorção da energia de excitação, as mudanças anatômicas e crescimento/produção, bem como, selecionar genótipos com tolerância à deficiência hídrica.

## **2. OBJETIVO GERAL**

Avaliar as características fisiológicas e anatômicas de genótipos de crambe, visando traçar relações entre a eficiência de absorção da energia de excitação, as mudanças anatômicas e crescimento/produção, bem como selecionar genótipos com tolerância à deficiência hídrica.

## **3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Avaliar a tolerância de cinco genótipos de crambe ao estresse hídrico durante a germinação e crescimento inicial de plântulas;
- ✓ Avaliar os efeitos do déficit hídrico na fotoquímica de FSII e FSI em folhas de dois genótipos de crambe (FMS CR 1307 e 1326) identificando o local de ação do estresse no aparato fotossintético;
- ✓ Compreender como desempenho do crambe sob condições de seca é afetado pela exposição prévia a déficits hídricos;
- ✓ Analisar os efeitos do déficit hídrico intenso aplicado no início do estágio do florescimento sobre as características fisiológicas, anatômicas e de produção de grãos de dois genótipos de crambe (FMS CR 1307 e FMS CR 1326);
- ✓ Investigar possível dormência causada pelo tratamento de déficit hídrico na progênie.

## 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 A cultura do Crambe

O *Crambe abyssinica* Hochst. é uma planta oleaginosa pertencente à família Brassicaceae (FALASCA et al., 2010), endêmica do leste da África, na região da Etiópia (WARWICK e GUGEL, 2003). É uma planta herbácea anual, possui ciclo de vida curto, aproximadamente 90 – 100 dias, sendo 40° – 50° dias para florescimento e 80° – 90° dias para maturação das sementes (GOLZ, 1993) (Fig. 1). As plantas de crambe possuem em média 1 m de altura, folhas ovais e assimétricas e flores brancas com boa produção de sementes (OPLINGER et al., 1991, PITOL, 2008). Os frutos de crambe são denominados de síliquas e contém apenas uma semente (PITOL et al., 2010) (Fig. 2).

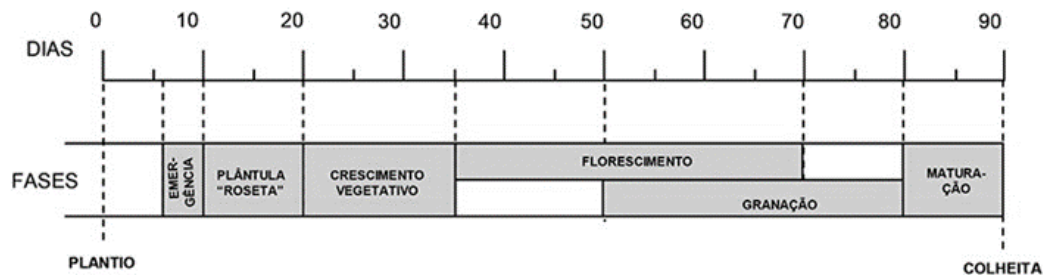


Figura 1 - Ciclo do crambe (*Crambe abyssinica*), cultivar FMS Brillhante, na região de Maracaju, MS. (Fonte: PITOL et al., 2010).

O crambe possui muitas vantagens agrônômicas que incluem baixas necessidades nutricionais, uma alta plasticidade morfológica que reduz a improdutividade dos ramos (BASSEGIO et al., 2016; ZANETTI et al., 2016). A expansão da cultura do crambe tem sido realizada visando à extração de óleo das sementes por possuir características promissoras para uso industrial devido ao seu elevado teor de óleo (30–35%) e conteúdo de ácido erúico (63–64%) (LALAS et al., 2012; WANG et al., 2000). O ácido erúico é notável como ácido graxo de cadeia longa, importante para fins industriais, como para a produção de lubrificante (BONDIOLI et al., 1998) e como componente de borracha sintética, plásticos, nylon e cosméticos (FALASCA et al., 2000). Além disso, o óleo de crambe tem conversão energética semelhante e maior estabilidade oxidativa do que o óleo de oliva (LALAS et al., 2012) e óleo de soja (WAZILEWSKI et al., 2013), apresentando, portanto, enorme potencial na produção de matéria-prima de biodiesel. Do ponto de vista ambiental o fluído isolante derivado do crambe possui pouca toxicidade, não bioacumulativo e é facilmente degradável, reduzindo os riscos de contaminação do solo e água em caso de acidentes com transformadores

(OLIVEIRA et al., 2015). Possui ainda potencial fitorremediador, eficiente na descontaminação de arsênio, cádmio, cobre, cromo, zinco, chumbo e mercúrio (ARTUS, 2006; HU et al., 2015b), além de seu subproduto, a torta, obtida da prensagem dos grãos, poder ser utilizada na alimentação de animais ruminantes (OLIVEIRA et al., 2015).

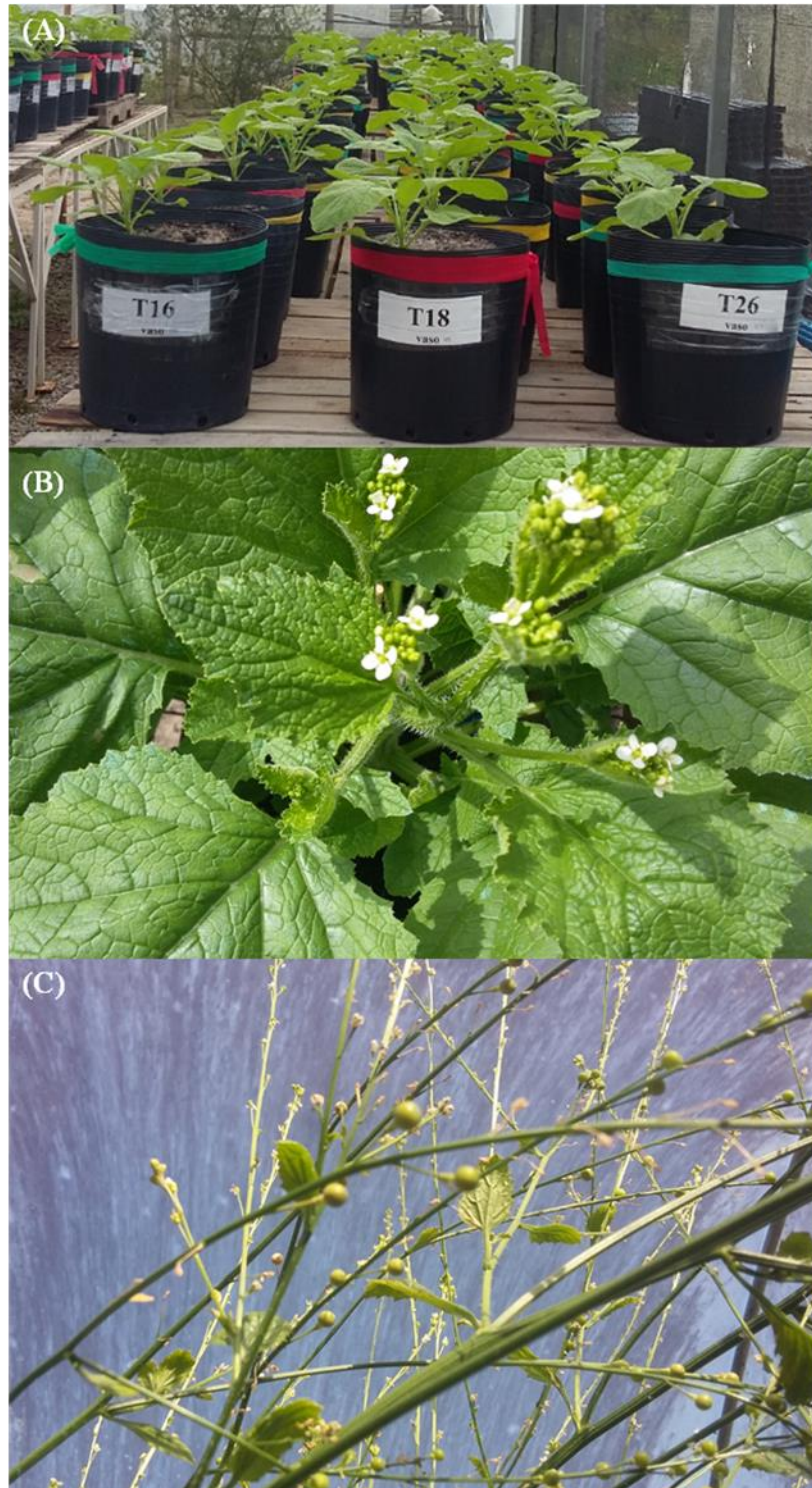


Figura 2 – Imagens de plantas de crambe: plantas em desenvolvimento (A), florescimento (B) e frutos (C) (Fotos: Priscila da Conceição de Souza Braga, 2018)

O cultivo do crambe iniciou experimentalmente na antiga União Soviética e nos Estados Unidos entre 1930 e 1940. (OLIVEIRA et al., 2013). As primeiras variedades lançadas foram: Prophet, Indy e Meyer nos Estados Unidos na década de 70 e 80, sendo que na década 90, programas de melhoramento da Holanda lançaram as variedades Galactica, Nebula, Charlotte e Carmen, seguida pela Itália, lançando a variedade Mario (PITOL et al., 2010). No Brasil, as pesquisas iniciaram-se em 1995, com objetivo de avaliar seu desempenho como planta de cobertura no sistema do plantio direto (OLIVEIRA et al., 2013). O cultivo de crambe tem sido inovador no setor de agronegócio brasileiro com potencial supridor de óleo vegetal isolante (OLIVEIRA et al., 2015), por não competir com oleaginosas utilizadas na alimentação humana, devido a presença do ácido erúico ser inviável para o consumo humano (COLODETTI et al., 2012). Pesquisadores da Fundação Mato Grosso do Sul desenvolveram, com materiais vindos do México, o primeiro genótipo registrado no Brasil, genótipo FMS Brilhante (PITOL et al., 2010). No ano de 2014, iniciaram-se testes com novos genótipos de crambe, sendo alguns genótipos considerados como materiais de pré-lançamento por apresentarem alta produtividade (FMS 1312, FMS CR 1305 e FMS CR 1307) (OLIVEIRA et al., 2015).

No Brasil, a região Centro-Oeste é a principal região produtora de crambe, onde a produtividade varia de 1.000 a 1.500 kg ha<sup>-1</sup> (Fundação MS 2014). No entanto, estudos sobre o comportamento ecofisiológico em outras regiões do país são escassos. Atualmente, para implantação do crambe em outras regiões brasileiras, é necessário preencher lacunas sobre o comportamento do crambe (genótipos de crambe) sob diversos estresses ambientais, como por exemplo, a exposição ao déficit hídrico em determinados estádios do ciclo da cultura.

Várias regiões do Brasil possuem característica de reduções de chuvas em determinados período do ano. O Espírito Santo (Brasil) que tem sido uma das áreas selecionadas para a expansão da cultura, possui características climáticas como altas temperaturas e redução de chuvas em determinado período do ano (PEIXOTO et al., 2008). Dessa forma, considerando o interesse do estabelecimento e possível aumento na potencialidade dessa cultura em regiões com restrição hídrica, tornam-se necessários estudos que possam preencher essa lacuna e trazer uma estratégia de irrigação apropriada para melhorar a produtividade e expansão da cultura.



#### 4.2 Efeito do déficit hídrico nas plantas

O déficit hídrico é um dos fatores mais importantes e complexos que restringem o desenvolvimento das plantas e a produtividade das culturas (LANG et al., 2018), principalmente em regiões onde a precipitação varia ano após ano (YODANOV et al., 2000; SOUZA et al., 2004; GONZÁLES et al., 2009). Nas sementes, o déficit hídrico reduz a pressão de turgescência, afetando negativamente a expansão e o crescimento das células (BEWLEY e BLACK, 1994). A disponibilidade de oxigênio, trocas gasosas e síntese de enzimas e hormônios para digestão, translocação e assimilação de reservas também é afetada (MARCOS-FILHO, 2005), na qual, resulta em redução no índice de velocidade de germinação (IVG) (KADER e JUTZI, 2002). O déficit hídrico provoca um aumento no peso seco dos embriões, devido à necessidade de ajuste osmótico, associado ao acúmulo de solutos compatíveis (GILL et al., 2003). Segundo Patanè et al. (2013), o déficit hídrico leva a um tecido radicular mais concentrado de solutos e menor teor de água nas raízes. Além disso, em genótipos mais sensíveis a sinalização metabólica que regula a expressão gênica durante o déficit hídrico pode ser reduzida (COELHO et al., 2010), prejudicando o crescimento do hipocótilo e da radícula (VIÇOSI et al., 2017).

Em plantas, aos primeiros sinais de mudança na disponibilidade hídrica, ocorre o fechamento estomático para evitar a perda de água pela transpiração foliar (CHAVES, 1991). O fechamento estomático está associado à sinalização entre raiz e parte aérea das plantas sob déficit hídrico (DAVIES e ZHANG, 1991). O xilema transporta sinais químicos, como a diminuição da concentração de cátions e ânions, variação do pH e dos teores de aminoácidos e de ácido abscísico (ABA). O ABA induz uma cascata de transdução de sinal envolvendo o aumento da concentração de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) citoplasmático, o qual pode promover a saída de  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  das células guardas e assim causar fechamento estomático (WILKINSON e DAVIES, 2002). No entanto, o fechamento dos estômatos reduz a difusão do  $\text{CO}_2$  até os sítios de carboxilação da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) e conseqüentemente reduz a assimilação de carbono (CHAVES e OLIVEIRA, 2004). Além disso, desequilibra as reações fotoquímicas da fotossíntese (FLEXAS et al., 2012), podendo causar danos aos centros de reação do fotossistema II (FSII) e, conseqüentemente, reduzir sua eficiência (MEHTA et al., 2010).

Medições da fluorescência da clorofila *a* permite conhecimento à cerca dos processos fotoquímicos e dos fenômenos não-fotoquímicos que ocorrem nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos (KRAUSE & WEIS, 1991). Sob supressão hídrica, a análise da fluorescência

da clorofila *a* tem mostrado valores positivos para a banda L e K (GOMES et al., 2012; ZHANG et al., 2015; MARTINS et al., 2017; FALQUETO et al., 2017) em duas cultivares de *Passiflora edulis* L., FB200 e FB300 (GOMES et al., 2012), duas cultivares de *Zea mays* L., SD609 e ZD958 (ZHANG et al., 2015), dois genótipos de *Crambe abyssinica* Hochst, FMS Brilhante e FMS CR 1101 (MARTINS et al., 2017) e dois clones de *Hevea brasiliensis* L., RRIM600 e FX3864 (FALQUETO et al., 2017), revelando diminuição da conectividade energética entre as unidades do FSII e diminuição da função do complexo de evolução do oxigênio (CEO). Diversos autores correlacionaram a diminuição da capacidade fotoquímica do FSII à atividade fotossintética, com o avanço do déficit hídrico (LIBERATO et al., 2006; OUKARROUM et al., 2007, OUKARROUM et al., 2009; GONÇALVES et al., 2009).

Plantas submetidas à seca também apresentam alterações morfológicas que regulam o balanço hídrico, tais como diminuição da área foliar e da razão parte aérea/raiz levando à diminuição da transpiração e aumentando a absorção de água pelas raízes (PIMENTEL, 2004). Em condição de baixa disponibilidade hídrica, a redução de crescimento da parte aérea está muitas vezes associada ao aumento do crescimento radicular como estratégia para melhorar a absorção de água. As plantas investem nesse processo alterando o padrão de alocação de carbono para permitir a formação de um sistema radicular mais profundo (MARCOS et al., 2018). No entanto, a taxa de expansão foliar pode ser rapidamente recuperada com a reidratação, podendo inclusive superar em crescimento as plantas que não passaram por estresse (INMAN-BAMBER e SMITH, 2005).

O déficit hídrico ainda aumenta a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) devido à redução da assimilação de CO<sub>2</sub>. Dessa forma, a energia que deveria ser utilizada nas reações bioquímicas de fixação de carbono é direcionada para o oxigênio (RATNAYAKA et al., 2003). Entretanto, para minimizar esses efeitos oxidativos de EROS, as plantas desenvolveram um complexo sistema antioxidante composto por substâncias antioxidantes como as superóxido dismutase (SOD), glutatona redutase (GR), a catalase (CAT) e peroxidases (POX) (NOCTOR e FOYER, 1998).

Segundo Mathobo et al. (2017), o déficit hídrico no estágio fenológico do florescimento também causa efeitos negativos. A principal causa da perda de produção sob déficit hídrico é o declínio da fotossíntese, levando à senescência de flores, impedindo o desenvolvimento de flores (aborto) e, conseqüentemente, a redução do número de grãos (MATHOBO et al., 2017). Além disso, o déficit hídrico no florescimento ainda pode causar impactos negativos às sementes da progênie, uma vez que o déficit hídrico pode causar danos no desenvolvimento do embrião reduzindo a germinabilidade das sementes da progênie (SHI

et. al., 2018; FAROOQ et al., 2017). O impacto do estresse hídrico é determinado pela gravidade do estresse e pela capacidade de adaptação das plantas (ROSALES et al., 2012).

Em resposta a redução na disponibilidade de água, as plantas apresentam estratégias para superar o período estressante. As respostas das plantas ao estresse hídrico envolvem, normalmente, estratégias para se evitar e/ou tolerar a escassez hídrica, que variam de acordo com a espécie ou genótipo da planta (CHAVES, 2002). Plantas tolerantes desenvolveram estratégias para manter o crescimento e desenvolvimento sob baixa disponibilidade hídrica. (HUMMEL et al., 2010). A tolerância à seca é definida como a capacidade de viver, crescer e produzir satisfatoriamente sob disponibilidade limitada de água ou deficiência periódica da água da chuva (XIONG et al., 2006). No entanto, mesmo em plantas tolerantes à seca, o déficit hídrico pode afetar negativamente o crescimento e outros processos fisiológicos (WANG et al., 2016, COVRE et al., 2016).

#### *4.3 Memória ao déficit hídrico*

As plantas na natureza estão expostas a ciclos repetidos de déficit hídrico e reidratação, e a resposta desses repetidos eventos de déficit hídrico ainda está sendo compreendida (WALTER et al., 2011; FLETA-SORIANO e MUNNÉ-BOSCH 2016; MENEZES-SILVA et al., 2017). Segundo Mickelbart et al. (2015), as plantas geralmente exibem tolerância ao estresse ou evitam o estresse por meio de mecanismos de aclimação e adaptação que evoluíram através da seleção natural. Assim, após o reconhecimento do estresse, as plantas regulam as respostas restabelecendo a homeostase celular, reduzindo os efeitos do estresse imediato. Essas mudanças no período de aclimação tendem a permitir que as plantas respondam com mais rapidez e eficiência aos estresses ambientais futuros (FLETA-SORIANO e MUNNÉ-BOSCH 2016; MARCOS et al., 2018), permitindo que vivam em uma grande diversidade de habitats (FLETA-SORIANO e MUNNÉ-BOSCH, 2016). As repetidas exposições ao estresse podem desencadear um tipo de aclimação diferencial, às vezes chamado de memória ao estresse, o que potencializaria a respostas de defesa, a fim de prepará-los para uma exposição a esse mesmo estresse (BRUCE et al., 2007; IWASAKI e PASZKOWSKI, 2014; FLETA-SORIANO e MUNNÉ-BOSCH, 2016).

O conceito de memória implica em reações à sinalização gerada por estresses ambientais, que provocam um armazenamento da informação, que pode ser recuperada em um novo evento estressante (THELLIER e LÜTTGE, 2012). Chinnusamy e Zhu (2009) relatam que quando as plantas são pré-expostas repetidamente ao estresse ambiental, algumas

mudanças envolvidas na fisiologia e nos padrões de expressão gênica são ‘lembradas’ e reconhecidas pelas plantas em subsequente estresse. As mudanças lembradas podem ser levadas adiante como uma forma de memória ao estresse. A memória do estresse pode aumentar a imunidade sistêmica ou induzir respostas a tratamentos subsequentes de estresse em plantas, que estavam envolvidos em algum sinal de alarme ativo e reações mais rápidas (GOH et al., 2003; CHINNUSAMY e ZHU 2009; LIU et al., 2014)

Plantas podem aclimatar a diferentes condições de água através de morfologia e alterações fisiológicas, que favorecem a manutenção do crescimento das plantas ou sobrevivência sob condições estressantes (CHAVES et al., 2002). Algumas mudanças durante um período de aclimação podem permitir respostas mais rápidas nas performances das plantas durante o próximo evento estressante. Quando plantas de batata (*Solanum tuberosum* L. cv. Cultivar Atlantic) foram pré-expostas ao déficit hídrico, apresentaram aumento no teor relativo de água da folha e aumento na espessura foliar, aumentando a capacidade de armazenamento de água, evitando a transpiração excessiva e garantindo o uso da água (ZHANG et al., 2018a). O aumento da biomassa das raízes de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. Variedade IACSP94-2094) submetido a três ciclos de déficit hídrico melhorou a absorção de água no solo (MARCOS et al., 2018). Plantas de *Cistus albidus* L. apresentaram conteúdo relativo de água nas folhas superior no segundo ciclo de seca, em função de um possível ajuste osmótico após serem expostas a um ciclo de estresse hídrico e recuperação. Além disso, a recuperação da fotossíntese e a eficiência do uso da água foram melhoradas pela exposição prévia à seca. Essas respostas foram atribuídas à menor condutância estomática e manutenção da condutância do mesófilo no segundo ciclo de déficit hídrico (GALLE et al., 2011), sugerindo que plantas submetidas à seca teriam uma marca do estresse que garantiria melhor performance em eventos recorrentes. A memória ao déficit hídrico parece depender de uma reprogramação orquestrada do metabolismo vegetal, envolvendo processos-chave, como fotossíntese, respiração, fotorrespiração e o sistema antioxidante (MENEZES-SILVA et al., 2017).

Atualmente a maioria dos estudos que relatam a memória de estresse usa análises de transcriptoma, epigenoma, proteoma e metaboloma (HU et al., 2015a, HU et al., 2016, FLETA-SORIANO e MUNNÉ-BOSCH, 2016, MENEZES-SILVA et al., 2017). Muitos genes estão ligados à resposta a estresses abióticos, alguns deles dependentes da ação do ABA, ou de outros hormônios, ou ainda de outras moléculas como cálcio, ácido jasmônico e ácido salicílico (CONRATH et al., 2006). O acúmulo de fatores de transcrição em plantas pode ser responsável pelo aumento da transcrição gênica levando à memória ao estresse

(BRUCE et al., 2007). De acordo com Bruce et al. (2007) e Ding et al. (2013) um conjunto de genes responde ao estresse de desidratação múltipla e esses genes foram nomeados genes de memória de estresse de desidratação (em inglês DMGs) porque exibem uma “memória” de estresses anteriores de desidratação. A expressão de DMGs pode ser fortemente e rapidamente induzido ou suprimido quando as plantas experimentam desidratação secundária (DING et al., 2013; ZHANG et al., 2018b).

O fotossistema II (FSII) é altamente sensível a estresses ambientais (MURATA et al., 2007). No entanto, não há informações suficientes sobre a existência de memória ao estresse no FSII. Plantas de *Festuca arundinacea* Schreb. sob tratamento de pré-aclimatação ao calor apresentaram melhora na recuperação do FSII por diminuir a inibição dos fluxos de energia de transporte dos centros de reação ativos (HU et al., 2015). Da mesma forma, estudos sobre memória ao déficit hídrico no FSII também são insuficientes. No capítulo três deste estudo, propusemos investigar a memória ao déficit hídrico utilizando análises morfofisiológicas simples, como a fluorescência da clorofila *a*, bem como, verificar memória ao déficit hídrico do FSII em plantas de crambe.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, L.F.; BERTINI, C.H.C.M.; BLEICHER, E.; NETO, F.C.V.; ALMEIDA, W.S. Características fenológicas, agronômicas e tecnológicas da fibra em diferentes cultivares de algodoeiro herbáceo. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, vol. 8, p. 448-453, 2013.
- ARTUS, N. N. Arsenic and cadmium phytoextraction potential of crambe compared with Indian mustard. **Journal of Plant Nutrition**, vol. 29, p. 667 – 679, 2006.
- BACELAR, E.; CORREIA, C.; MOUTINHO-PEREIRA, J.; GONCALVES, B.; LOPES, J.; TORRES-PEREIRA, J. Sclerophylly and leaf anatomical traits of five field-grown olive cultivars growing under drought conditions. **Tree Physiology**. vol. 24, p. 233–239, 2004.
- BASSEGIO, D.; ZANOTTO, M.D.; SANTOS, R.F.; WERNCKE, I.; DIAS, P.P.; OLIVO, M. Oilseed crop crambe as a source of renewable energy in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, vol. 66, p. 311-321, 2016.
- BATISTA, P.F; COSTA, A.C.; MÜLLER, C.; SILVA-FILHO, O.R.; SILVA, F.B.; MERCHANT, A.; MENDES, G.C.; NASCIMENTO, K.J.T. Nitric oxide mitigates the effect of water déficit in *Crambe abyssinica*. **Plant Physiology and Biochemistry**, vol. 129, p. 310 -322, 2018.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. Plenum Press. 1994.
- BRUCE, T.J.A.; MATTHES, M.C.; NAPIER, J.A.; PICKETT, J.A. Stressful “memories” of plants: Evidence and possible mechanisms. **Plant Science**, vol. 173, p. 603-608, 2007.
- CHAVES, M.M. Effects of water deficits on carbon assimilation. **Journal and Experimental Botany**, vol. 42, p. 1-16, 1991.
- CHAVES, M.M., PEREIRA, J.S., MAROCO, J., RODRIGUES, M.L., RICARDO, C.P.P., OSÓRIO, M.L., CARVALHO, I., FARIA, T., PINHEIRO, C. How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth. **Annals of Botany**, vol. 89, p. 907-916, 2002.
- CHAVES, M. M.; OLIVEIRA, M. M. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. **Journal and Experimental Botany**, vol. 55, p. 2365-2384, 2004.

- CHINNUSAMY, V.; ZHU, J.K. Epigenetic regulation of stress responses in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, vol. 12, p. 133-139, 2009.
- COELHO, D. L. M.; AGOSTINI, E. A. T.; GUABERTO, L. M.; MACHADO NETO, N. B.; CUSTÓDIO, C. C. Estresse hídrico com diferentes osmóticos em sementes de feijão e expressão diferencial de proteínas durante a germinação. **Acta Scientiarum Agronomy**, vol. 32, p. 491-499, 2010.
- COLODETTI, T. V. C. et al. Crambe: aspectos gerais da produção agrícola. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, p. 258-269, 2012.
- CONRATH, U.; BECKERS, G.J.M.; FLORS, V.; GARCÍA-AGUSTIN, P.; JAKAB, G.; MAUCH, F.; NEWMAN, M.A.; PIETERSE, C.M.J.; POINSSOT, B.; POZO, M.J.; PUGIN, A.; SCHAFFATH, U.; TON, J.; WENDEHENNE, D.; ZIMMERLI, L.; MAN, B. M. Priming: Getting ready for battle. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, vol. 19, p. 1062-1071, 2006.
- COVRE, A.M.; PARTELLI, F.L.; BONOMO, R.; BRAUN, H; RONCHI, C.P. Vegetative growth of conilon coffee plants under two water conditions in the Atlantic region of Bahia State, Brazil. **Acta Scientiarum Agronomy**, vol. 38, p. 535-545, 2016.
- DAVIES, W.J.; ZHANG, J. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, vol. 42, p. 55-76, 1991.
- DING, Y.; LIU, N.; VIRLOUVET, L.; RIETHOVEN, J.J.; FROMM, M.; AVRAMOVA, Z. Four distinct types of dehydration stress memory genes in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Plant Biology**, vol. 13, p. 229, 2013.
- FALASCA, S.L.; FLORES, N.; LAMAS, M.C.; CARBALLO, S.M.; ANSCHAU, A.. *Crambe abyssinica*: An almost unknown crop with a promissory future to produce biodiesel in Argentina. **International Journal of Hydrogen Energy**, vol. 35, p. 5808-5812, 2010.
- FALQUETO, A.R.; JÚNIOR, R.A.DA S., GOMES, M.T.G.; MARTINS, J.P.R.; SILVA, D.M; PARTELLI, F.L. Effects of drought stress on chlorophyll *a* fluorescence in two rubber tree clones. **Scientia Horticulturae**, vol. 224, p.238-243, 2017.
- FAROOQ, M.; GOGOI, N.; BARTHAKUR, S.; BAROOWA, B.; BHARADWAJ, N.; ALGHAMDI, S.S.; SIDDIQUE, K.H.M. Drought stress in grain legumes during reproduction and grain filling. **Journal of Agronomy and Crop Science**, vol. 203, p. 81–102, 2017.

- FLETA-SORIANO, E., MUNNÉ-BOSCH, S. Stress memory and the inevitable effects of drought: a physiological perspective. **Frontiers in Plant Science**, vol. 7, p. 143, 2016.
- FLEXAS, J., BARBOUR, M.M., BRENDEL, O., *et al.* Mesophyll diffusion conductance to CO<sub>2</sub>: an unappreciated central player in photosynthesis. **Plant Science**, vol. 193–194, p. 70–84, 2012.
- GALLE, A.; FLOREZ-SARASA, I.; EL AOUOUAD, H.; FLEXAS, J. The Mediterranean evergreen *Quercus ilex* and the semideciduous *Cistus albidus* differ in their leaf gas exchange regulation and acclimation to repeated drought and re-watering cycles. **Journal and Experimental Botany**, vol. 62, p. 5207-5216, 2011.
- GILL, P. K.; SHARMA, A. D.; SINGH, P.; BHULLAR, S. S. Changes in germination, growth and soluble sugar contents of *Sorghum bicolor* (L.) Moench seeds under various abiotic stresses. **Plant Growth Regulation**, vol. 40, p. 157–162, 2003.
- GOH, C.H.; NAM, H.G.; PARK, Y.S. Stress memory in plants: a negative regulation of stomatal response and transient induction of *rd22* gene to light in abscisic acid-entrained *Arabidopsis* plants. **Plant Journal**, vol. 36, p. 240–255, 2003.
- GOLZ, T. Crambe. In: Dwight Aakre (Ed.); **Alternative Agriculture Series**. Nort Dakota State University Extension Service. p. 195 – 202, 1993.
- GOMES, M. T. G.; DA LUZ, A. C.; DOS SANTOS, M. R.; BATITUCCI, M. C. P.; SILVA, D. M.; FALQUETO, A. R. Drought tolerance of passion fruit plants assessed by the OJIP chlorophyll *a* fluorescence transient. **Scientia Horticulturae**, vol. 142, p. 49–56, 2012.
- GONÇALVES, C. F. J.; SILVA, M. E. C.; GUIMARÃES, G. D. Fotossíntese e potencial hídrico foliar de plantas jovens de Andiroba submetidas à deficiência hídrica e à reidratação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vol. 44, p. 8-14. 2009.
- GONZÁLEZ, A.; BERMEJO, V.; GIMENO, B. S. Effect of different physiological traits on grain yield in barley grown under irrigated and terminal water deficit conditions. **Journal of Agricultural Science**. vol. 148, p. 319 – 328. 2010.
- GUHA, A., CHHAJED, S. S., CHOUDHARY, S., SUNNY, R., JANSEN, S., BARUA, D. Hydraulic anatomy affects genotypic variation in plant water use and shows differential organ specific plasticity to drought in *Sorghum bicolor*. **Environmental and Experimental Botany**. vol. 156, p. 25 – 37, 2018.



- HU, T.; LIU, S.Q.; AMOMBO, E.; FU, J.M. Stress memory induced rearrangements of HSP transcription, photosystem II photochemistry and metabolism of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) in response to high-temperature stress. **Frontiers in Plant Science**, vol. 6, p. 403, 2015.
- HU, T.; JIN, Y.; LI, H.; AMOMBO, E.; FU, J. Stress memory induced transcriptional and metabolic changes of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) in response to salt stress. **Physiologia Plantarum**, vol. 156, 54–69, 2016.
- HUMMEL, I.; PANTIN, F.; SULPICE, R.; PIQUES, M.; ROLLAND, G.; DAUZAT, M.; CHRISTOPHE, A.; PERVENT, M.; BOUTEILLÉ, M.; STITT, M.; GIBON, Y.; MULLER, B. Arabidopsis plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: an integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis. **Plant Physiology**, vol. 154, p. 357-372, 2010.
- INMAN-BAMBER, N.; SMITH, D. Water relations in sugarcane and response to water deficits. **Field Crops Research**, vol. 92, p. 185-202, 2005.
- IWASAKI, M.; PASZKOWSKI, J. Epigenetic memory in plants. **The EMBO Journal**, vol. 33, p. 1-12, 2014.
- JALEEL, C. A.; MANIVANNAN, P.; WASHID, A.; PANNEERSELVAM, R. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. **International Journal of Agriculture Biology**, vol. 11, p. 100-105, 2009.
- KADER, M.A.; JUTZI, S.C. Temperature, osmotic pressure and seed treatments influence imbibition rates in sorghum seeds. **Journal of Agronomic and Crop Science**, vol. 188, p. 286–290, 2002.
- KRAUSE, G.H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, vol. 42, p.313-349, 1991.
- LALAS, S.; GORTZI, O.; ATHANASIADIS, V.; DOURTOGLOU, E.; DOURTOGLOU, V. Full characterization of *Crambe abyssinica* Hochst. seed oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, vol. 89, p. 2253-2258, 2012.
- LANG, Y.; WANG, M.; XIA, J.; ZHAO, Q. Effects of soil drought stress on photosynthetic gas exchange traits and chlorophyll fluorescence in *Forsythia suspense*. **Journal of Forestry Research**, vol. 29, p.45-53, 2018.

LIBERATO, R. A. M.; GONÇALVES, C. F. S.; CHEVREUIL, R. L.; JUNIOR, N. R. A.; FERNANDES, V. A.; JUNIOR, S. M. U. Leaf water potential, gás Exchange and chlorophyll *a* fluorescence in acariquara seedlings (*Minquartia guianensis* Aubl.) under water stress and recovery. **Brazilian Journal Plant Physiology**. vol. 18, p. 315 – 323. 2006.

LIU, N.; FROMM, M.; AVRAMOVA, Z. H3K27me3 and H3K4me3 chromatin environment at super-induced dehydration stress memory genes of *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant**, vol. 7, p. 502–513, 2014.

MACHADO, F.H.B.; DAVID, A.M.S.S.; CANGUSSÚ, L.V.S.; FIGUEIREDO, J.C.; AMARO, H.T.R. Physiological quality of seed and seedling performance of crambe genotypes under water stress. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, vol. 21, p. 175-179, 2017.

MARCOS, F.C.C.; SILVEIRA, N.M.; MOKOCHINSKI, J.B.; SAWAYE, A.C.H.F.; MACHIORI, P.E.R.; MACHODO, E.C.; SOUZA, G.M.; LANDELL, M.G.A.; RIBEIRO, R.V. Drought tolerance of sugarcane is improved by previous exposure to water deficit. **Journal Plant Physiology**, vol. 223, p. 9-18, 2018.

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ. 2005.

MARTINS, R.F.A.; SOUZA, A.F.C.; PITOL, C.; FALQUETO, A.R. Physiological responses to intense water deficit in two genotypes of crambe (*Crambe abyssinica* Hochst.). **Australian Journal of Crop Science**, vol. 11, p.821-827, 2017.

MATHOBO, R.; MARAIS, D.; STEYN, J.M. The effect of drought stress on yield, leaf gaseous exchange and chlorophyll fluorescence of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Agricultural Water Management**, vol. 180, p. 118–125, 2017.

MEHTA, P.; JAJOO, A.; MATHUR, S.; BHARTI, S. Chlorophyll *a* fluorescence study revealing effects of high salt stress on Photosystem II in wheat leaves. **Plant Physiology and Biochemistry**, vol. 48, p.16-20, 2010.

MENEZES-SILVA, P.E.; SANGLARD, L.M.P.V.; ÁVILA, R.T. *et al.* Photosynthetic and metabolic acclimation to repeated drought events play key roles in drought tolerance in coffee. **Journal of Experimental Botany**, vol. 68, p. 4309- 4322, 2017.

- MICKELBART, M.V.; HASEGAWA, P.M.; BAILEY-SERRES, J. Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. **Nature Reviews Genetics**, vol. 16, p. 237–251, 2015.
- MURATA, N.; TAKAHASHI, S.; NISHIYAMA, Y.; ALLAKHVERDIEV, S.I. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. **BBA- Bioenergetics**, vol. 1767, p. 414–421, 2007.
- NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, vol. 49, p. 249 – 279, 1998.
- OLIVEIRA, R. C.; AGUIAR, C. G.; VIECELLI, C. A.; PRIMIERI, C.; BARTH, E. F.; BLEIL JUNIOR, H. G.; SANDERSON, K.; ANDRADE, M. A. A.; VIANA, O. H.; SANTOS, R. F.; PARIZOTTO, R. R. **Cultura de Crambe**. Cascavel: ASSOESTE. 2013.
- OLIVEIRA, R.C.; REIS, A.C.C.S.; AGUIAR, C.G.; VIECELLI, C.A.; PRIMIERI, C.; TOMASI, G.A.; BLEIL JUNIOR, H.G.; ANDRADE, M.A.A.; VIANA, O.H. **Agroindustrialização do Crambe**. Cascavel: ASSOESTE. 2015.
- OLIVEIRA, I.; MEYERB, A.; AFONSO, S.; GONÇALVES, B. Compared leaf anatomy and water relations of commercial and traditional *Prunus dulcis* (Mill.) cultivars under rain-fed conditions. **Scientia Horticulturae**. vol. 229, p. 226–232, 2018.
- OPLINGER, E. S. et al. Crambe. In: **Alternative field crops manual**. St. Paul: University of Minnesota, p. 507-508, 1991.
- OUKARROUM, A.; MEDIDI, S.; SCHANSKER, G.; STRASSER, J. R. Probing the reponses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll *a* fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering. **Environmental and Experimental Botany**. vol. 60, p. 438 – 446, 2007.
- OUKARROUM, A.; SCHANSKER, G.; STRASSER, R.J. Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using Chl *a* fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance. **Physiologia Plantarum**, vol. 137, p. 188-199, 2009.

PATANÈ, C.; SAITA, A.; SORTINO, O. Comparative Effects of Salt and Water Stress on Seed Germination and Early Embryo Growth in Two Cultivars of Sweet Sorghum. **Journal of Agronomy and Crop Science**, vol. 199, p. 30–37, 2013.

PEIXOTO, A.L.; SILVA, I.M.; PEREIRA, O.J.; SIMONELLI, M.; JESUS, R.M.; ROLIM, S.G. Tabuleiro Forests North of Rio Doce: Their representation in the Vale do Rio Doce Natural Reserve, Espírito Santo, Brazil. **Memoirs of the New York Botanical Garden**, vol. 100, p. 319-350, 2008.

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

PITOL, C. Cultura do crambe. In: PITOL, C. **Tecnologia de produção: milho safrinha e culturas de inverno**. Maracajú: Fundação MS, p. 85-88, 2008.

PITOL, C.; BROCH, D.L.; ROSCOE, R. **Tecnologia e Produção: Crambe 2010**. Maracaju: Fundação MS. 2010.

PITOL, C.; BROCH, D.L.; ROSCOE, R. **Introdução e Melhoramento do crambe no Brasil, Tecnologia e produção: crambe**. FMS: Fundação MS. 2012.

PORCH, T.G.; RAMIREZ, V.H.; SANTANA, D.; HARMSEN, E.W. Evaluation of Common Bean for Drought Tolerance in Juana Diaz, Puerto Rico. **Journal Agronomy & Crop Science**, vol. 195, p. 328–334, 2009.

RATNAYAKA, H.H.; MOLIN, W.T.; STERLING, T.M. Physiological and antioxidant responses of cotton and spurred anoda under interference and mild drought. **Journal and Experimental Botany**, vol. 54, p. 2293-2305, 2003.

ROSALES, M.A.; OCAMPO, E.; RODRIGUEZ-VALENTIN, R.; OLVERA-CARRILLO, Y.; ACOSTA-GALLEGOS, J.; COVARRUBIAS, A.A. Physiological analysis of commonbean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars uncovers characteristics related to terminaldrought. **Plant physiology and Biochemistry**, vol. 56, p. 24–34, 2012.

SHI, W.; LI, X.; SCHMIDT, R.C.; STRUIK, P.C.; YIN, X.; JAGADISH, S.V.K. Pollen germination and in vivo fertilization in response to high-temperature during flowering in hybrid and inbred rice. **Plant Cell Environmental**, vol. 41, p. 1287 – 1297, 2018.

SOUZA, R. P.; MACHADO E. C.; SILVA, J. A. B.; LAGÔA, A. M. M. A.; SILVEIRA, J. A. G. photosynthetic gás exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic

changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. **Environmetal and Experimental Botany**, v. 51, p. 45 – 56. 2004.

THELLIER, T., LÜTTGE, U. Plant memory: a tentative model. **Plant Biology**, vol. 15, p. 1–12, 2013.

VAN HANDEL, E. Direct microdetermination of sucrose. **Analytical Biochemistry**, vol. 22, p. 280–283, 1968.

VASCONCELOS, U.A.A.; CAVALCANTI, J.J.V.; FARIAS, F.J.C. VASCONCELOS W. S.; SANTOS; R C. Diallel analysis in cotton (*Gossypium hirsutum L.*) for water stress tolerance. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, vol. 18, p. 24-30, 2018.

VERLUES, P.E.; AGARWAL, M.; KATIYAR-AGARWAL, S.; ZHU, J.; ZHU, J.K. Methods and concepts in quantifying resistance to drought salt and freezing, abiotic stress that affect plant water status. **Plant Journal**, vol. 45, p. 523–539, 2006.

VIÇOSI, K.A.; FERREIRA, A.A.S.; OLIVEIRA, L.A.B.; RODRIGUES, F. Estresse hídrico simulado em genótipos de feijão, milho e soja. **Revista de Agricultura Neotropical**, vol.4, p. 36-42, 2017.

WALTER, J.; NAGY, L.; HEIN, R.; RASCHER, U.; BEIERKUHNLEIN, C.; WILLNER, E.; JENTSCH, A. Do plants remember drought? Hints towards a drought-memory in grasses. **Environmetal and Experimental Botany**, vol. 71, p. 34–40, 2011.

WANG, Y.; XU, C.; WU, M. & CHEN, G. Characterization of photosynthetic performance during reproductive stage in high-yield hybrid rice LYPJ exposed to drought stress probed by chlorophyll *a* fluorescence transient. **Plant Growth Regulation**, vol.81, p. 489-499, 2016.

WANG, Y.P.; TANG, J.S.; CHU, C.Q.; TIAN, J. A preliminary study on the introduction and cultivation of *Crambe abyssinica* in China, an oil plant for industrial uses. **Industrial Crops and Products**, vol. 12, p. 47-52, 2000.

WARWICK, S.I.; GUGEL, R.K. Genetic variation in the *Crambe abyssinica* – *C. hispanica* – *C. glabrata* complex. **Genetic Resources and Crop Evolution**, vol. 50, p. 291 – 305, 2003.

WAZILEWSKI, W.T.; BARICCATTI, R.A.; MARTINS, G.I.; SECCO, D.; DE SOUZA, S.N.M.; ROSA, H.A.; CHAVES, L. I. Study of the methyl crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) and soybean biodiesel oxidative stability. **Indriial Crops and Products.**, vol. 43, p. 207-212, 2013.

WILKINSON, S.; DAVIES, W. J. ABA-based chemical signaling: the co-ordination of responses to stress in plants. **Plant, Cell & Environment**, vol. 25, p. 195-210, 2002.

XIONG, L.; WANG, R-G.; MAO, G.; KOCZAN, J.M. identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic acid. **Plant Physiology**, vol. 142, p. 1065-1074, 2006.

YORDANOV, L.; VELIKOVA, V.; TSONEV, T. Plant responses to drought, acclimation and stress tolerance. **Photosynthetica**. v. 38, p. 171 – 186. 2000.

ZANETTI, F.; SCORDIA, D.; VAMERALI, T.; COPANI, V.; DAL CORTIVO, C.; MOSCA, G. *Crambe abyssinica* a non-food crop with potential for the Mediterranean climate: Insights on productive performances and root growth. **Industrial Crops and Products**, vol. 90, p. 152-160, 2016.

ZHANG, M.; WANG, L.; ZHANG, K.; LIU, F.; WAN, Y. Drought-induced responses of organic osmolytes and proline metabolism during pre-flowering stage in leaves of peanut (*Arachis hypogaea*L.). **Journal of Integrative Agriculture**, vol. 16, p. 2197–2205, 2017.

ZHANG, R.H.; ZHANG, X.H.; CAMBERATO, J.J.; XUE, J.Q. Photosynthetic performance of maize hybrids to drought stress. **Russian Journal of Plant Physiology**, vol. 62, p.788-796, 2015.

ZHANG, S.; XU, X.; SUN, Y.; ZHANG, J.; LI, C. Influence of drought hardening on the resistance physiology of potato seedlings under drought stress. **Journal of Integrative Agriculture**, vol. 17, p. 336–347, 2018a.

ZHANG, C.; PENG, X.; GUO, X. ; TANG, G.; SUN, F.; LIU, S.; XI, Y. Transcriptional and physiological data reveal the dehydration memory behavior in switchgrass (*Panicum virgatum* L.), **Biotechnol Biofuels**, vol. 11:91, p. 1-22, 2018b.

**CAPÍTULO 1 - Germination and seedling growth of five crambe (*Crambe abyssinica* hochst.) genotypes submitted to water deficit induced by polyethylene glycol**

Priscila C.S. Braga<sup>1</sup>, João Paulo R. Martins<sup>1</sup>, Mauro V. Pacheco<sup>2</sup>, Railda M. Borges<sup>1</sup>, Robson Bonomo<sup>1</sup>, Daniela Cassol<sup>3</sup> and Antelmo R. Falqueto<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Agrarian and Biological Science, Federal University of Espírito Santo, 29932-540 São Mateus, ES, Brazil; <sup>2</sup>Academic Unit of Agrarian Sciences, Federal University of Rio Grande do Norte, 59280-000, Macaíba, RN, Brazil and <sup>3</sup>Department of Botany and Plant Sciences, University of California, CA, 92521, USA.

\*Autor para correspondência: (+55) 27 3312 1548. Antelmo R. Falqueto, E-mail: antelmo.falqueto@ufes.br

Periódico a ser submetido: *Seed Science Research*.

A formatação de citação, referências, tabelas e figuras deste capítulo seguem as instruções do periódico *Seed Science Research*, que consta em:  
<https://www.cambridge.org/core/journals/seed-science-research/information/instructions-contributors>

## Abstract

The objective of this study was to evaluate the tolerance of crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) genotypes submitted to water stress induced by polyethylene glycol (PEG 6000) during germination and early growth of seedlings. A randomized block experimental design was used in a factorial scheme consisting of five crambe genotypes (FMS Brillhante, FMS CR 1203, 1307, 1312 and 1326) and five levels of osmotic potential [0.0 (control), -0.2, -0.4, -0.5 and -0.6 MPa] in five replicates of 40 seeds. The seeds were previously sterilized with solutions of 70% ethanol for 2 minutes, 1% (v/v) sodium hypochlorite for 20 min. and the fungicide Ridomil<sup>®</sup> for 10min., followed by triple washing with autoclaved distilled water. The seeds were then planted in a gerbox box (11 x 11 x 3 cm) containing washed sand moistened to 60% of retention capacity and placed in a growth room at 25 °C with photoperiod of 16 h light and 8 h dark. Germination rate (%), normal seedling development (%), germination speed index (GSI), root and shoot length (cm.seedling<sup>-1</sup>), total fresh matter (g.seedling<sup>-1</sup>), and water content of seedlings (%) were analyzed. Physiological quality of seeds and initial development of crambe genotypes was improved in the group submitted to  $\Psi_w = -0.2$  MPa. Germination and vigor index of crambe seeds were hampered by reduction of the potential to -0.4 MPa. The genotype FMS CR 1203 was the most tolerant to water stress, whereas FMS CR 1307 and 1312 were the most sensitive, as corroborated by PCA.

**Keywords:** Abiotic stress, FMS Brillhante, osmotic potential, seed.

## Introduction

Water deficit is one of the most important and complex environmental factors limiting the germination of seeds (Viçosi et al., 2017) and development of seedlings (Machado et al., 2017). In seeds, water deficit reduces the turgor pressure, negatively affecting the expansion and growth of cells (Bewley and Black, 1994), reducing the availability of oxygen, gas exchanges and synthesis of enzymes and hormones for digestion, translocation and assimilation of reserves (Marcos-Filho, 2005), resulting in a reduced germination speed index (GSI) (Kader and Jutzi, 2002). This exposes the seeds to the action of pathogens and attacks by insects and other pests (Machado et al., 2017). Water deficit also causes an increase in the dry weight of embryos, due to the need for osmotic adjustment, associated with the accumulation of compatible solutes (Gill et al., 2003). According to Patanè et al. (2013), water deficit leads to more concentrated root tissue of solutes and lower water content in the



roots. Furthermore, in genotypes more sensitive the metabolic signaling that regulates gene expression during water deficit can be reduced (Coelho et al., 2010), consequently stunting the growth of the hypocotyl and radicle (Viçosi et al., 2017).

Plants have developed many strategies to maintain growth when water availability is restricted or inconsistent (Silva et al., 2016), such as ionic homeostasis and activation of the enzyme antioxidant system, to promote cell detoxification and growth regulation (Zhu, 2001; Silva et al., 2017). However, these responses are generally more pronounced in genotypes that are tolerant to water deficit. According to Kappes et al. (2010), experiments involving germination of seeds under different osmotic potentials are important for selection of genotypes that are tolerant or susceptible to water deficit.

Several studies have investigated the germination of seeds submitted to different osmotic potentials, to screen for genotypes that are tolerant to water deficit (Machado et al., 2017; Viçosi et al., 2017; Paiva et al., 2018). These studies have the objective of improving the establishment of crops in the field. Machado et al. (2017) observed a higher germination rate, germination first count, fresh and dry matter in *Crambe abyssinica* (Hochst.) FMS CR 1101 genotype submitted to different osmotic potentials induced by polyethylene glycol 6000 (PEG 6000), which was attributed to higher tolerance to water deficit compared with the FMS Brilhante genotype. The water stress tolerance levels of seeds of cowpea [*Vigna unguiculata* L. (Walp)] and the arabica coffee (*Coffea arabica* L.) varieties Red Bourbon and Mundo Novo compared to cultivar BA-10 utilizing PEG 6000 were evaluated (Paiva et al., 2018; Almeida et al., 2018). In these studies, it was possible to differentiate between drought-resistant and drought-sensitive cultivars by observing the level of seed germination and early development of seedlings. PEG 6000 is a chemically inert and nontoxic product that simulates low water potentials without being absorbed by seeds, due to the large size of its molecules (Villela et al., 1991). The application of PEG 6000 is one of the most widely used methods to identify genotypes that are tolerant to water deficiency by osmotic stress.

*Crambe* (*Crambe abyssinica* Hochst.) is an annual plant belonging to the family Brassicaceae, grown for industrial purposes as an oilseed crop. The oil is highly valuable and has multiple uses, such as to make plastics, lubricants and biodiesel (Carlsson et al., 2007). The oil content of the seeds ranges from 36 to 38% (Pitol et al., 2010), higher than that of soybeans (Faria, 2014). Because it does not compete with oilseed crops used to obtain edible oils, its cultivation is expanding in Brazil, particularly to produce vegetable insulating oil (Oliveira et al., 2015).

According to Pitol et al. (2012), new varieties are being tested to expand its cultivation and improve yield in Brazil. At present, FMS Brilhante is the only genotype registered in Brazil. However, the genotypes FMS CR 1312 and 1307 are considered to be candidate materials for pre-launch, and FMS CR 1213 and 1326 are still being tested by the Mato Grosso do Sul Foundation or MS Foundation (Oliveira et al., 2015). The identification of genetic materials with high germinability and good development under environmental stress conditions like water deficit is necessary to improve productivity and expand the culture to regions characterized by low precipitation. Therefore, this study aimed to evaluate the tolerance of five crambe genotypes submitted to water stress during germination and early growth of seedlings.

## Materials and methods

The experiment was carried out at the Laboratory of Plant Ecophysiology of Federal University of Espírito Santo (UFES), in São Mateus, ES, Brazil, using seeds of five crambe genotypes (*Crambe abyssinica* Hochst., FMS Brilhante, FMS CR 1203, 1307, 1312 and 1326), obtained from the Mato Grosso do Sul Foundation (MS Foundation), an agency for research and diffusion of agricultural technologies located in Maracaju, Mato Grosso do Sul.

Water deficit was induced by polyethylene glycol (PEG 6000) treatments. Four solutions with  $\Psi_w = -0.2, -0.4, -0.5,$  and  $-0.6$  MPa were applied (distilled water was used as the control treatment), according to the levels established by Villela et al. (1991). To avoid hypoxia by flooding the seeds, which strongly inhibits germination, special care was taken during application of the solutions. The seed moisture level was determined by the oven-drying method, at  $105 \pm 3^\circ\text{C}$  for 24 hours (Brasil, 2009).

The crambe seeds were sterilized with solutions of 70% ethanol for 2 minutes, 1% (v/v) sodium hypochlorite for 20 min. and the fungicide Ridomil<sup>®</sup> for 10 min., followed by triple washing with autoclaved distilled water. The seeds were then planted in a gerbox box (11 x 11 x 3 cm) containing washed sand moistened to 60% of retention capacity (Brasil, 2009) and placed in a growth room at 25 °C with photoperiod of 16 h light and 8 h dark.

The germination rate (%G) was determined according to the primary root emergence criterion. The percentage of normal plants (%NP) and germination speed index (GSI) were measured on the seventh day after sowing according to Brasil (2009), following Equations 1 and 2, as described by Maguire (1962).

$$\%G \text{ or } \%NP = (\Sigma ni/N) \times 100 \quad (1)$$

$$GSI = (G1/N1) + (G2/N2) + (Gn/n) \quad (2)$$

Where:

%G or %NP = percentage of germination by radicle emission or percentage of normal plants, respectively.

$\Sigma ni$  –total number of germinated seeds;

N - number of seeds placed to germinate;

GSI–germination speed index;

G1, G2, Gn –number of seeds germinated on the first, second and last day; and

N1, N2 and Nn –days since sowing on the first, second and last day.

At the end of the germination test, the primary root and hypocotyl of normal seedlings of each replicate were measured using a centimeter ruler, and the results were expressed in cm seedling<sup>-1</sup>. Furthermore, to determine shoot and root dry matter, the seedlings were cut and placed in paper bags, dried in a forced-air oven at 65 °C for 72 h and weighed on an analytical scale (0.0001 g). The results were expressed in g seedling<sup>-1</sup>.

Finally, the water content of the seedlings was determined using the fresh and dry weight values, according to Equation 3.

$$WC = ((Wi - Wf/Wi)) \times 100 \quad (3)$$

At where:

WC = water content of the seedlings (%);

Wi = initial weight (fresh); and

Wf = final weight (dry).

The experiment was carried out in randomized block design with five replicates containing 40 seeds each. The factors were five water potential levels [control (distilled water), -0.2, -0.4, -0.5, and -0.6 MPa] and five crambe genotypes. The data were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the means of the factors (genotypes and osmotic potential levels) were compared using the Tukey test ( $p < 0.05$  or  $p < 0.001$ ), calculated by the Sisvar® program (Ferreira, 2011). Principal component analysis (PCA) were performed to visualize

the data globally and in order to identify the correlations between the osmotic potential treatments and the genotypes variation using R software (R Core Team, 2018). The data obtained in the evaluation of each treatment and genotype were initially standardized and PCA was conducted using the Factor Mine R package (Le et al., 2008).

## Results and Discussion

The seed moisture content varied significantly ( $p \leq 0.001$ ) among the crambe genotypes evaluated (Table 1). The lowest seed moisture values were observed for the FMS Brilhante and FMS CR 1203 genotypes (5.65 and 5.69, respectively). In contrast, the highest values were recorded for FMS CR 1307 (Table 1). According to Marco-Filho (2005), the seed moisture content is related to seed vigor, since free water in the tissues increases various reactions, including those involved in seed deterioration, such as increased respiration, inducing the synthesis of adenosine triphosphate (ATP) (Kibinza et al., 2006) and malondialdehyde (MDA), in turn reducing cell membrane protection and increasing lipid peroxidation (Zhang et al., 2018), which occurs through the cascade of superoxide radicals ( $O_2^-$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and hydroxyl radicals ( $OH^\cdot$ ) (Noctor and Foyer, 1998; Zhang et al., 2018). In this study, although all crambe genotypes showed adequate seed moisture values (e.g., values  $<9$  b.u., see Table 1), the higher seed moisture values reported for FMS CR 1307 may indicate increased biochemical reactions, which consequently increases the chances of seed deterioration (Cardoso et al., 2012).

The interaction between crambe genotypes and osmotic potential levels was significant ( $p \leq 0.001$ ) for germination rate (%), normal seedling percentage (%), germination speed index (GSI), radicle and hypocotyl length and fresh matter (Figures 1-4). Total dry matter (DM) of the seedlings was significantly influenced ( $p \leq 0.001$ ) by the isolated factors, genotypes and osmotic potential levels (Table 2).

Overall, the crambe seeds germinated at all the osmotic potentials tested. Higher germination occurred when seeds were treated at -0.2 MPa (Fig. 1A). Under  $\Psi_s$  higher than -0.4 MPa, significant decreases in germination occurred for all genotypes and reached minimums of 17.5%, 22%, 12%, 15% and 9.5% for FMS Brilhante, FMS CR 1203, 1307, 1312 and 1326, respectively, at -0.6 MPa (Fig. 1A). Furthermore, in the control group (0.0 MPa), the germination declined by about 22.7%, 82.1%, 77.5% and 36.2% in the FMS Brilhante, FMS CR 1307, 1312 and 1326 genotypes, respectively.

At the start of the germination process, the seeds are water dependent (phases I, II and II) (Bewley, 1997). During phase III, which is characterized by cell elongation, radicle

emission occurs and the rate of seed imbibition tends to decelerate (Bewley, 1997; Bove et al., 2001). In this study, the reduction of germination reported for the FMS Brilhante, FMS CR 1307, 1312 and 1326 genotypes in the control group ( $\Psi_s = 0$  MPa) may have occurred due to fast seed imbibition, which can cause damages to the embryo, as reported by Bewley and Black (1994). Furthermore, the reduction of germination from -0.4 MPa onward suggests osmotic interference in enzymatic activity, delaying meristematic development and retarding root emergence (Bewley et al., 2013). According to Marco-Filho (2015), low germination rates are related to membrane disorganization, followed by tissue death in different parts of seeds, especially meristematic tissues. In this study, the seed germination of all crambe genotypes was inhibited at -0.4 MPa, except for FMS CR 1307. Under in not adequate water potential, inhibition of seed imbibition capacity occurs, which limits the activation of the main metabolic pathways that act directly or indirectly on seed germination (Marcos-Filho, 2005).

The percentage of normal plants was zero for both FMS CR 1307 and 1312 genotypes when the seeds were treated at -0.6 MPa. Therefore, the seeds of FMS CR 1307 and 1312 that showed some germination (denoted by radicle emission) (Figure 1A) did not generate normal seedlings (Figure 1B). The formation of abnormal seedlings of these crambe genotypes treated at -0.6 MPa suggests dysfunction and/or damage to the biomembrane system, caused by the progressive loss of protoplasmic turgor and increased concentration of cellular solutes (Bruni and Leopold, 1992). The lower values of germination and normal plants (see Fig. 1A and B) reported for both crambe genotypes may indicate greater susceptibility to water deficit caused by PEG.

Reductions in GSI occurred in all genotypes with the reduction of water potential (Figure 1C). According to Dell'Aquila (1992), reduction in GSI values is a common response to water deficit and can be attributed to the impaired synthesis of proteins in embryonic tissues due the low hydration. The FMS CR 1203 genotype showed higher values of GSI when submitted to 0.0 and -0.4 MPa (14.4, 3.2, respectively). In contrast, lower GSI values were reported at 0.0 and -0.2 MPa (7.2 and 7.9, respectively) for FMS CR 1307 and -0.4 MPa (1.5) for FMS CR 1312. Rapid germination generally corresponds to seed vigor, leading to faster emergence of seedlings in the field (Marcos-Filho, 2015). In this study, the higher GSI observed for the FMS CR 1203 genotype suggests higher probability that the seeds reached the next phase of the biocycle (Oliveira et al., 2015), because an increase in the GSI under water deficit conditions indicates less susceptibility to pathogens, insects and other pests (Machado et al., 2017), increasing the success of seedling development.

The crambe seedlings showed different growth patterns when submitted to different osmotic potentials (Figure 2 and 3). However, up to the potential of -0.5 MPa, all seedlings had long and thin primary roots, coated with numerous root hairs, thin and elongated hypocotyl and green or greenish cotyledons (Figure 2). At  $\Psi_s = -0.6$  MPa, only FMS CR 1307 and 1312 genotypes produced seedlings classified as abnormal according to Brasil (2009). Seedlings of FMS CR 1307 had underdeveloped and yellowish cotyledons. Furthermore, seedlings of FMS CR 1312 showed under developed hypocotyl and poor root growth.

When the seeds were treated at 0.0 and -0.2 MPa, no difference in root length was noted among the crambe genotypes (Figure 3A). However, osmotic potential values equal or greater than -0.4 MPa resulted in longer root length for FMS CR 1203. Although the increase of root length in mature plants submitted to water deficit is a common morphological change (Pimentel, 2004), in seedlings this response varies according to the species/genotype, as reported by Zhu et al. (2006), Paiva et al. (2018) and Almeida et al. (2018), studying the germination and early growth of *Pinus sylvestris* var. *mongolica*, *Vigna unguiculata* L. Walp and *Coffea arabica* L., respectively. In this study, higher root length was obtained for the FMS CR 1203 genotype treated at -0.6 MPa compared to the other genotypes, which was similar to the values obtained under control conditions. According to Echer et al. (2010), seedlings with the ability to grow roots under water stress conditions can maintain the hydration of tissues through osmotic adjustment. These results indicate higher growth capacity of the root system in order to improve water absorption (Ávila et al., 2007).

In this study, hypocotyl length was also affected by water deficit (Figure 3B). The FMS CR 1307 and 1312 genotypes showed no hypocotyl growth when the seeds were treated at -0.6 MPa. These results were consistent with those obtained for the percentage of normal plants (see Fig. 1B). Reductions in hypocotyl length have also been reported for all these crambe genotypes subjected to osmotic potential values equal to or greater than -0.4 MPa, suggesting a reduction in the water potential of plant cells (Abati et al., 2014) and, however, a decrease in the pressure, expansion and cell growth, which limits the development of the seedlings (Jaleel et al., 2009; Abati et al., 2014). In contrast, the FMS CR 1203 genotype showed greatest hypocotyl length at the osmotic potential of -0.6 MPa. This result can be attributed to the higher values of root growth reported for this genotype under water deficit (Fig. 3A), indicating higher hydration of the tissue through osmotic adjustment, as reported by Echer et al. (2010).

The total fresh matter values decreased when the seedlings were treated at osmotic potential values equal to or greater than -0.4 MPa for all genotypes (Figure 4A). FMS CR

1307 and 1312 showed the lowest total fresh matter values in all treatments, except for -0.2 and -0.4 MPa. This result was corroborated by the lower dry mass accumulation observed for these genotypes (Table 2). In contrast, at  $\Psi_s$ -0.6 MPa, significantly higher total fresh matter values were obtained for FMS CR 1203 compared to the other genotypes, which also was evidenced by the higher dry mass accumulation (Table 2).

According to Coelho et al. (2010), plant species have the ability to signal and regulate the protein expression when subjected to water stress, and consequently activate antioxidant enzymes such as peroxidase, catalase and ascorbate peroxidase and reduce the activity of superoxide dismutase, resulting in better reactive oxygen species elimination capacity under water deficit in seedlings, as observed by Ali et al. (2017), studying the effects of water deficit on germination and growth of bean seedlings (*Vigna radiata* L., cultivars NM-2006 and 8005). According to the authors, the better growth of seedlings is associated with a more efficient mechanism to eliminate reactive oxygen species, which is associated with both activity and content of antioxidant enzymes.

Under osmotic potential equal to or greater than -0.5 MPa, reductions of water content were observed for all crambe genotypes except FMS Brilhante and FMS CR 1203 (Fig. 4B). At  $\Psi_s$  = -0.6 MPa, higher water content values were obtained for FMS CR 1203, suggesting production and accumulation of several compounds, reducing the internal osmotic potential in order to maintain water uptake by seedlings (Manishankar et al., 2018), as well as the activation of enzymes for cell detoxification, as reported by Coelho et al. (2010) and Gupta and Huang (2014). In contrast, the reduction of water content indicates poor osmotic regulation. Osmotic adjustment maintains turgor and reduces growth sensitivity under water deficit conditions, causing low growth rate under stress (Meyer and Boyer 1981). Higher values of total dry matter were obtained at the osmotic potential of -0.2 MPa (Table 2). According to Carpiski et al. (2013), *C. abyssinica* Hochst is a species considered tolerant to water deficit and intolerant to excess moisture, indicating that osmotic potentials below -0.2 MPa are not adequate for germination of the studied genotypes. FMS CR 1203 showed the highest values of total dry matter, while FMS CR 1307 had the lowest values (-54.2% compared to the highest dry matter value of FMS CR 1203).

Principal component analysis (PCA) was employed to assess the responses of each osmotic potential treatment and all the genotypes tested in all the data. PCA is a powerful method that converts the number of high-dimensional variables into a few numbers of principal components (PCs), representing the original data (Jolliffe and Cadima, 2016). The results revealed that two principal components explained 91.5% of the total variance in the

dataset, 72.9% in the first principal component (PC1), and 18.6% in the second (PC2) of the observed variability (Fig. 5). Overall, the PCA revealed distinct clusters formed among the crambe genotypes proportional to their water potential, indicating the existence of a response pattern of seeds/seedlings of different crambe genotypes to variation in water potential conditions. Under low  $\Psi_w$  (0.0 and -0.2 MPa), the genotypes were clearly grouped in two clusters, in which the greatest difference was observed between FMS CR 1203 and FMS CR 1307. However, under high  $\Psi_w$  (-0.5 and -0.6 MPa), the FMS CR 1203 was grouped with all other genotypes submitted to  $\Psi_w = -0.4$  MPa. Establishing principal components made it possible to show differences among the genotypes response to drought stress and under high  $\Psi_w$  FMS CR 1203 demonstrates a better performance to tolerate these conditions.

The results obtained in this study suggest the existence of significant genetic differences among the crambe genotypes studied in response to water deficit induced by polyethylene glycol. According to Pitol (2017) (personal communication), all genotypes evaluated were obtained through natural selection, so FMS CR 1203, 1307, 1312 and 1326 are natural crosses of different genotypes from the genotype FMS Brilhante. According to Kappes et al. (2010), the seed germination at different  $\Psi$ s values depends on the genetic material used, whereby genotype is a determinant factor for tolerance or susceptibility to water deficit under field conditions. Attention is necessary to choose genotypes that are tolerant to water deficit (Machado et al., 2017). Thus, the results obtained in this study are relevant to evaluate the behavior of crambe genotypes under critical osmotic potentials for germination and early growth of seedlings. Finally, the PCA analysis corroborated the higher stress tolerance previously observed for FMS CR 1203, because even when increasing the intensity of water deficit, no differences in germination and seedling growth were noted. Furthermore, the grouping of FMS CR 1307 and 1312 corroborates the lower tolerance to water deficit.

## Conclusions

1. Physiological quality of seeds and initial development of crambe genotypes are improved by  $\Psi_w = -0.2$  MPa.
2. Germination and vigor index of crambe seeds are hampered by the reduction in the potential to -0.4 MPa.
3. The genotype FMS CR 1203 is the most tolerant to water stress, whereas FMS CR 1307 and 1312 are the most sensitive.



## Acknowledgements

We thank MS Foundation for providing the necessary plant material and technical support during the study.

## Financial support

Financial support was provided by the Espírito Santo Research Support Foundation (FAPES, Process 71524886/15).

## References

- Abati, J.; Brzezinski, C. R.; Zucareli, C.; Henning, F. A.; Alves, V. F.N.; Garcia, V. V.** (2014) Qualidade fisiológica de sementes de trigo tratadas com biorregulador em condições de restrição hídrica *Informativo ABRATES* 24, 32-36.
- Ali, Q.; Javed, M. T.; Noman, A.; Haider, M. Z.; Waseem, M.; Iqbal, N.; Waseem, M.; Shah, M. S.; Shahzad, F.; Perveen, R.** (2017) Assessment of drought tolerance in mung bean cultivars/lines as depicted by the activities of germination enzymes, seedling's antioxidative potential and nutrient acquisition *Archives of Agronomy and Soil Science* 64, 84-102.
- Almeida, J. A. S.; Azevedo, M. T. V. L. G.; Salomon, M. V.; Medina, P. F.** (2018) Water stress in germination, growth and development of coffee cultivars *Journal of Seed Science* 40, 082-089.
- Ávila, M. R.; Braccini, A. L.; Scapim, C. A.; Fagliari, J. R.; Santos, J. L.** (2007) Influência do estresse hídrico simulado com manitol na germinação de sementes e crescimento de plântulas de canola *Revista Brasileira de Sementes* 29, 98-106.
- Bewley, D.** (1997) Seed germination and dormancy *Plant Cell* 9, 1055–1066.
- Bewley, J. D.; Black, M.** (1994) *Seeds: physiology of development and germination*. Plenum Press.
- Bewley, J. D.; Bradford, K. J.; Hilhorst, H. W. M.; Nonogaki, H.** (2013) *Seeds: physiology of development, germination and dormancy*. Springer. Third Edition.
- Bove, J.; Jullien, M.; Grappin, P.** (2001) Functional genomics in the study of seed germination. *Genome Biology* 3, 1002.1–1002.5.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária** (2009). *Regras para análise de sementes*. Brasília: MAPA.
- Bruni, F. B.; Leopold, A. C.** (1992) Cytoplasmic glass formation in maize embryos *Seed Science Research* 2, 251-253.

- Cardoso, R. B.; Binotti, F. F. da S.; Cardoso, E. D.** (2012) Potencial fisiológico de sementes de crambe em função de embalagens e armazenamento *Pesquisa Agropecuária Tropical* 42, 272-278.
- Carlsson, A. S., Clayton, D., Salentijn, E., Toonen, M.** (2007) *Oil crop platforms for industrial uses*. UK: Project reports: EPOBIO Realising the Economic Potential of Sustainable Resources - Bioproducts from Non-food Crops.
- Carpiski, M.; Santos, R. F.; Primieri, C.; Silveira, L.; Bassegio, D.; Tomassoni, F.; Nakai, E. H.**(2013) Sensibilidade do crambe (*Crambe abyssinica*) a variação de nível de lençol freático *Acta Iguazu* 2, 36-45.
- Coelho, D. L. M.; Agostini, E. A. T.; Guaberto, L. M.; Machado Neto, N. B.; Custódio, C. C.** (2010) Estresse hídrico com diferentes osmóticos em sementes de feijão e expressão diferencial de proteínas durante a germinação *Acta Scientiarum Agronomy* 32, 491-499.
- Dell'Aquila, A.** (1992) Water uptake and protein synthesis in germinating wheat embryos under osmotic stress of polyethylene glycol *Annals of Botany* 69, 167-171.
- Echer, F. R.; Custódio, C. C.; Hossomi, S. T.; Dominato, J. C.; Machado Neto, N. B.** (2010) Estresse hídrico induzido por manitol em cultivares de algodão *Revista Ciência Agronômica* 41, 638-645.
- Faria, R. Q.; Teixeira, I. R.; Cunha, D. A.; Honorato, J. M.; Devilla, I. A.** (2014) Qualidade fisiológica de sementes de crambe submetidas à secagem *Revista Ciência Agronômica* 45, 453-460.
- Ferreira, D. F.** (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system *Ciência e Agrotecnologia* (UFPA), 35, 1039-1042.
- Gill, P. K.; Sharma, A. D.; Singh, P.; Bhullar, S. S.** (2003) Changes in germination, growth and soluble sugar contents of *Sorghum bicolor* (L.) Moench seeds under various abiotic stresses *Plant Growth Regulation* 40, 157–162.
- Gupta, B.; Huang, B.** (2014) Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization *International Journal of Genomics* 2014, 1-18.
- Jaleel, C. A.; Manivannan, P.; Washid, A.; Panneerselvam, R.** (2009) Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition *International Journal of Agriculture Biology* 11, 100-105.
- Jolliffe, Ian T and Jorge Cadima.** Principal component analysis: a review and recent developments (2016) *Philosophical transactions. Series A*, 374: 20150202.

- Kader, M. A.; Jutzi, S. C.** Temperature, osmotic pressure and seed treatments influence imbibition rates in sorghum seeds (2002) *Journal of Agronomy and Crop Science* 188, 286–290.
- Kappes, C.; Andrade, J. A.; Haga, K. I.; Ferreira, J. P.; Arf, M. V.** (2010) Germinação, vigor de sementes e crescimento de plântulas de milho sob condições de déficit hídrico *Scientia Agraria* 11, 125-134.
- Kibinza, S.; Vinel, D.; Côme, D.; Bailly, C.; Corbineau, F.** (2006) Sunflower seed deterioration as related to moisture content during ageing, energy metabolism and active oxygen species scavenging *Physiology of Plant* 128, 496–506.
- Machado, F. H. B.; David, A. M. S. de S.; Cangussú, L.V. S.; Figueiredo, J. C.; Amaro, H. T. R.** (2017) Physiological quality of seed and seedling performance of crambe genotypes under water stress *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 21, 175-179.
- Maguire, J. D.** (1962) Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor *Crop Science* 2, 176-77.
- Manishankar, P.; Wang, N.; Köster, P.; Alatar, A. A.; Kudla, J.** (2018) Calcium signaling during salt stress and in the regulation of ion homeostasis *Journal of Experimental Botany* 69, 4215–4226.
- Marco-Filho, J.** (2015) Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective *Scientia Agrícola* 72, 363-374.
- Marcos-Filho, J.** *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas* (2005) Piracicaba: FEALQ.
- Meyer, R. F.; Boyer, J. S.** (1981) Osmoregulation, solute distribution, and growth in soybean seedlings having low water potentials *Planta* 151, 482–489.
- Noctor, G.; Foyer, C. H.** (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control *Annual Review of Plant Biology* 49, 249–279.
- Oliveira, R. C.; Reis, A. C. C. S.; Aguiar, C. G.; Viegelli, C. A.; Primieri, C.; Tomasi, G. A.; Bleil Junior, H. G.; Andrade, M. A. A.; Viana, O. H.** (2015) *Agroindustrialização do Crambe* Cascavel: ASSOESTE.
- Paiva, E. P.; Sá, F. V. S.; Torres, S. B.; Brito, M. E. B.; Moreira, R. C. L.; Silva, L. A.** (2018) Germination and tolerance of cowpea (*Vigna unguiculata*) cultivars to water stress *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 22, 407-411.
- Patanè, C.; Saita, A.; Sortino, O.** (2013) Comparative Effects of Salt and Water Stress on Seed Germination and Early Embryo Growth in Two Cultivars of Sweet Sorghum *Journal Agronomy of Crop Science* 199, 30–37.
- Pimentel, C.** *A relação da planta com a água* (2004) RJ: Edur, Seropédica.

- Pitol, C.; Broch, D. L.; Roscoe, R.** (2010) *Tecnologia e produção: crambe*. Maracaju: Fundação MS.
- Pitol, C.; Broch, D. L.; Roscoe, R.** (2012) *Introdução e Melhoria do crambe no Brasil, Tecnologia e produção: crambe*, FMS, Ed., Fundação MS.
- R Core Team** (2018) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Le, S.; Josse, J.; Husson, F.** (2008). Facto Mine R: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software* 25, 1-18.
- Silva, A. C.; Suassuna, J. F., Melo, A. S., Costa, R. R.; Andrade, W. L.; Silva, D. C.** (2017) Salicylic acid as attenuator of drought stress on germination and initial development of sesame *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 21, 156-162.
- Silva, J. B.; Rodrigues, T. J. D.; Vieira, R. D.** (2006) Desempenho de sementes de soja submetidas a diferentes potenciais osmóticos em polietileno glicol *Ciência Rural* 36, 1634-1637.
- Silva, R. C.; Grzybowski, C. R. S.; Panobianco, M.** (2016) Vigor de sementes de milho: influência no desenvolvimento de plântulas em condições de estresse salino *Revista Ciência Agronômica* 47, 491-499.
- Viçosi, K. A.; Ferreira, A. A. S.; Oliveira, L. A. B.; Rodrigues, F.** (2017) Estresse hídrico simulado em genótipos de feijão, milho e soja *Revista de Agricultura Neotropical* 4, 36-42.
- Villela, F. A.; Doni Filho, L.; Sequeira, E. L.** (1991) Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6000 e da temperatura *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 26, 1957- 1968.
- Zhang, J.; Wang, H.; Liao, S.; Cui, K.** (2018) Appropriate ultra-low seed moisture content stabilizes the seed longevity of *Calocedrus macrolepis*, associated with changes in endogenous hormones, antioxidant enzymes, soluble sugars and unsaturated fatty acids *New Forests* 1–14.
- Zhu, J. K.** (2001) Plant salt tolerance *Trends in Plant Science* 6, 66-71.
- Zhu, J.; Kang, H.; Tan, H.; Xu, M.** (2006) Effects of drought stresses induced by polyethylene glycol on germination of *Pinus sylvestris* var. mongolica seeds from natural and plantation forests on sandy land *Journal of Forest Research* 11, 319–328.

Table 1. Degree of seed moisture of different genotypes *Crambe abyssinica* Hochst.

Genotypes <i>Crambe abyssinica</i>	Degree of seed moisture (%)
FMS Brillhante	5.65 ± 0.078 C
FMS CR 1203	5.69 ± 0.076 C
FMS CR 1307	6.36 ± 0.064 A
FMS CR 1312	5.99 ± 0.073 B
FMS CR 1326	6.11 ± 0.085 AB
CV (%)	1.13

Means followed by the same letter in the column do not differ by Tukey test at 0.001 probability level ( $\pm$ SD)

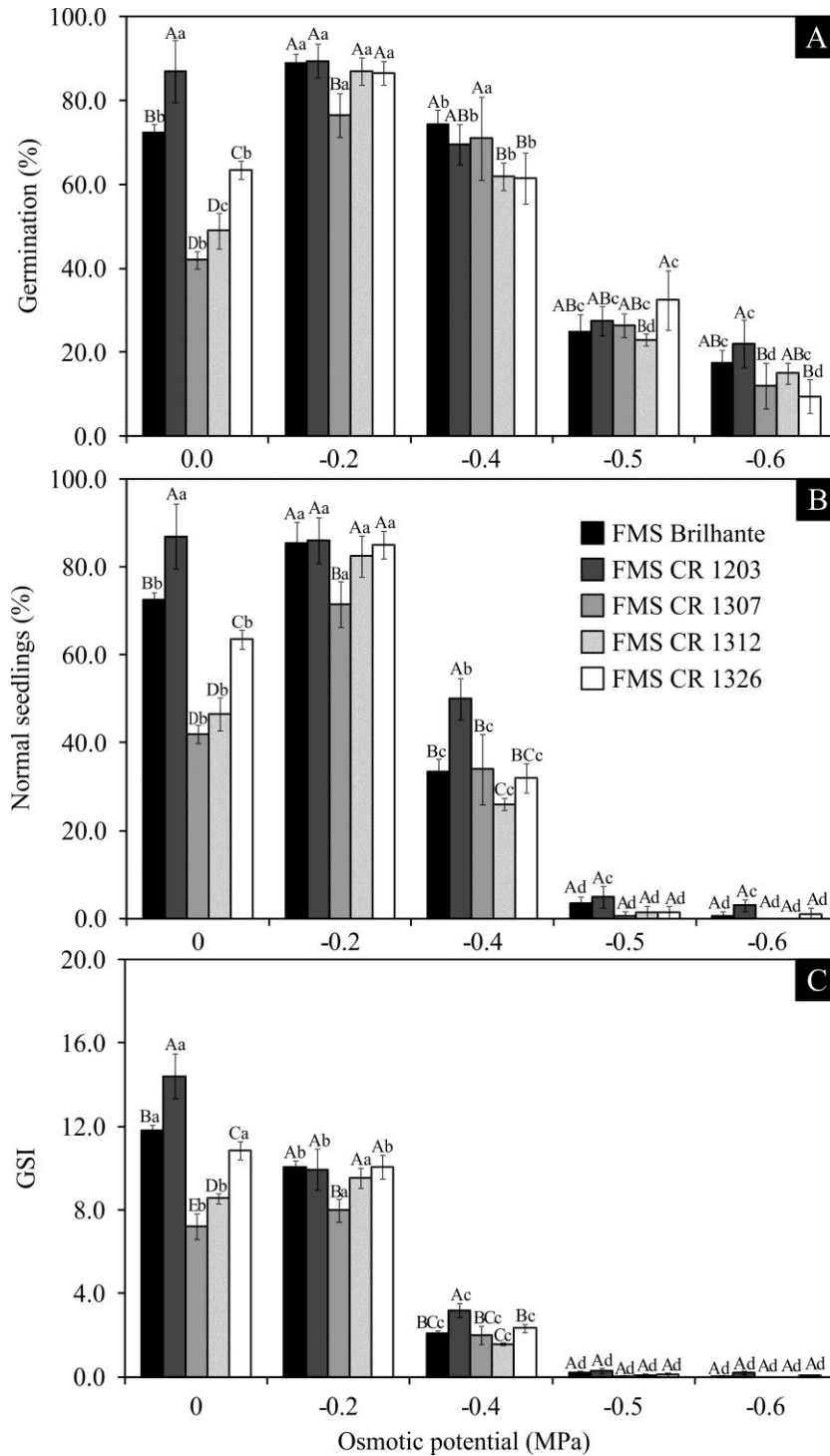


Figure 1. Germination (A), normal seedlings (B) and germination speed index – GSI (C) of *Crambe abyssinica* seeds, genotypes FMS Brillhante, FMS CR 1203, 1307, 1312 and 1326, under different osmotic potentials. SD is shown, the same letters mean no significant difference (small letter: osmotic potentials, capital letter: different genotypes) ( $p \leq 0.001$ ) ( $\pm$ SD).

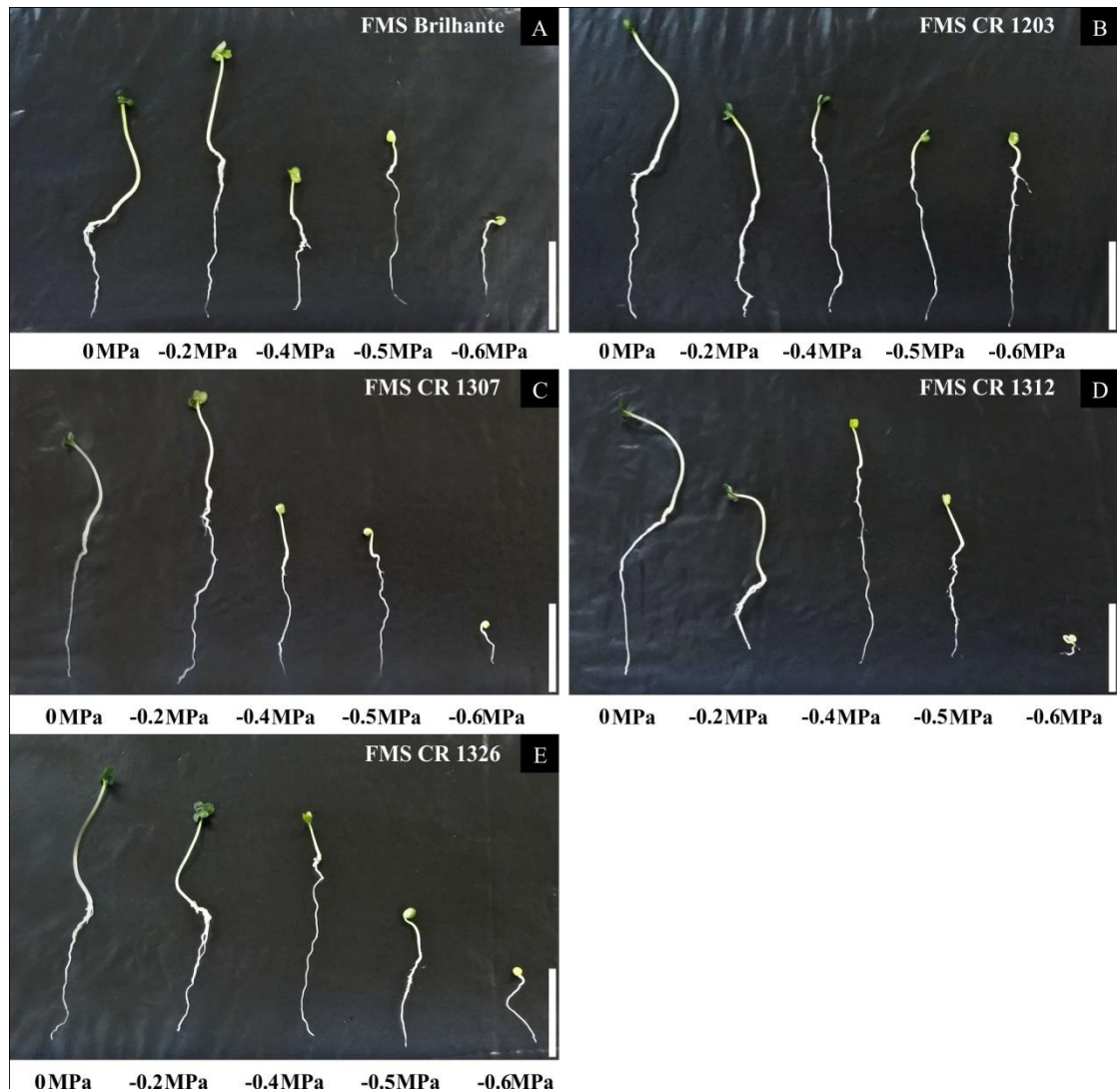


Figure 2. Seedlings of different genotypes of crambe (FMS Brillhante, FMS CR 1203, 1307, 1312 and 1326) under different osmotic potentials (0, -0.2, -0.4, -0.5 and -0.6 MPa). Bar = 1cm.

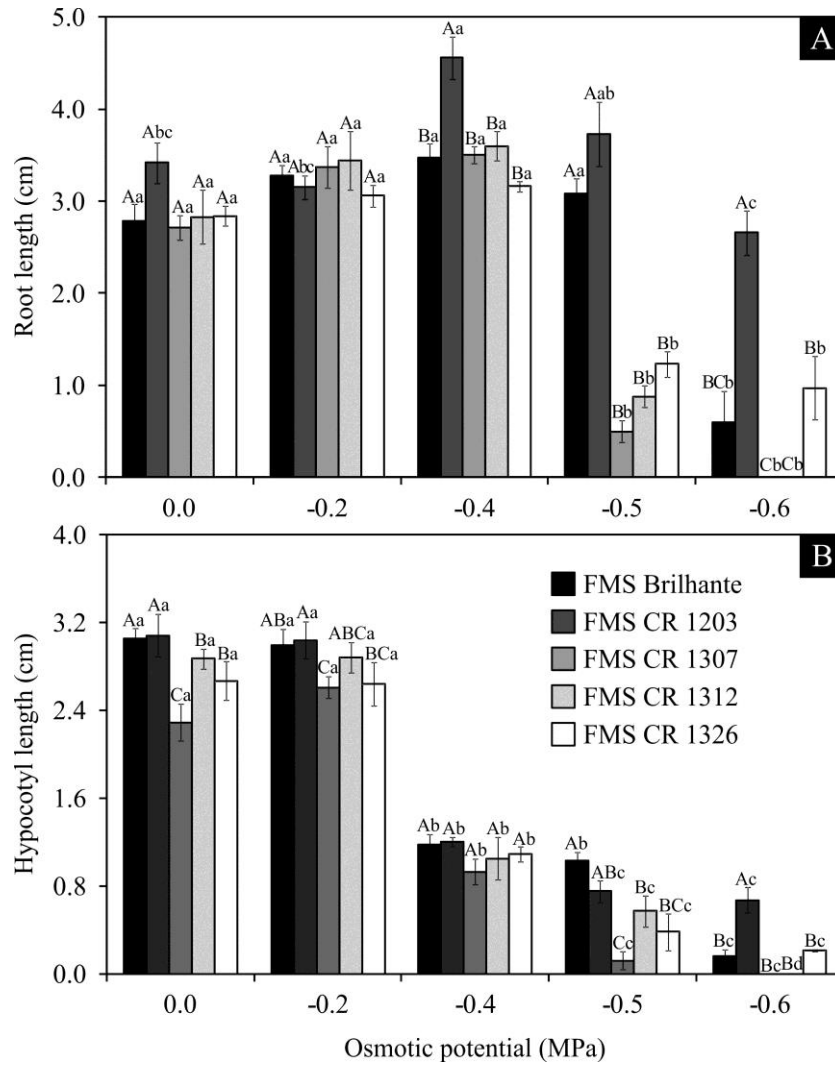


Figure 3. Root length (A) and hypocotyl length (B) of *Crambe abyssinica* Hochst. seedlings, genotypes FMS Brilhante, FMS CR 1203, 1307, 1312 and 1326, under different osmotic potentials. SD is shown, the same letters mean no significant difference (small letter: osmotic potentials, capital letter: different genotypes) ( $p \leq 0.001$ ) ( $\pm$ SD).



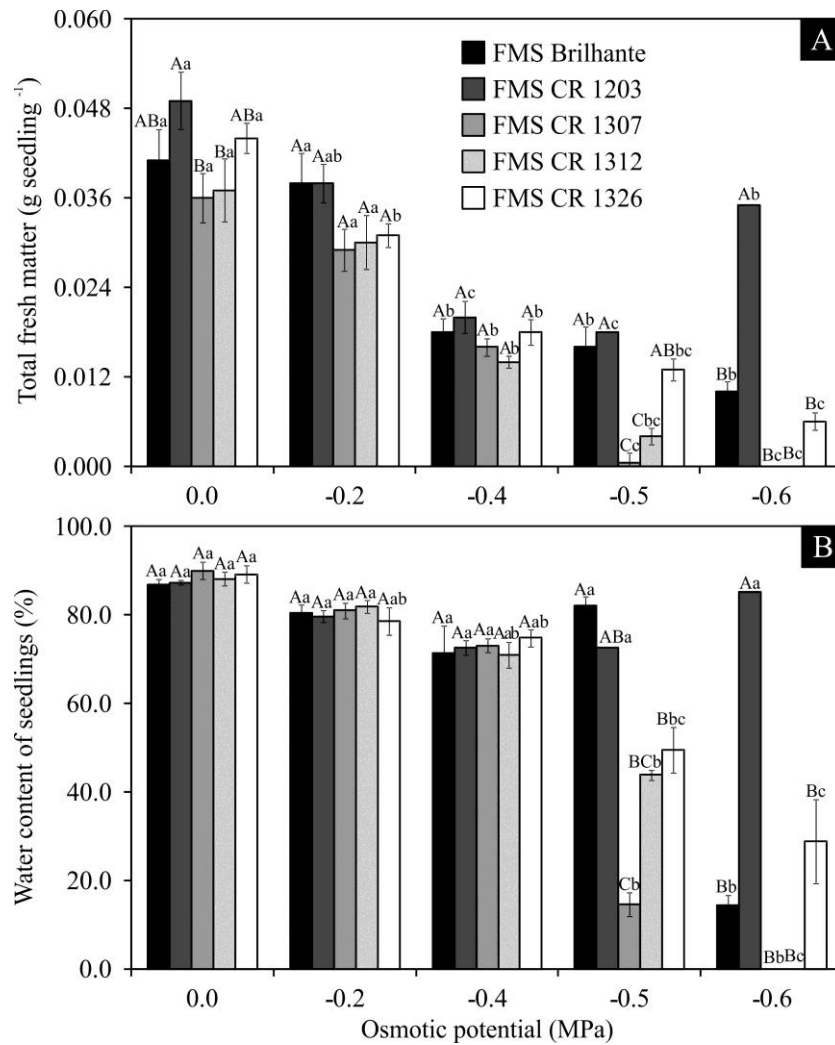


Figure 4. Total fresh matter (A) and water content of seedlings (B) of *Crambe abyssinica* Hochst. seedlings, genotypes FMS Brillhante, FMS CR 1203, 1307, 1312 and 1326, under different osmotic potentials. SD is shown, the same letters mean no significant difference (small letter: osmotic potentials, capital letter: different genotypes) ( $p \leq 0.001$ ) ( $\pm$ SD).

Table 2. Total dry matter of different genotypes *Crambe abyssinica* Hochst. under different osmotic potentials.

Osmotic potential (MPa)	Shoot dry matter (g. seedling <sup>-1</sup> )
0	0.0048 ± 0.0010 B
-0.2	0.0065 ± 0.0011 A
-0.4	0.0048 ± 0.0007 B
-0.5	0.0023 ± 0.0020 C
-0.6	0.0019 ± 0.0034 C
CV (%)	36.9
Genotypes <i>Crambe abyssinica</i>	Shoot dry matter (g. seedling <sup>-1</sup> )
FMS Brilhante	0.0047 ± 0.0031 AB
FMS CR 1203	0.0059 ± 0.0010 A
FMS CR 1307	0.0027 ± 0.0023 D
FMS CR 1312	0.0030 ± 0.0022 CD
FMS CR 1326	0.0040 ± 0.0022 BC
CV (%)	36.9

Means followed by the same letter in the column do not differ by Tukey test at 0.001 probability level ( $\pm$ SD).



**CAPITULO 2 – DIFFERENTIAL RESPONSE OF PHOTOSYSTEM II AND I  
PHOTOCHEMISTRY IN LEAVES OF TWO *Crambe abyssinica* HOCHST.  
GENOTYPES SUBMITTED TO WATER DEFICIT**

Priscila da Conceição S Braga, João Paulo R. Martins, Robson Bonomo, Raylda M. Borges,  
João VitorG. Silva and AntelmoR. Falqueto\*

Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Ciências Agrárias e Biológicas,  
CEP: 29932-540, São Mateus, ES, Brasil

\*Autor para correspondência: *\*antelmo.falqueto@ufes.br*

Periódico submetido: *Revista de Ciências Agrárias*, 05 de dezembro de 2018.

A formatação de citação, referências, tabelas e figuras  
deste capítulo seguem as instruções do periódico *Revista  
de Ciências*, que consta:  
<http://www.scielo.mec.pt/revistas/rca/pinstruc.htm>

**Abstract** -This study compared the photochemical responses of two crambe genotypes (*Crambe abyssinica* Hochst, FMS CR 1307 and 1326) to water deficit (WD) in greenhouse conditions. WD was imposed until reaching 30% soil moisture and stomatal conductance ( $g_s$ ) lower than  $10 \text{ mmol.m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . The relative water content (RWC),  $g_s$ , chlorophyll (Chl) index and Chl *a* fluorescence were measured in completely expanded leaves from the third or fourth leaf from the apex in the morning (5-9 a.m.). Under WD, higher reduction of RWC was observed in FMS CR 1326 genotype.  $g_s$  values also declined, but the Chl index increased under water suppression. Also, reductions of photochemical events were observed on the acceptor side of photosystem II (PSII) ( $\Delta V_{OP}$ ), on the energy connectivity or grouping among PSII units (L-band) and on the electrons transfer from the oxygen evolution complex-OER (K-band), with higher capacity to maintain the plastoquinone reduction ( $V_{OI} \leq 1$ ) for FMS CR 1326 genotype. In relation to response of photosystem I (PSI) to WD ( $V_{IP}$  and  $\Delta V_{IP}$ ), the better efficiency was described for FMS CR 1307 genotype. The specific energy flow values (ABS/RC,  $TR_0/RC$  and  $DI_0/RC$ ) increased ( $p \leq 0.05$ ) under WD, with higher values obtained for FMS CR 1307 genotype. The maximum quantum yield of primary photochemistry of PSII ( $\phi_{P0}$ ) and total performance index ( $PI_{total}$ ) values were reduced with WD. FMS CR 1326 genotype had better PSII photochemical performance compared to FMS CR 1307 genotype. However, FMS CR 1307 genotype showed higher protection of PSI under WD conditions.

**Keywords:** OJIP curves, JIP-test, photochemical tolerance, Chl*a* fluorescence

**Resumo** - Este estudo comparou as respostas fotoquímicas de dois genótipos de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst, FMS CR 1307 e 1326) ao déficit hídrico (DH) em condições de casa de vegetação. O DH foi imposto até atingir 30% de umidade do solo e condutância estomática ( $g_s$ ) menor que  $10 \text{ mmol.m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . O conteúdo relativo de água (CRA),  $g_s$ , índice de clorofila e fluorescência da clorofila *a* foram medidos em folhas completamente expandidas a partir da terceira ou quarta folha a partir do ápice da manhã (5-9 a.m.). Sob DH, maior redução de CRA foi observada no genótipo FMS CR 1326. Os valores de  $g_s$  também diminuíram, mas o índice de clorofila aumentou sob supressão de água. Além disso, foram observadas reduções de eventos fotoquímicos no lado do acepdor do fotossistema II (FSII) ( $\Delta V_{OP}$ ), na conectividade de energia ou agrupamento entre unidades FSII (banda L) e na transferência de elétrons do complexo de evolução de oxigênio - CEO (band K), com maior capacidade de manter a redução da plastoquinona ( $V_{OI} \leq 1$ ) para o genótipo FMS CR 1326.

Em relação à resposta do fotossistema I (FSI) ao DH ( $V_{IP}$  e  $\Delta V_{IP}$ ), a melhor eficiência foi descrita para o genótipo FMS CR 1307. Os valores do fluxo de energia específico (ABS / RC,  $TR_0$  / RC e  $DI_0$  / RC) aumentaram ( $p \leq 0,05$ ) sob DH, com maiores valores obtidos para o genótipo FMS CR 1307. O rendimento quântico máximo de fotoquímica primária dos valores de FSII ( $\phi_{P0}$ ) e índice de desempenho total ( $PI_{total}$ ) foi reduzido com o DH. O genótipo FMS CR 1326 apresentou melhor desempenho fotoquímico do FSII em relação ao genótipo FMS CR 1307. No entanto, o genótipo FMS CR 1307 mostrou maior proteção do FSI sob condições DH.

*Palavras-chave:* curva OJIP, fluorescência da clorofila *a*, teste JIP, tolerância fotoquímica

**Abbreviations-** ABS/RC-absorption flux (of antenna Chl) per RC; Chl- Chlorophyll;  $DI_0$ /RC- dissipation flux per RC; DM- dry mass;  $ET_0$ /RC- electron transport flux (further than  $Q_A^-$ ) per RC;  $F_0$ -  $F_{20}$   $\mu$ s, minimum fluorescence, when all PSII RCs are open;  $F_2$ -(0.1ms) and  $F_3$  (0.3 ms), fluorescence intensity at 0.1 and 0.3 ms, respectively;  $F_4$ -(2 ms);  $F_5$ -(30 ms), fluorescence intensity at the J-step (2 ms) and the I-step (30 ms), respectively; FM- fresh mass;  $F_m$ - maximum fluorescence, when all PSII RCs are closed;  $g_s$ - stomatal conductance; OEC- oxygen-evolving complex;  $P_{680}$ -primary electron donor of PSII;  $P_{700}$ - primary electron donor of PSI;  $PI_{total}$ -performance index; PQ- plastoquinone;  $PQH_2$ - plasto-hydroquinone; PSI- photosystem I; PSII- photosystem II;  $Q_A$  and  $Q_B$ - quinone A and B, respectively; RC- reaction centre; RWC-leaf relative water content; TM- turgid mass;  $TR_0$ /RC- Trapping flux per RC;  $V_{IP}$  and  $\Delta V_{IP}$ - variable fluorescence between steps I (30 ms) and P (300 ms);  $V_{OI}$ ,  $V_{OI \leq 1}$  and  $V_{OI \geq 1}$ - variable fluorescence between steps O (2 ms) and I (30 ms), respectively;  $V_{OJ}$  or K-band- variable fluorescence between steps O (0.02 ms) and J (2 ms);  $V_{OK}$  or L-band- variable fluorescence between steps O (0.02 ms) and K (0.3 ms);  $V_{OP}$ - variable fluorescence between steps O (0.02 ms) and P (300 ms); WD- water deficit;  $\Delta V$ - difference kinetic;  $\phi_{P0}$ - maximum quantum yield of primary PSII photochemistry.

## INTRODUCTION

Water deficit (WD) is one of the most important and complex factors that restrict the development of plants and productivity of crops (Lang *et al.*, 2018). However, tolerant plants have developed many strategies to maintain growth and development under low water

availability (Hummel *et al.*, 2010). Drought tolerance is defined as the capacity to live, grow and produce satisfactorily under limited water availability or periodic deficiency of rain water (Xiong *et al.*, 2006). Nevertheless, even in drought-tolerant plants, the WD can negatively affect growth and other physiological processes (Wang *et al.*, 2016, Covre *et al.*, 2016).

It is possible to differentiate between tolerant and susceptible species/cultivars/genotypes to drought using Chl *a* fluorescence method, which reveals the functional state or efficiency of the photosynthetic apparatus (Metha *et al.*, 2010, Falqueto *et al.*, 2017, Kalaji *et al.*, 2017). Under WD, Chl *a* fluorescence analysis has shown positive L- and K-band values for two *Zea mays* L. cultivars, SD609 and ZD958 (Zhang *et al.*, 2015), two *Crambe abyssinica* Hochst. genotypes, FMS Brilhante and FMS CR 1101 (Martins *et al.*, 2017), and two *Hevea brasiliensis* L. clones, RRIM600 and FX3864 (Falqueto *et al.*, 2017), revealing a decrease in energy connectivity between PSII units and impaired OEC performance.

*Crambe* (*Crambe abyssinica* Hochst, Brassicaceae) is an annual plant native from East Africa, particularly Ethiopia. The grains are produced only for industrial purposes, to extract valuable oil and other substances (e.g., erucic acid) which have applications such as manufacture of plastics, lubricants and biodiesel (Carlsson *et al.*, 2007). Because these applications do not compete with oilseeds used for human nutrition, and because the plants occupy lands that are arable in the winter (as a second crop), *crambe* has become an innovative crop in the Brazilian agribusiness sector, with particular potential to supply vegetable insulating oil for transformers (Oliveira *et al.*, 2015). New *crambe* genotypes have been tested in order to expand the crop and increase the yield in Brazil (Pitol *et al.*, 2012). Also, the FMS CR 1307 *crambe* genotype is one of those being considered as a candidate for pre-launch, while FMS CR 1326 genotype is still under analysis by the Mato Grosso do Sul

Foundation for Research and Diffusion of Agricultural Technologies (Fundação MS)(Oliveira *et al.*, 2015).

Considering that water resources are limited and that agriculture consumes large amounts of water, demands on water resources can be mitigated by selection of species/genotypes of plants that are tolerant to WD. Thus, we hypothesized that different crambe genotypes may present differentiated photochemical responses under WD condition. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effects of WD on the PSII and PSI photochemistry in leaves of two crambe genotypes (FMS CR 1307 and 1326) identifying the action site of stress on the apparatus photosynthetic.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Plant grown conditions and treatments*

Seeds of *Crambe abyssinica* Hochst., genotypes FMS CR 1307 and FMS CR 1326 were previously disinfested with ethanol 70% for 2 min., 1% sodium hypochlorite (v/v) for 20 min. and Ridomil ® fungicide for 10 min., followed by triple lavage with autoclaved distilled water and placed to germinate in pots of 5.5 L (15 seeds per pot) filled with soil (75.5% sand, 17.2% clay and 5.2% silt). Previously, chemical analyze of soil was made in order to correct nutrient and pH, following the recommendations of the crop (Oliveira *et al.*, 2015). Thirty grams of single super phosphate were added per pot 3 times during the experiment. In addition, applications of insecticides (Evidence®) and fungicides (Ridomil®) were made according to the culture manual. After 20 days, the seedlings were thinned to one per pot.

All plants were watered daily in order to maintain the soil humidity closed to around 80% of field capacity, e.g., 0.20 m<sup>3</sup>/m<sup>3</sup> until 50 days old, when the plants were split in two



groups: for each genotype, nine plants were maintained with daily irrigation (used as control) and the others nine were subjected to progressive drought by withholding watering. When the soil humidity level reached 30% (around  $0.06 \text{ m}^3/\text{m}^3$ ) and the stomatal conductance reached values lowest than  $10 \text{ mmol m}^2.\text{s}^{-1}$  (Martins *et al.*, 2017), the physiological analyses were made. All sampling and measurements were conducted between 5 and 9 a.m. using completely expanded leaves from the third or fourth leaf from the apex.

#### *Leaf relative water content (RWC), stomatal conductance ( $g_s$ ) and Chl index*

Leaf relative water content (RWC), stomatal conductance ( $g_s$ ) and Chl index were measured in three, nine and eleven plants/treatment randomly selected, respectively. To RWC measurements, it was extracted five leaf discs ( $0.78 \text{ cm}^2$ ), which were immediately weighted together obtaining the fresh mass (FM). After, the turgid mass (TM) was obtained after the hydration of the leaf discs through of submersion for 24 hours in Petri dishes contend distilled water. The dry mass (DM) was obtained after drying the leaf discs during 72 h under  $65^\circ\text{C}$ . RWC was calculated according to the following expression and the results expressed in percentage (%):  $\text{RWC} = [(\text{FM} - \text{DM}) / (\text{TM} - \text{DM})] \times 100$  (Barrs *et al.*, 1962).  $g_s$  and the Chl index were measured using a leaf porometer (SC-1Leaf Porometer, Decagon devices) and a ClorofiLOG, model CFL 1030, respectively.  $g_s$  was measured on the abaxial leaf surface.

#### *Chla fluorescence: OJIP transientes and JIP-test*

Fluorescence signals were registered using a Plant Efficiency Analyzer (Handy-PEA, Hansatech, King's Lynn, Northfolk, England). The measurements were made in five plants/treatment in leaves dark pre-adapted for 20 minutes using leaf clips (Hansatech, UK).

The fast fluorescence kinetics ( $F_0$  to  $F_p$ ) was recorded from 10  $\mu$ s to 1 s after the application of saturated light flash (650 nm) with intensity reaching 3000  $\mu$ mol (photons) $m^{-2}s^{-1}$ . The fluorescence intensity at 20  $\mu$ s (considered as  $F_0$ ), 100  $\mu$ s, 300  $\mu$ s, 2 ms ( $F_J$ ), 30 ms ( $F_I$ ), and maximum fluorescence or  $F_m$  were collected and used to obtain the parameters from JIP-test (Strasser *et al.*, 2007). OJIP curves were normalized according to Yusuf *et al.* (2010).

### *Statistical analysis*

The experiment was performed following a completely randomized design, in factorial scheme, with two water treatment [daily irrigated (control) and non-irrigated plants (WD)] and two crambe genotypes (FMS CR 1307 and 1326), with nine plants/treatment. All statistical analysis was conducted using the statistical software Sisvar version 5.6. Significant differences between the treatments were evaluated using Analysis of Variance (ANOVA) and Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).

## **RESULTS**

### *RWC, $g_s$ and Chl index*

Significant differences ( $p \leq 0.001$ ) of RWC were observed as a function of WD and crambe genotypes (Figure 1). The RWC values obtained for plants irrigated daily (control) were 65.7 and 62.7% for the genotypes FMS CR 1307 and 1326, respectively. After water suppression, reduced values of RWC were observed in both crambe genotype compared to the control plants, with the lowest RWC values ( $p \leq 0.001$ ) obtained for the FMS CR 1326 (25.9%) in comparison to the genotype FMS CR 1307 (34.9%).

Reductions in  $g_s$  were also observed when crambe genotypes were submitted to WD (152.3 to 7.7  $\text{mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ;  $p \leq 0.001$ ). No significant differences ( $p > 0.05$ ) in  $g_s$  were observed between the crambe genotypes (Figure 2A). The Chl index  $a$  and  $b$  increased significantly ( $p \leq 0.001$ ) when the plants were submitted to WD (Chl  $a$ : from 36.9 to 40.05 and Chl  $b$ : from 15.8 to 23.7), but no significant difference ( $p > 0.05$ ) was observed between crambe genotypes (Figure 2B).

### *OJIP Chl a fluorescence and normalizations*

To evaluate the polyphasic behavior of OJIP curves for the photochemical events reflected in the O-J, J-I e I-P phases, the Chl  $a$  fluorescence data were double normalized between  $F_0$  and  $F_m$  as  $V_{OP} = (F_t - F_0) / (F_m - F_0)$  and showed as the difference kinetic,  $\Delta V_{OP}$  [ $\Delta V_{OP} = V_{OP(\text{treatment})} - V_{OP(\text{control})}$ ] (Redilhas *et al.*, 2011). Under WD, positive amplitudes of  $\Delta V_{OP}$  were obtained in both crambe genotypes. However, higher positive amplitude ( $\approx 0.08$ ) was obtained in FMS CR 1307 genotype compared to FMS CR 1326 genotype ( $\Delta V_{OP} \approx 0.06$ ) (Figure 3A).

The relative fluorescence between the O and K-steps (obtained at 0.02 and 300  $\mu\text{s}$ , respectively)  $V_{OK} = (F_t - F_0) / (F_K - F_0)$  and between O and J-steps (obtained at 0.02  $\mu\text{s}$  and 2 ms, respectively)  $V_{OJ} = (F_t - F_0) / (F_J - F_0)$  were normalized and showed as the kinetics difference  $\Delta V_{OK} = V_{OK(\text{treatment})} - V_{OK(\text{control})}$  and  $\Delta V_{OJ} = V_{OJ(\text{treatment})} - V_{OJ(\text{control})}$ , respectively. The kinetic difference  $\Delta V_{OK}$  and  $\Delta V_{OJ}$  shows the L and K-band visible, respectively. In this study, both crambe genotype evaluated showed L-band (obtained at 0.15 ms) and K-band (obtained at 0.3 ms) with positive amplitudes after submission to WD (Figure 3B and 3C). The maximum values of K-band were obtained in the FMS CR 1307 crambe genotype (0.13) followed by the

FMS CR 1326 genotype (0.06). Similarly, higher positive amplitude of L-band was observed in FMS CR 1307 crambe genotype compared to FMS CR 1326 (0.19 and 0.12, respectively).

To evaluate the O-I phase, occurring between 0.02 and 30 ms, it was utilized the normalizations  $V_{OI}=(F_t-F_0)/(F_I-F_0)$  and the kinetic difference  $\Delta V_{OI}=V_{OI(treatment)}-V_{OI(control)}$ , revealing us the O-I phase in  $V_{OI}\leq 1$  (Strasser *et al.*, 2007). Higher  $V_{OI}\leq 1$  was observed in FMS CR 1307 crambe genotype (Figure 3D). In addition, the I-P phase was evaluated as  $V_{OI}\geq 1$  and  $V_{IP}$ .  $V_{OI}\geq 1$  was plotted from 30 until 300 ms when the fluorescence data were normalized between the O-I phase (Figure 4A). In the control plants, higher  $V_{OI}\geq 1$  (1.25) was obtained in FMS CR 1326 genotype compared to FMS CR 1307 genotype (1.23). However, under WD, reductions of  $V_{OI}\geq 1$  were observed in both crambe genotypes evaluated. FMS CR 1326 genotype showed higher  $V_{OI}\geq 1$  values (1.4) compared to FMS CR 1307 crambe genotype (1.36).

The normalization  $V_{IP}=(F_t-F_I)/(F_m-F_I)$  and the kinetic difference  $\Delta V_{IP}=V_{IP(treatment)}-V_{IP(control)}$  were plotted in logarithmic scale between 30 and 180 ms (Figure 4B and 4C, respectively). Considering the Michaelis-Menten equation, in which the inverse of time to attain  $V_{IP} = 0.5$  is an estimate of the global reduction rate of the PSI electron acceptors (Redilhas *et al.*, 2011), the  $V_{IP}$  data showed higher velocity constant to the FMS CR 1326 compared to FMS CR 1307 crambe genotype (0.80 and 0.54, respectively). This result was better elucidated by analyzing the kinetics difference  $\Delta V_{IP}$  (Figure 4C) in which the negative amplitude of the curve was higher in FMS CR 1326 genotype (-0.08).

### *JIP-test*

The specific energy fluxes varied significantly ( $p\leq 0.05$ ) with WD and crambe genotypes (Figure 5). But, for the  $\phi_{P0}$  and  $PI_{total}$ , this variation occurred independently to WD

treatment ( $p \leq 0.001$ ) (Figure 6A and 6B). The specific energy fluxes (ABS/RC, TR<sub>0</sub>/RC and DI<sub>0</sub>/RC) values increased ( $p \leq 0.05$ ) in those plants submitted to WD, i.e., 3.26, 2.42 and 0.84 to ABS/RC, TR<sub>0</sub>/RC and DI<sub>0</sub>/RC, respectively, to FMS CR 1307 genotype and 2.74, 2.15 and 0.58, respectively, to FMS CR 1326 crambe genotype. To ET<sub>0</sub>/RC, no difference ( $p > 0.05$ ) was observed between treatment and crambe genotypes (Figure 5). Also, WD reduced the maximum quantum yield of primary photochemistry of PSII ( $\phi_{P0}$ ) and the performance index (PI<sub>total</sub>) in relation to control plants [from 0.86 to 0.76 and from 35.33 to 9.75, respectively ( $p \leq 0.001$ )], independently to crambe genotype evaluated (Figure 6A and 6B).

## DISCUSSION

Water deficit is a factor that limits the establishment and growth of plants, causing biochemical, physiological, anatomical and morphological damages (Lang *et al.*, 2018). In this study, we evaluated the effects of WD on the physiological performance of two crambe genotypes (FMS CR 1307 and 1326). The differences between these two genotypes were analyzed using Chl *a* fluorescence,  $g_s$  and Chl index measurements. As already mentioned, Chl *a* fluorescence method is widely used, since it can reveal the functional state of the photosynthetic apparatus, and, thus, act as an indicator of susceptibility/tolerance to stress (Redilhas *et al.*, 2011, Zangh *et al.*, 2015, Falqueto *et al.*, 2017, Martins *et al.*, 2017). The results obtained in this study showed distinct physiological responses of the two crambe genotypes to WD.

The ability of plants to tolerate water suppression can be attributed to various mechanisms, including the efficiency in maintaining a high RWC and stomatal closure (Oukarroum *et al.*, 2015), which reduces water loss by transpiration (Lawson *et al.*, 2014). The two crambe genotypes evaluated in this study showed different RWC values (Figure 1).

Under well-irrigated conditions, FMS CR 1326 crambe genotype plants showed RWC values 4.5% lower compared to FMS CR 1307 genotype, and under WD, the reduction was approximately 25.7%. This difference in RWC between the genotypes can be related to the different capacities for conducting water through the xylem in response to a specific hydraulic signal (Sinclair *et al.*, 2008), possibly acquired via natural selection, since the two crambe genotypes studied are originated from natural crosses between different genotypes of the cultivar FMS Brillhante. Genotypes showing low RWC values are more prone to damaging effects of WD (Boaretto *et al.*, 2014).

Stomatal closure generally restricts the internal diffusion of CO<sub>2</sub>, which is apparently a limitation when plants are subjected to water suppression (Guha *et al.*, 2013). Under water suppression, both crambe genotypes presented reductions of  $g_s$  (Figure 2A). Thus, we can suggest that the reduction of  $g_s$  in the two crambe genotypes might have mainly restricted the supply of CO<sub>2</sub> to the carboxylation sites.

The crambe genotypes subjected to WD showed increases in the Chl index (non-dimensional unit) (Figure 2B). The Chl index values are associated with the Chl density. Thus, the results obtained in this study indicate increases in the Chl density in the plants submitted to WD. In this condition, the leaf thickness can reduce which, associated with the RWC and cell volume reductions results in more Chl per unit of area (Arunyanark *et al.*, 2008).

The normalizations of the Chl *a* fluorescence allows better evaluation of the polyphasic behavior of OJIP curves. The analysis of  $\Delta V_{OP}$  corresponds to the primary photochemical events of photosynthesis of the acceptor side of PSII (Strasser *et al.*, 2007). In this study, the two crambe genotypes submitted to WD showed positive amplitudes of  $\Delta V_{OP}$  (Figure 3A). The higher positive amplitude of  $\Delta V_{OP}$  obtained in FMS CR 1307 genotype

under WD suggests lower photochemical activity, varying since the inhibition of  $Q_A^-$  re-oxidation until the intersystem reduction events.

The energetic connectivity or grouping among the PSII units is verified analyzing the L-band (Oukarroum *et al.*, 2015). Positive values of L-band indicate low energy connectivity. K-band refers to the transfer of electrons from the oxygen evolution complex (OEC) to the  $P_{680}$  reaction center. Therefore, positive values indicate reduction of the transfer of electrons to  $P_{680}$  (Yusuf *et al.*, 2010). In this study, the higher positive amplitude of L-band observed in FMS CR 1307 crambe genotype suggest less stability of the system and/or reduction of active reaction centers associated to PSII (Sharma *et al.*, 2014). This result indicates that FMS CR 1326 maintained better utilization of excitation energy and greater stability of the system when submitted to water suppression (Strasser *et al.*, 2007, Oukarroum *et al.*, 2015). The increased connectivity can be considered a partially protective mechanism, directing more excitation energy to photochemistry (Redilhas *et al.*, 2011). Therefore, our results suggest that FMS CR 1326 genotype was more stable under water suppression. Similarly, the higher positive amplitude of K-band observed in FMS CR 1307 crambe genotype suggests reduced transference of electrons from the OEC to the  $P_{680}$  reaction center. Positive amplitudes of K-band indicate activation of some defense mechanisms, such as accumulation of glycinebetaine, proline and sugars (De Ronde *et al.*, 2004).

In this study, the positive amplitude of the O-I phase ( $V_{OI} \leq 1$ ) was observed in the two crambe genotypes, with higher positive amplitude obtained in FMS CR 1307 crambe genotype (Figure 3D). This result is an indicative of low capacity to maintain the reduction of PQ, since the O-I phase permits us evaluating the sequence of photochemical events from the energy capture, which starting in PSII, until reduction of PQ (Yusuf *et al.*, 2010). All these results indicate that the FMS CR 1326 crambe genotype is more efficient in re-oxidize  $Q_A^-$  and in exchange energy between the PSII units. Furthermore, the low damage on the OEC (K-

band) as well as the higher capacity to maintain the reduction of PQ described in FMS CR 1326 give us strong evidence of its higher photochemical tolerance to WD in relation to FMS CR 1307.

In addition, the WD resulted in decreased  $V_{OI} \geq 1$  (Figure 4A). The I-P phase (Figure 4) reflects the events related to the electron flow from  $PQH_2^-$  to the final PSI acceptors. Thus, the re-reduction of plastocyanin and  $P_{700}^+$  in PSI events can be evaluated (Chen *et al.*, 2014). In this study, the lower  $V_{OI} \geq 1$  values obtained in FMS CR 1307 crambe genotype indicate low electron flux reaching the final PSI acceptors. These variations in the amplitude of  $V_{OI} \geq 1$  curves have been described for plants submitted to drought stress.

The inverse of the time to reach  $V_{IP} = 0.5$  provides an estimate of the overall reduction rate of the final electron acceptors of PSI (Yusuf *et al.*, 2010). In turn,  $\Delta V_{IP}$  reflects the size of the final electron acceptors *pool* of PSI, i.e., the efficiency of the electron transport through of PSI to reduce the final acceptors beyond PSI. Our results indicate lower efficiency of electrons transference to the acceptor side of PSI (reduction rate), and smaller size of the final electron acceptors *pool* of PSI in both crambe genotypes studied under water suppression, with a stronger effect in FMS CR 1326 crambe genotype (Figure 4B and 4C).

The PSI is still not well understood. Under suppression of the linear electrons transport in PSII, suggest that the cyclic electrons transport (CET) probably compensate the loss of reduction capacity of PSI (Wang *et al.*, 2016). The activation of CET is a common photoprotective response to various stress factors, which prevents the formation of ROS (Oukarroum *et al.*, 2015, Wang *et al.*, 2016). In this study, the two crambe genotypes probably increased the CET to improve the metabolic energy (ATP) under WD, considering the suppression of electron transport in PSII. These low efficiency of the electrons transport to PSI have been commonly described for plants submitted to water suppression (Redilhas *et al.*, 2011).



The results obtained in this study indicate a possible correlation between the higher electron flow suppression in PSII (evaluated through of  $\Delta V_{OP}$ , K-band and L-band) and the increased cyclic electron flow ( $\Delta V_{IP}$ ) providing higher protection to FMS CR 1307, since this crambe genotype showed higher photochemical loss in PSII under WD. The increase of  $\Delta V_{IP}$  grown under water deficit suggest suppression probably was due to the occurrence of CET, which contributed to increase of ATP production under stress conditions, because not all the electrons from reduced ferredoxin ( $Fd_{red}$ ) are directed to formation of NADPH by ferredoxin-NADP reductase. Instead, the electrons are transferred to  $O_2$  through the Mehler reaction, resulting in ROS formation (Campos *et al.* 2014).

Furthermore, all results showed that the water suppression caused damages on the electron transport chain, from the donor side of PSII (i.g., OEC) to the final acceptors of PSI, provided by the positive amplitudes of K-band and corroborated by  $V_{IP}$  and  $\Delta V_{IP}$  normalizations. This behavior was reflected on the parameters derived from the OJIP curve, i.e., the JIP-test (specific energy flows, quantum yield and total performance index (See Figure 5 and 6).

In this study, WD reduced the efficiency of photochemical events in both crambe genotypes. The specific energy flows values increased in both genotypes, with stronger effect in FMS CR 1307 (18.6, 12.5 and 44.8% for  $ABS/RC$ ,  $TR_0/RC$  and  $DI_0/RC$ , respectively) compared to FMS CR 1326 crambe genotype (Figure 5). The increased  $ABS/RC$  values resulted in an increment of the trapping and dissipation energy flow per RC ( $TR_0/RC$  and  $DI_0/RC$ , respectively). These results indicate that some RCs were inactivated and the efficiency per RC was enhanced (Meng *et al.* 2016). The inactivation of RC (decrease of non-reduced  $Q_A$  or heat dissipation) can be an indicative of susceptibility to photoinhibition, i.e., the inactivation of RC is considered to be a down-regulation mechanism to dissipate the excess of energy absorbed (Franić *et al.*, 2017). Furthermore, increases of  $TR_0/RC$  can

indicate impairment of the OEC, corroborated by positive amplitudes of K-band, which showed higher amplitude in FMS CR 1307 crambe genotype. The increase of ABS/RC and TR<sub>0</sub>/RC did not result in increased transport flow (ET<sub>0</sub>/RC) values, but caused an increase of DI<sub>0</sub>/RC values, which implies in higher loss of excitation energy as heat.

The maximum quantum yield of primary photochemistry of PSII ( $\phi_{P0}$ ) values were reduced in the crambe genotypes submitted to WD (Figure 6). Reductions of  $\phi_{P0}$  is usually related to degradation of the polypeptide D1, which results in increased number of inactive RCs associated to PSII (Yusuf *et al.*, 2010). PI<sub>total</sub> is considered one of the most sensitive parameters of the JIP-test. PI<sub>total</sub> measures the performance up to the final electron acceptors of PSI (Yusuf *et al.*, 2010, Redilhas *et al.*, 2011), because it represents the efficiency of the flow of energy in the photosynthetic transport chain (Yusuf *et al.*, 2010). In our study, PI<sub>total</sub> values declined with WD in both genotypes (Figure 6B).

## CONCLUSIONS

The crambe genotypes showed different photochemical responses to WD. Although RWC values were lower in FMS CR 1326 crambe genotype, the Chl *a* fluorescence transient kinetics ( $\Delta V_{OP}$ , L-band, K-band and  $\Delta V_{O\leq 1}$ ) and the specific energy fluxes (ABS/RC, TR<sub>0</sub>/RC and DI<sub>0</sub>/RC) showed that the FMS CR 1326 crambe genotype was able to maintain higher photochemical efficiency of PSII, indicating higher advantage of this crambe genotype in terms of both stability and efficiency to use the excitation energy under water suppression. However, the results showed that the FMS CR 1307 genotype have higher FSI photoprotection because of it lower  $\Delta V_{IP}$  negative amplitudes.

## ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful to FAPES – Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo for the financial support and scholarship. We are also thankful to Fundação MS (MS Foundation) for providing the necessary plant material and technical support during the study.

## REFERENCES

- Arunyanark,A.; Jogloy, S.; Akkasaeng, C.; Vorasoot, N.; Kesmala, T.; Nageswara, Rao R. C.; Wright, G.C. & Patanothai, A. (2008) - Chlorophyll stability is an indicator of drought tolerance in peanut. *Journal Agronomy and Crop Science*, vol.194, p. 113-125. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2008.00299.x>.
- Barrs, H.D. & Weatherley, P.E. (1962) - A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian Journal of Biological Sciences*, vol.15, p.413-428. <https://doi.org/10.1071/BI9620413>.
- Boaretto, L.F.; Carvalho, G.; Borgo, L.; Creste, S.; Landell, M.G.A.; Mazzafera, P. & Azevedo, R.A. (2014) - Water stress reveals differential antioxidant responses of tolerant and non-tolerant sugarcane genotypes. *Plant Physiology and Biochemistry*, vol.74, p. 165-175. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.11.016>.
- Campos, H.; Trejo, C. & Peña-Valdivia, C.B. (2014) - Photosynthetic acclimation to drought stress in *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck seedlings is largely dependent on thermal dissipation and enhanced electron flux to photosystem I. *Photosynthesis Research*, vol.122, p. 23-39. <https://doi.org/10.1007/s11120-014-0008-6>.
- Carlsson, A.S.; Clayton, D.; Salentijn, E. & Toonen, M. (2007) - *Oil crop platforms for industrial uses*. New York, CPL Press Science Publisher, 146 p.

- Chen, S.; Strasser, R.J. & Qiang, S. (2014) - *In vivo* assessment of effect of phytotoxin tenuazonic acid on PSII reaction centers. *Plant Physiology and Biochemistry*, vol.84, p.10--21. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.09.004>.
- Covre, A.M.; Partelli, F.L.; Bonomo, R.; Braun, H. & Ronchi, C.P. (2016) - Vegetative growth of Conilon coffee plants under two water conditions in the Atlantic region of Bahia State, Brazil. *Acta Scientiarum Agronomy*, vol.38, p. 535-545. <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v38i4.30627>.
- De Ronde, J.A.; Cress, W.A.; Kruger, G.H.J.; Strasser, R.J. & Van Staden, J. (2004) - Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an *Arabidopsis* P5CR gene, during heat and drought stress. *Journal of Plant Physiology*, vol.161, p. 1211-1224. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.01.014>.
- Falqueto, A.R.; Júnior, R.A.da S., Gomes, M.T.G.; Martins, J.P.R.; Silva, D.M. & Partelli, F.L. (2017) - Effects of drought stress on chlorophyll *a* fluorescence in two rubber tree clones. *Scientia Horticulturae*, vol.224, p.238-243. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.06.019>.
- Franić, M.; Galić, V.; Mazur, M. & Šimić, D. (2017) - Effects of excess cadmium in soil on JIP-test parameters, hydrogen peroxide content and antioxidant activity in two maize inbreds and their hybrid. *Photosynthetica*, vol.55, p.1-10. <https://doi.org/10.1007/s11099-017-0710-7>.
- Guha, A.; Sengupta, D. & Reddy, A.R. (2013) - Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence kinetics and leaf protein analyses to track dynamics of photosynthetic performance in mulberry during progressive drought. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol.119, p. 71-83. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2012.12.006>.
- Hummel, I.; Pantin, F.; Sulpice, R.; Piques, M.; Rolland, G.; Dauzat, M.; Christophe, A.; Pervert, M.; Bouteillé, M.; Stitt, M.; Gibon, Y. & Muller, B. (2010) - *Arabidopsis* plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: an integrated

perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis. *Plant Physiology*, vol. 154, p. 357-372. <https://doi.org/10.1104/pp.110.157008>.

Kalaji, H.M.; Račková, L.; Paganová, V.; Swoczyna, T.; Rusinowski, S. & Sitko, K. (2017) - Can chlorophyll-*a* fluorescence parameters be used as bio-indicators to distinguish between drought and salinity stress in *Tilia cordata* Mill? *Environmental and Experimental Botany*, vol. 152, p. 149-157. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.03.029>.

Lang, Y.; Wang, M.; Xia, J.; Zhao, Q. (2018) - Effects of soil drought stress on photosynthetic gas exchange traits and chlorophyll fluorescence in *Forsythia suspense*. *Journal of Forestry Research*, vol. 29, p. 45-53. <https://doi.org/10.1007/s11676-017-0420-9>.

Lawson, T. & Blatt, M.R. (2014) - Stomatal size, speed, and responsiveness impact on photosynthesis and water use efficiency. *Plant Physiology*, vol. 164, p. 1556-1570. <https://doi.org/10.1104/pp.114.237107>.

Martins, R.F.A.; Souza, A.F.C.; Pitol, C. & Falqueto, A.R. (2017) - Physiological responses to intense water deficit in two genotypes of crambe (*Crambe abyssinica* Hochst.). *Australian Journal of Crop Science*, vol. 11, p. 821-827. <https://doi.org/10.21475/ajcs.17.11.07.pne469>.

Mehta, P.; Jajoo, A.; Mathur, S. & Bharti, S. (2010) - Chlorophyll *a* fluorescence study revealing effects of high salt stress on Photosystem II in wheat leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 48, p. 16-20. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.10.006>.

Meng, L.L.; Song, J.F.; Wen, J.; Zhang, J. & Wei, J.H. (2016) - Effects of drought stress on fluorescence characteristics of photosystem II in leaves of *Plectranthus scutellarioides*. *Photosynthetica*, vol. 54, p. 414-421. <https://doi.org/10.1007/s11099-016-0191-0>.

Oliveira, R.C.; Reis, A.C.C.S.; Aguiar, C.G.; Viecelli, C.A.; Primieri, C.; Tomasi, G.A.; Bleil Junior, H.G.; Andrade, M.A.A. & Viana, O.H. (2015) –*Agroindustrialização do Crambe*, Cascavel: ASSOESTE, 75 p.

Oukarroum, A.; Bussotti, F.; Goltsev, V. & Kalaji, H.M. (2015) - Correlation between reactive oxygen species production and photochemistry of photosystems I and II in *Lemna gibba* L. plants under salt stress.*Environmental and Experimental Botany*, vol.109, p. 80-88. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.08.005>.

Pitol, C.; Broch, D.L. & Roscoe, R. (2012) -*Introdução e Melhoramento do crambe no Brasil, Tecnologia e produção: crambe*, F. M. S., Ed., Fundação MS, Brazil, p. 4-6.

Redillas, M.C.F.R.; Strasser, R.J.; Jeong, J.S.; Kim, Y.S. & Kim, J. K. (2011) -The use of JIP test to evaluate drought-tolerance of transgenic rice overexpressing *OsNAC1*,*Plant Biotechnology Reports*,vol.5, p. 169-175. <https://doi.org/10.1007/s11816-011-1707>.

Sharma, D.K.; Fernández, J.O.; Rosenqvist, E.; Ottosen, C.O. & Andersen, S.B. (2014) - Genotypic response of detached leaves versus intact plants for chlorophyll fluorescence parameters under high temperature stress in wheat.*Journal of Plant Physiology*,vol.171, p.576-586.<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.09.025>.

Sinclair, T.R.; Zwieniecki, M.A. & Holbrook, N.M. (2008) -Low leaf hydraulic conductance associated with drought tolerance in soybean.*Physiologia Plantarum*, vol.132, p. 446-451. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.01028.x>.

Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M., Dangre, D., Rai, M. (2007) - Biophysical phenomics reveals functional building blocks of plants systems biology: a case study for the evaluation of the impact of mycorrhization with *Piriformospora indica*, *Advanced techniques in soil microbiology*, Varma, A. and Oelmuler, R., Ed. Berlin: Springer, p. 319-341.

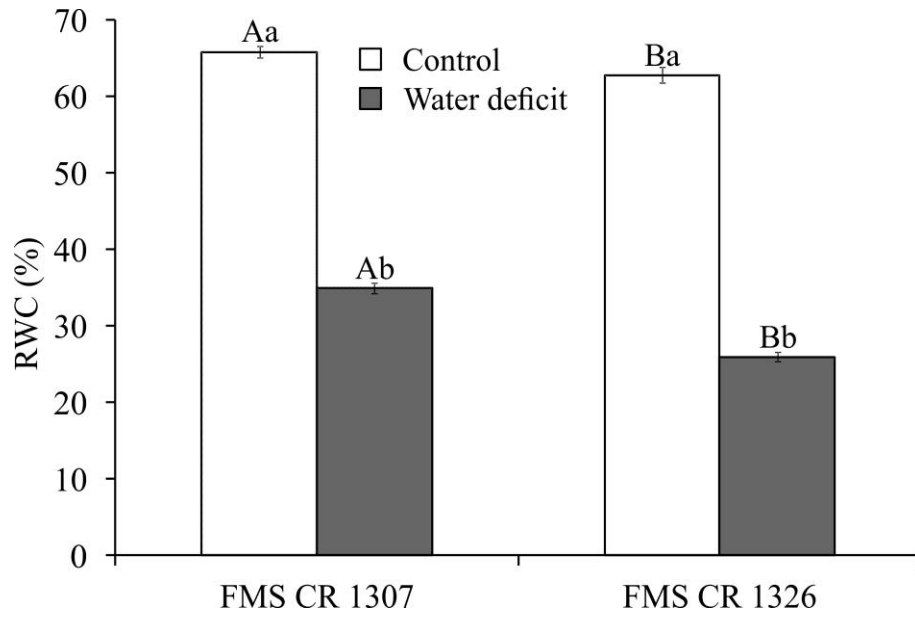
Wang, Y.; Xu, C.; Wu, M. & Chen, G. (2016) - Characterization of photosynthetic performance during reproductive stage in high-yield hybrid rice LYPJ exposed to drought

stress probed by chlorophyll *a* fluorescence transient. *Plant Growth Regulation*, vol.81, p. 489-499. <https://doi.org/10.1007/s10725-016-0226-3>.

Yusuf, M.A.; Kumar, D.; Rajwanshi, R.; Strasser, R.J.; Tsimilli-Michael, M.; Govindjee & Sarin, N.B. (2010) - Overexpression of  $\gamma$ -tocopherolmethyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: physiological and chlorophyll *a* fluorescence measurements. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol.1797, p. 1428-1438. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.02.002>.

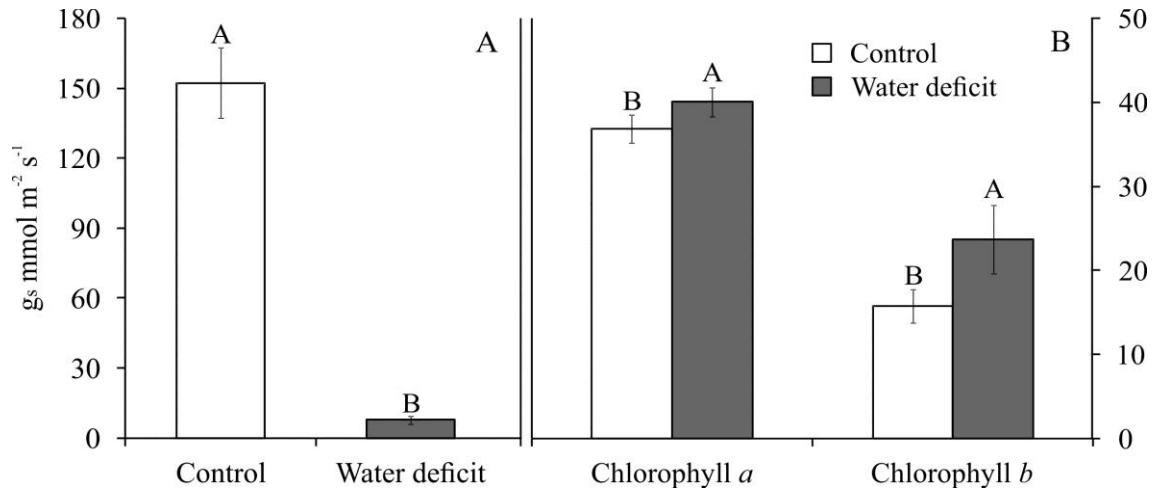
Xiong, L.; Wang, R-G.; Mao, G. & Koczan, J.M. (2006) - Identification of Drought Tolerance Determinants by Genetic Analysis of Root Response to Drought Stress and Abscisic Acid. *Plant Physiology*, vol. 142, p. 1065-1074. <https://doi.org/10.1104/pp.106.084632>.

Zhang, R.H.; Zhang, X.H.; Camberato, J.J. & Xue, J.Q. (2015) - Photosynthetic Performance of Maize Hybrids to Drought Stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, vol.62, p.788-796. <https://doi.org/10.1134/S1021443715060187>.

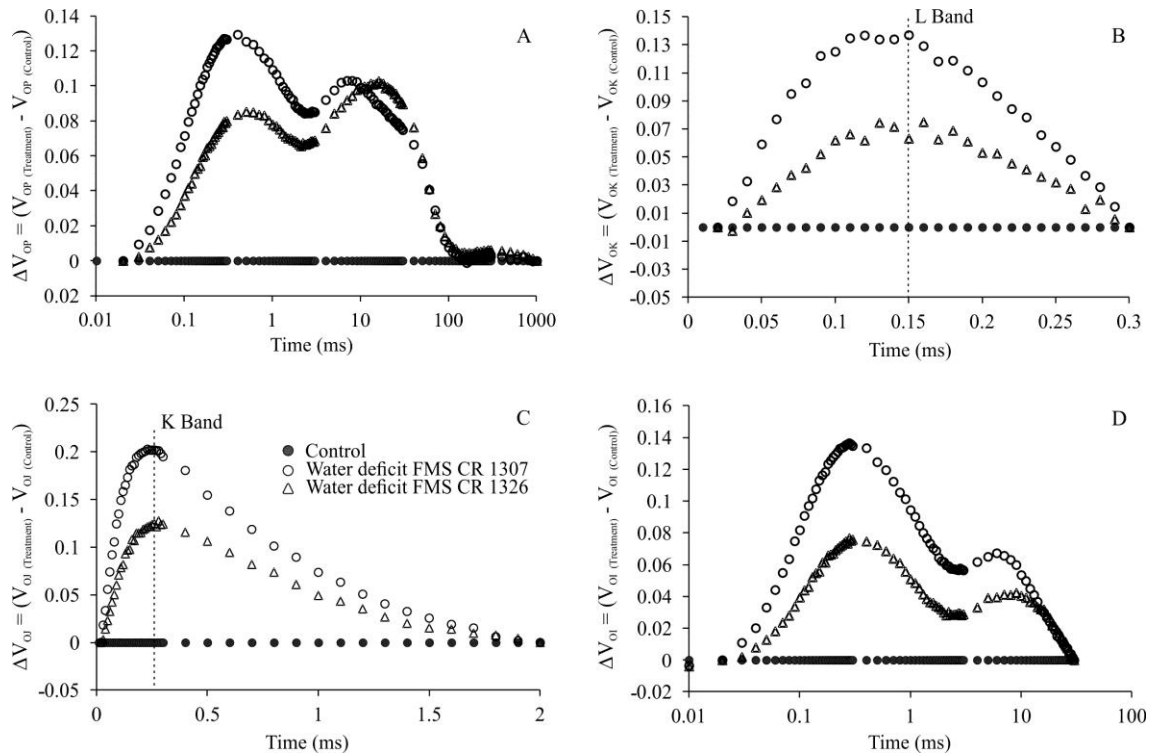


**Figure 1.** Leaf relative water content (RWC) of two *C. abyssinica* genotypes submitted to water deficit. Columns followed by the same letter, upper case for genotype and lowercase for water regime, did not differ significantly from each other according to the Tukey test,  $p \leq 0.001$ . Means of three replicates ( $\pm$  SD).

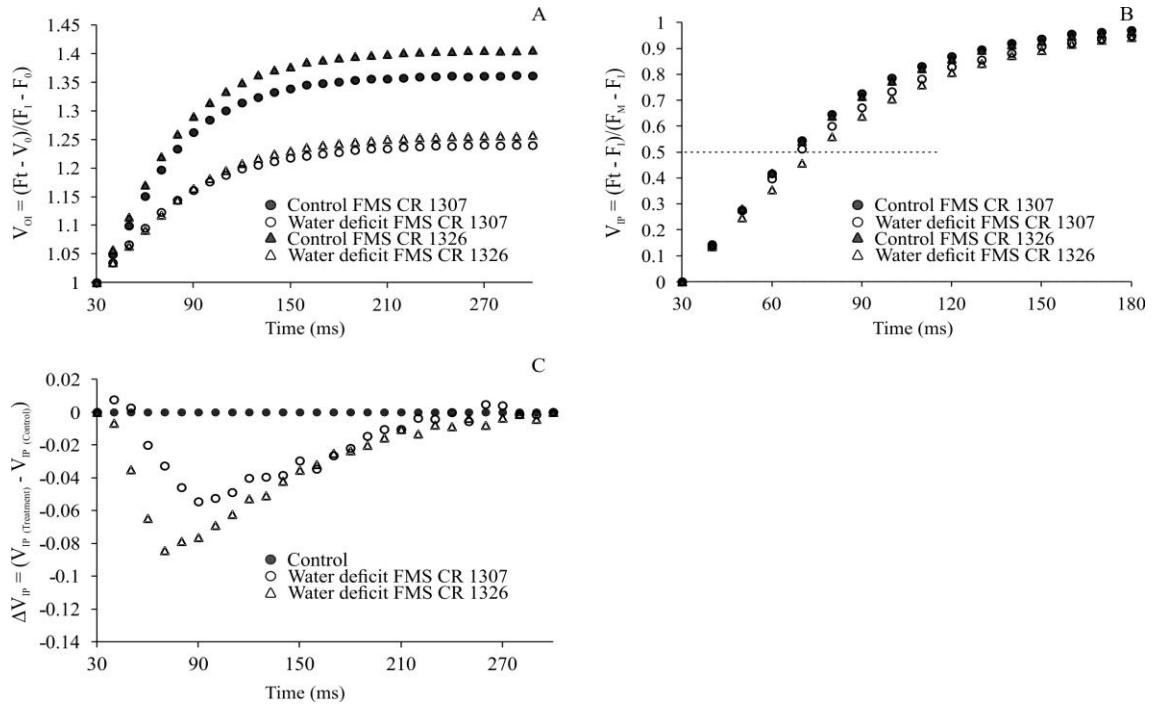




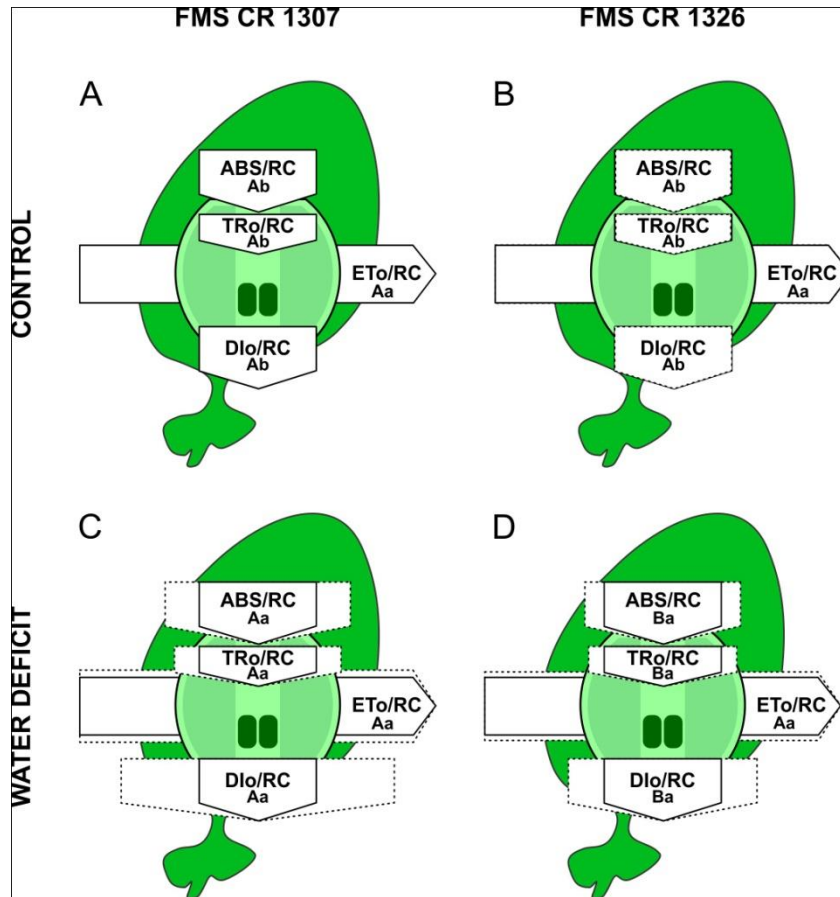
**Figure 2.** Stomatal flow rate  $g_s$  (A) and chlorophyll *a* and *b* (B) index of two genotypes of *C. abyssinica* submitted to water deficit. Columns followed by the same letter did not differ significantly from each other according to the Tukey test,  $p \leq 0.001$ . Means of nine and eleven replicates, respectively ( $\pm$  SD).



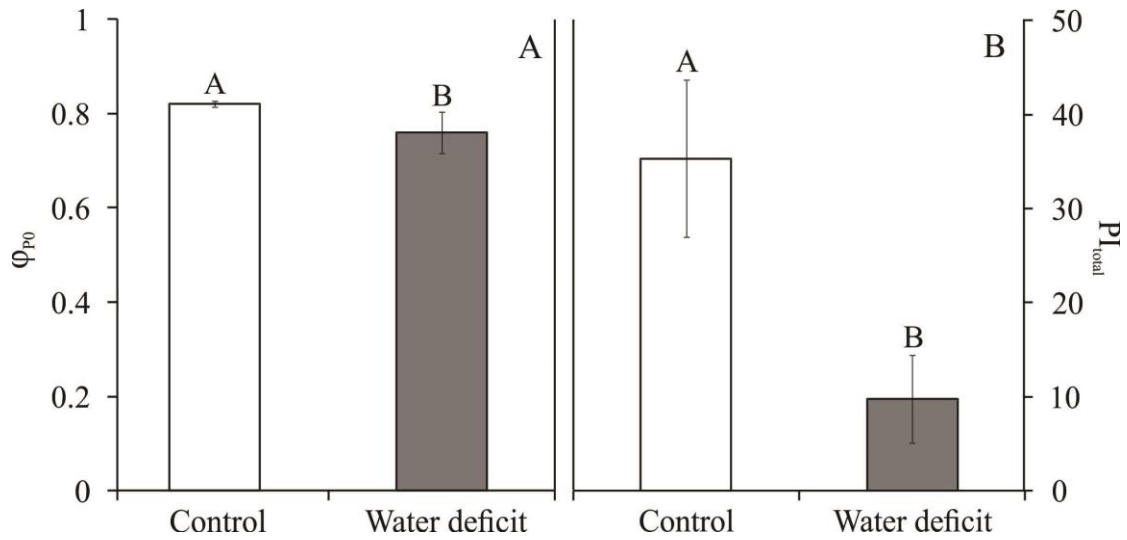
**Figure 3.** Kinetic difference of  $V_{OP}$  (A),  $V_{OK}$  (B),  $V_{OI}$  (C) and  $V_{OI}$  (D) obtained through the double normalization of the O-P phase ( $\Delta V_{OP} = V_{OP(treatment)} - V_{OP(control)}$ ), O-K ( $\Delta V_{OK} = V_{OK(treatment)} - V_{OK(control)}$ ) and O-I ( $\Delta V_{OI} = V_{OI(treatment)} - V_{OI(control)}$ ) respectively, in two genotypes of crambe FMS CR 1307 and FMS CR 1326 submitted to water deficit. Means of five replicates.



**Figure 4.** Transient chlorophyll fluorescence in the O-I phase ( $V_{OI}=(F_t-F_0)/(F_t-F_0)$ ) (A), I-P ( $V_{IP}=F_t-F_I)/(F_M-F_I)$ ) (B) and kinetic difference VIP ( $\Delta V_{IP}=V_{IP(treatment)}-V_{IP(control)}$ ) (C), respectively, in two genotypes of Crambe FMS CR 1307 and FMS CR 1326 submitted to the water deficit. Means of five replicates.



**Figure 5.** Leaf model showing specific flows by reaction center (RC) of leaves of two genotypes of *C. abyssinica* FMS CR 1307 and 1326 control (A and B) and water deficit (C and D). The response of each of the parameters can be observed by the dotted genotypes compared to the control. Figures followed by the same letter, upper case for genotype and lowercase for water regime, did not differ significantly according to the Tukey test,  $p \leq 0.05$ . Means of five replicates. ABS/RC - absorption flux per RC;  $ET_0/RC$  - electron transport flux (further than  $Q_A^-$ ) per RC;  $DI_0/RC$  - dissipated energy flux per RC (at  $t = 0$ );  $TR_0/RC$  - trapping flux (leading to  $Q_A$  reduction) per RC.



**Figure 6.** Maximum quantum yield of primary photochemistry of PSII ( $\phi_{PO}$ ) (A) and photosynthetic performance index ( $PI_{total}$ ) (B) of two *C. abyssinica* genotypes submitted to water deficit. Columns followed by the same letter did not differ significantly from each other according to the Tukey test,  $p \leq 0.001$ . Means values of five replicates ( $\pm$  SD).

### **CAPÍTULO 3 - Physiological and anatomical responses of *Crambe abyssinica* to repeated exposure to water deficit**

Priscila da Conceição de Souza Braga<sup>a</sup>, João Paulo Rodrigues Martins<sup>b</sup>, Robson Bonomo<sup>c</sup> and Antelmo Ralph Falqueto<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>*Plant Ecophysiology Laboratory, Federal University of Espírito Santo, Litorâneo, 29932-540 São Mateus, ES, Brazil*

<sup>b</sup>*Plant Tissue Culture Laboratory, Federal University of Espírito Santo, Litorâneo, 29932-540 São Mateus, ES, Brazil*

<sup>c</sup>*Plant Irrigation Laboratory, Federal University of Espírito Santo, Litorâneo, 29932-540 São Mateus, ES, Brazil*

\*Autor para correspondência: *\*antelmo.falqueto@ufes.br*

Periódico a ser submetido: *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*

A formatação de citação, referências, tabelas e figuras deste capítulo seguem as instruções do periódico *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, que consta em:

<https://www.tandfonline.com/action/authorSubmission?show=instructions&journalCode=tnzc20>.

## ABSTRACT

The objective of this study was to understand how crambe's performance under water limiting conditions is affected by previous exposure to water deficit. Crambe plants (genotypes FMS Brilhante, FMS CR 1307 and 1326) were grown in 5.5 L pots and exposed to one (1WD) or three (3WD) water deficit cycles. As reference, plants were grown with daily irrigation (continuously irrigated – CI). Under water deficit, leaf relative water content (RWC) significantly decreased in 1WD plants. However, FMS CR 1307 the application of three water deficit cycles (3WD) did not change the RWC and decreased the stomatal conductance and extravasation of electrolytes compared to the reference plants. Also, negative K and L-bands occurred, indicating improved stability and efficiency in utilizing energy. Our results show that the drought stress imposed on 3WD plants enabled them to adjust more directly their physiological than anatomical traits. The genotype FMS CR 1307 was better able to store information from previous stress ful events, improving its performance under water deficit.

*Keywords:* Drought, Chlorophyll *a* fluorescence, recovery, stress memory, genotype

**Abbreviations** 1WD, plants exposed to one water deficit cycle; 3WD, plants exposed after three water deficit cycles; ABS/RC, absorption flux (of antenna Chl) per RC; Chl, Chlorophyll; CI, continuously irrigated plants;  $DI_0/RC$ , dissipation flux per RC; DW, dry weight; EE, extravasation of electrolytes;  $ET_0/RC$ , electron transport flux (further than  $Q_A^-$ ) per RC;  $F_0 = F_{20}$   $\mu$ s, minimum fluorescence, when all PSII RCs are open;  $F_2$  (0.1ms) and  $F_3$  (0.3 ms), fluorescence intensity at 0.1 and 0.3 ms, respectively;  $F_4$  (2 ms) and  $F_5$  (30 ms), fluorescence intensity at the J-step (2 ms) and the I-step (30 ms), respectively; FW, fresh weight;  $F_m$ , maximum fluorescence, when all PSII RCs are closed;  $g_s$ , stomatal conductance; OEC, oxygen-evolving complex; PSII, photosystem II;  $Q_A$ , quinone A; RC, reaction center; RWC, leaf relative water content; TW, turgid weight;  $TR_0/RC$ , trapping flux per RC;  $V_{OJ}$  or K-band, variable fluorescence between steps O (0.02 ms) and J (2 ms);  $V_{OK}$  or L-band, variable fluorescence between steps O (0.02 ms) and K (0.3 ms); WD, water deficit.

## Introduction

Among the environmental conditions affecting plants, drought is the major stress factor affecting the growth, development and yield of crops (Feller and Vaseva, 2014; Wani et al.,

2016; Zhang et al., 2018). Drought can affect plants in several ways. One of the first effects of water deficit in plants is stomatal closure, which is regulated by abscisic acid (ABA). According to Marcos et al. (2018), stomatal closure, to avoid dehydration due to water loss through transpiration, reduces CO<sub>2</sub> fixation, which in turn results in imbalances of photochemical and biochemical reactions of photosynthesis (Flexas et al., 2012). This can cause damage to the photosystem II (PSII) reaction centers, thus reducing their efficiency (Mehta et al., 2010). In scientific studies, plants' responses to drought are generally analyzed with respect to a single water deficit event.

In nature plants are exposed to recurrent cycles of water deficit and rehydration, and the responses to these repeated water deficit events are still not well understood (Walter et al., 2011; and Munné-Bosch, 2016; Menezes-Silva et al., 2017). According to Mickelbart et al. (2015), plants generally exhibit stress tolerance or avoid stress through mechanisms of acclimation and adaptation that evolved through natural selection. Thus, after stress recognition, the plants regulate their responses to reestablish cellular homeostasis, reducing the effects of immediate stress. These changes in the acclimation period tend to allow plants to respond faster and more efficiently to future environmental stresses (Fleta-Soriano and Munné-Bosch, 2016; Marcos et al., 2018), enabling them to live in a great diversity of habitats (Soriano and Munné-Bosch, 2016).

Studies about previous exposure to one or repeated cycles of various abiotic stresses (water deficit, salinity, high, temperature) have shown that this improve plant resistance to future exposure, a reaction known as "stress memory" (Zhang et al., 2018; Marcos et al., 2018; Hu et al., 2016; Hu et al., 2015). When potato plants (*Solanum tuberosum* L. cv Atlantic) were exposed to water deficit, they showed increases in the leaf relative water content and leaf thickness, increasing water storage capacity, preventing excessive transpiration and ensuring more efficient water use (Zhang et al., 2018). Increases in root biomass of sugarcane plants (*Saccharum* spp. variety IACSP94-2094) submitted to three water deficit cycles caused improved water uptake (Marcos et al., 2018). Reductions in electrolyte extravasation were observed in plants of *Lolium perenne* L. (cv. 'Quickstart II') exposed to salinity (Hu et al., 2016), while improved recovery of PSII by decreased inhibition of photosynthetic electron transport fluxes was noted in plants of *Festuca arundinacea* Schreb. exposed to high temperatures (Hu et al., 2015).

The majority of studies reporting stress memory have used analysis of transcriptome, epigenome, proteome and metabolome (Hu et al., 2015; Hu et al., 2016; Fleta-Soriano and Munné-Bosch, 2016; Menezes-Silva et al., 2017). However, these techniques are expensive



and time-consuming. In this study, we investigated the stress memory utilizing analyses of simple morphophysiological aspects, such as chlorophyll a fluorescence. Since it is a non-invasive and a highly sensitivity method, Chl *a* fluorescence is widely used to monitor and screen for tolerance of species and genotypes to stress (Mehta et al., 2010).

*Crambe abyssinica* Hochst. is an annual crop native to the Mediterranean region of Ethiopia but now cultivated in many tropical and subtropical regions. The crop has high potential to produce biodiesel (Batista et al., 2018). Its cultivation has many agronomic advantages, such as low nutritional requirements and a high morphological plasticity (Bassegio et al., 2016; Zanetti et al., 2016), allowing crop rotation and providing a source of clean energy, helping to mitigate global warming. According to Pitol et al. (2012), new crambe genotypes have been tested to expand the crop and improve yield in Brazil. Currently, only the FMS Brilhante genotype is registered in Brazil. However, according to Oliveira et al. (2015), the crambe genotype FMS CR 1307 can be considered as pre-launch candidate material and the FMS CR 1326 genotype is still being tested by the Mato Grosso do Sul Foundation (MS Foundation).

In the present study, we evaluated the photochemical adjustments of plants, through chlorophyll a fluorescence analyses, the changes in the relative water content (RWC) and anatomic characteristics of the diffusive system through stomatal conductance measurements ( $g_s$ ), and cell membrane stability through analysis of electrolyte extravasation (EE). We hypothesized that crambe plants subjected to previous droughts will exhibit improved performance, achieved through changes in morphophysiology under water deficit. The objective of this study was to understand how crambe performance under drought conditions is affected by previous exposure to water deficits.

## **Material and methods**

### ***Plant growth and experimental design***

The experiment was conducted in a greenhouse located at Federal University of Espírito Santo, Brazil (18° 43' S longitude, 39° 51' W latitude, altitude of 39 m). Seeds of *Crambe abyssinica* Hochst. (FMS Brilhante, FMS CR 1307 and 1326 genotypes) were obtained from the Mato Grosso do Sul Foundation (MS Foundation), in Maracaju, MS. Seeds were previously disinfested with 70% ethanol for 2 min., 1% sodium hypochlorite (v/v) for 20 min. and Ridomil ® fungicide for 10 min., followed by triple lavage with autoclaved distilled water. Then the seeds were placed to germinate in 5.5 L pots (15 seeds per pot) filled with soil (75.5% sand, 17.2% clay and 5.2% silt). The soil was submitted to previous chemical analysis

to correct nutrient and pH levels, following the recommendations of Oliveira et al. (1991). Thirty grams of single super phosphate was added per pot 3 times during the experiment. In addition, applications of insecticide (Evidence®) and fungicide (Ridomil®) were made according to the culture manual. After 20 days, the seedlings were thinned to one per pot.

The plants were irrigated daily for 36 days to maintain the soil moisture around 80% of the field capacity ( $\cong 0.20 \text{ m}^3 / \text{m}^3$ ), after which they were divided into three groups: (1) plants irrigated daily (continuously irrigated - CI); (2) plants submitted to one water deficit cycle (1WD); and (3) plants submitted to three water deficit cycles with periods of water deficit recovery (3WD) (Menezes-Silva et al., 2017). Soil water levels ( $\text{m}^3/\text{m}^3$ ) were monitored using a soil water sensor (ProCheck, version 4, Decagon Devices).

Each water deficit cycle was imposed by suspending the irrigation until the soil moisture content reached approximately 30% ( $\cong 0.06 \text{ m}^3/\text{m}^3$ ) and the stomatal conductance of plants reached values below  $10 \text{ mmol m}^2\text{s}^{-1}$ , which occurred after seven days (Martins et al., 2017). The recovery phase occurred after four days, the time required for the stomatal conductance ( $g_s$ ) of plants submitted to water deficit to reach the values observed in the continuously irrigated (CI) plants. After the full recovery from the water deficit cycle (seven days of water deficit and four days of recovery), three additional cycles of water deficit were applied to 3WD plants, as described above. At the end of the first (1WD) and the third cycle (3WD), visual symptoms of leaf wilt were evident in all plants. The water deficit cycles were similar in intensity and duration, and all treatments (CI, 1WD and 3WD) were evaluated at the same time. Thus, the plants were the same age at the end of the experiment. All measurements were made between 5 a.m. and 10 a.m. in fully expanded leaves (third or fourth leaf from the apex).

***Leaf relative water content (RWC), stomatal conductance ( $g_s$ ) and extravasation of electrolytes***

Leaf relative water content (RWC), stomatal conductance ( $g_s$ ) and extravasation of electrolytes were measured in three, nine and three plants per treatment, respectively. RWC was determined following the methods proposed by Barrs and Weatherley (1962). From each plant a leaf was removed from which three discs ( $0.78 \text{ cm}^2$ ) were extracted. The three discs were weighed together, immediately after the collection from the leaves, obtaining the fresh weight of the tissue (FW). Then the turgid weight (TW) was obtained after hydration of the foliar discs through submersion for 24 hours in Petri dishes containing distilled water. Dry weight (DW) was obtained after drying the leaf discs for 72 h at  $65 \text{ }^\circ\text{C}$ . RWC was calculated

according to the following expression and the results were expressed in percentage:  $RWC = [(FW-DW) / (TW-DW)] * 100$ . The stomatal conductance ( $g_s$ ) was measured on the abaxial leaf surface using a leaf porometer (SC-1Leaf Porometer, Decagon Devices). The degree of membrane integrity was determined by measuring the extravasation of electrolytes (EE) according to Bajji et al. (2001) and the values were expressed in percentage.

### ***Chlorophyll a fluorescence analysis***

Transient chlorophyll *a* fluorescence was measured in nine plants/treatment, using a Plant Efficiency Analyzer (Handy-PEA, Hansatech, King's Lynn, Norfolk, UK). The leaves were dark-adapted for 20 min using a leaf clip (Hansatech). The light intensity reaching the leaf was 3,000  $\mu\text{mol (photons) m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , which was sufficient to generate maximal fluorescence for all samples. The fast fluorescence kinetics ( $F_0$  to  $F_m$ ) was recorded from 10  $\mu\text{s}$  to 1 s. The fluorescence intensity at 20  $\mu\text{s}$  (considered  $F_0$ ), 100  $\mu\text{s}$ , 300  $\mu\text{s}$ , 2 ms ( $F_J$ ), and 30 ms ( $F_I$ ), and maximum fluorescence ( $F_m$ ) were recorded and analyzed according to the JIP test (Strasser et al., 2004; Stibert and Govindjee, 2011).

### ***Analysis of growth***

The growth analysis consisted of measuring the leaf area, root and shoot dry weight. Nine plants were evaluated in each treatment. The leaf area was determined using a LI-COR leaf area meter (Model LI-3100). Root and shoot dry weight were determined in grams (g) after the plants were placed in paper bags and dried for 72 hours at 60 °C.

### ***Leaf anatomy analysis***

At the end of the experiment for each treatment, the thickness of the spongy and palisade parenchyma and the were determined in seven plants. The samples were collected randomly and fixed in FAA (formaldehyde, acetic acid and 50% ethanol, 0.5:/0.5:/9, v/v) for 72 hours, followed by storage in 50% ethanol (Johansen, 1940). Cross sections were obtained with a double-edge razor in the middle region of the third fully expanded leaf. The sections were visualized and the images captured with a Leica DM 1000 light microscope coupled to a Leica ICC50 HD digital camera (Wetzlar, Germany). The UTHSCSA-Imagetool® software was used to measure the anatomical characteristics as revealed by the photomicrographs.

### ***Statistical analysis***

The experimental design was completely randomized, in a factorial scheme, consisting of different cycles of water deficit [(plants continuously irrigated – CI, plants exposed to one water deficit cycle (1WD) and plants exposed to three water deficit cycles (3WD)] and three crambe genotypes (FMS Brilhante, FMS CR 1307 and CR 1326), with nine replicates (pots/one plant per pots) per treatment. The data were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the means of the factors (genotypes and water regime) were compared using the Tukey test ( $p < 0.05$  or  $p < 0.001$ ) using the statistical program Sisvar® (Ferreira, 2011).

## Results

### *Leaf relative water content (RWC), stomatal conductance ( $g_s$ ) and extravasation of electrolytes (EE)*

Significant difference ( $p \leq 0.001$ ) in leaf relative water content (RWC) related to water deficit cycles and crambe genotypes (FMS Brilhante, FMS CR 1307 and 1326) was observed (Fig. 1A). Plants exposed to one water deficit cycle (1WD) showed lower leaf relative water content than the continuously irrigated (CI) plants (Fig. 1A). After three water deficit cycles (3WD), all crambe genotypes showed some increase of RWC compared to the plants exposed to one water deficit cycle. However, only the genotype FMS CR 1307 showed RWC values statistically equal to the continuously irrigated plants (CI) at 3WD (84.5% and 85.5%, respectively).

The stomatal conductance ( $g_s$ ) values in plants that experienced one water deficit cycle decreased only in FMS 1307 genotype compared to the CI plants and was higher in the 3WD plants ( $p \leq 0.001$ ) (Fig. 1 B). When the crambe genotypes were compared under water deficit, FMS CR 1307 showed the lowest  $g_s$  values after one and three water deficit cycles, while similar  $g_s$  values were observed for FMS Brilhante and FMS CR 1326 (Fig. 1B).

Regarding the degree of membrane integrity, the extravasation of electrolytes (EE) increased in FMS CR 1326 plants exposed to one and three water deficit cycles but decreased FMS CR 1307 submitted to three-water deficit cycles, with no change observed for one water deficit cycle (Fig. 1C). Comparing all genotypes at 3WD, FMS CR 1326 showed increases of about 26.8 and 54.2% compared to FMS Brilhante and FMS CR 1307, respectively, and about 65% in relation as CI plants.

### *Chlorophyll a fluorescence transient*

As shown in Fig. 2A, plants exposed to one and three water deficit cycles showed a typical polyphasic OJIP shape, from a basal level ( $F_0$ ) to a maximum level ( $F_m$ ), and the J and I steps

were well defined. However, the differences between genotypes and treatment were not clear. The variable relative fluorescence between the O and J steps [obtained at 0.02 and 2 ms, respectively and presented as  $V_{OJ} = (F_t - F_0) / (F_J - F_0)$ ] and between O and K steps [(0.02 and 30 ms, respectively, presented as  $V_{OK} = (F_t - F_0) / (F_K - F_0)$ ] were normalized and showed kinetic differences of  $\Delta V_{OJ} = V_{OJ}(\text{treatment}) - V_{OJ}(\text{control})$  and  $\Delta V_{OK} = V_{OK}(\text{treatment}) - V_{OK}(\text{control})$ , respectively (Fig. 2 B and C). The kinetic difference  $\Delta V_{OK}$  and  $\Delta V_{OJ}$  made the L- and K-bands visible, respectively, with peaks around 0.26 and 0.16 ms, respectively.

Overall, L- and K-bands with positive amplitudes were observed for all crambe genotypes analyzed. In both FMS Brillhante and FMS CR 1326, the stability of the OEC (K-band) decreased ( $p \leq 0.001$ ) after three water deficit cycles. Note that in FMS CR 1307, negative and significant values of K-band were observed after 3WD (see insert in Fig. 2B). Furthermore, the energetic connectivity (L-band) values were significantly lower ( $p \leq 0.001$ ) in FMS CR 1307 treated with three water deficit cycles (see insert in Fig. 2C). However, these alterations were not significant for genotypes FMS Brillhante and FMS CR 1326 (Fig. 2C). Among the genotypes, the lowest K- and L-band values were observed for FMS CR 1307 submitted to water deficit.

The parameters of specific energy fluxes varied significantly ( $p \leq 0.05$ ) as a function of repeated exposures to water deficit, except for the FMS Brillhante genotype. However, no difference ( $p \geq 0.05$ ) was observed between genotypes (Table 1). For FMS CR 1326, plants exposed to one and three water deficit cycles showed increased capture ( $TR_0/RC$ ) and transport ( $ET_0/RC$ ) per reaction center. For FMS CR 1307, increases in the energy flux for absorption ( $ABS/RC$ ), capture ( $TR_0/RC$ ) and transport ( $ET_0/RC$ ) were noted at 1WD e 3WD. There was a significant decrease in  $DI_0/RC$  and  $RC/ABS$ , and the lowest values were found in plants exposed to three water deficit cycles, which was similar to that obtained in the control plants (Table 1).

### ***Analysis of growth***

The root dry matter, shoot dry matter and leaf area values of crambe plants varied significantly ( $p \leq 0.001$ ) independently of genotype (Table 2). Increases in root dry matter of plants exposed too one and three water deficit cycle (1WD and 3WD) were observed ( $\cong$  35.0% and 46.9%, compared to CI plants). Also, decreased shoot dry matter and leaf area values were obtained when the plants were exposed to one and three water deficit cycles (approximately 139.3% and 226.6%, respectively for shoot dry matter and 108.3% and

94.3%, respectively, for leaf area). However, the alterations observed in leaf area between 1WD and 3WD were not significant (Table 2).

### **Leaf anatomy**

The variations observed in both mesophyll and spongy parenchyma thickness were significant ( $p \leq 0.001$ ) and independent of the genotypes studied (Table 3). After one water deficit cycle, no changes in mesophyll and spongy parenchyma thickness were observed. On the other hand, a significant increase of mesophyll and spongy parenchyma thickness values was observed in plants submitted to 3WD (9.0% and 10.8%, respectively) compared to CI plants.

The palisade parenchyma thickness and number of xylem vessels differed ( $p \leq 0.05$ ) in function of water deficit cycles and crambe genotypes (Fig. 3 and 4). The exposure of FMS Brillhante and FMS CR 1307 to one water deficit cycle increased the palisade parenchyma thickness compared to the CI plants. All genotypes submitted to three water deficit cycles showed similar palisade parenchyma thickness values to that found in CI, evidencing full recovery. For FMS CR 1326, no change in the palisade parenchyma thickness was observed after the first water deficit cycle, but after 3WD, reduction of 41.7% in thickness was observed. Comparing all genotypes after 3WD, FMS CR 1326 showed decreases in the palisade parenchyma thickness of about 54.3 and 43.9% compared with FMS Brillhante and FMS CR 1307, respectively (Fig. 4A). Reductions in the number of xylem vessels were observed in FMS Brillhante after 1WD and 3WD (24.7% and 52.4%, respectively) compared with CI plants (Fig. 4B). No change in vessel number was observed for FMS CR 1327 and 1326 (Fig. 4B).

### **Discussion**

The increase of leaf relative water content (RWC) in plants exposed to three water deficit cycles (3WD) compared to those exposed to one water deficit cycle (1WD) (Fig. 1A) suggests increased capacity of crambe plants to retain water with each water deficit cycle. However, only for FMS CR 1307 genotype was full recovery of RWC values observed after 3WD compared with continuously irrigated plants (CI). These higher RWC values of 3WD plants can be associated with the decreases observed in  $g_s$  (Fig. 1B), which likely reduced the loss of water through leaf transpiration (Osakabe et al., 2014) improving water maintenance in leaf tissue. Also, the higher RWC values observed in genotype FMS CR 1307 under water deficit is associated with its greater ability to maintain high water content in the leaf tissue under water deficit conditions, compared to the FMS Brillhante and FMS CR 1326 plants.

According to Marcos et al. (2018), the maintenance of RWC is also evidenced by osmoregulatory mechanisms. Osmoregulation ensures the preservation of protein structures and functions under low water availability (Wingler, 2002; Verlues et al., 2006). By comparing the genotypes after three water deficit cycles, the reductions observed for extravasation of electrolytes (EE) values (Fig. 1 C) observed in FMS CR 1307 is an indication of less damage to the cell membranes, suggesting the presence of osmoregulation. According to Bajji et al. (2001), cell membranes are one of the first structure affected by stresses, while according to Trabelsi et al. (2019), it is generally accepted that their integrity and stability under water deficit conditions can be correlated with plant tolerance. The increases of palisade parenchyma thickness (Fig. 4 A) in 1WD plants suggest improvement of water relations and protection of leaf tissues in order to allow plant growth under water deficit conditions (Bacelar et al., 2004).

Increased palisade parenchyma thickness is a mechanism to improve the mechanical resistance of the parenchyma tissue, to protect the leaves from water loss (Bacelar et al., 2004; Marchi et al., 2008; Oliveira et al., 2018). However, previous exposure to water deficit in the 3WD plants resulted in a compact arrangement of the palisade parenchyma layers, reducing the thickness with each new cycle of water deficit. This result indicates the need to increase light uptake and to facilitate the penetration of light into the deeper cell layers, to improve the photosynthetic performance of the plants (Gotoh et al., 2018), since the palisade parenchyma is closely linked to the photosynthetic process (Liu et al., 2006) by most of the number of chloroplasts in palisade cells, as reported by Liu et al. (2010; 2016). In addition, after three water deficit cycles (3WD), no change in the number of xylem vessels was observed in genotypes FMS CR 1307 and 1326 (Fig. 4B), which may also increase the leaves hydration, mainly in FMS CR 1307, in which higher RWC maintenance was observed (Fig. 1A). This result indicates that the exposure of these crambe genotypes to three water deficit cycles did not result in changes in the number of xylem vessel, even though water deficit frequently results in vessel loss due to greater predisposition to embolism (Guah et al., 2018).

Thus, the maintenance of RWC and decrease of  $g_s$  and EE observed in FMS CR 1307 genotype compared to CI plants (Figs. 1 A, B and C) suggests that FMS CR 1307 plants exposed to three drought cycles can develop a differential acclimation through morphophysiological adjustment. In contrast, although the FMS CR 1326 genotype showed similar values of the anatomical structures as FMS CR 1307 (such as reduction of the palisade parenchyma thickness and number of xylem vessels, which were similar to CI plants), FMS CR 1326 showed reduced RWC,  $g_s$  and extravasation of electrolytes (Fig. 1). In this sense,

our results show that the 3WD plants were able to adjust to drought stress more through physiological factors than anatomical ones.

Also, the crambe genotypes exposed to 3WD showed that the water deficit differentially affected the photochemical parameters, as indicated by chlorophyll fluorescence transient measurements. This allowed comparing the photochemical mechanisms that can be involved in the physiological responses of the three crambe genotypes submitted to three water deficit cycles, as well as the action site of water deficit on the electron transport chain in all the genotypes.

The effects of drought stress (cycles of water deficit) on the chlorophyll *a* fluorescence transient parameters of FMS Brillhante, FMS CR 1307 and 1326 are presented in Fig. 2 and Table 1. All genotypes showed OJIP curves with typical polyphasic behavior, indicating that all samples were photosynthetically active after treatments (Fig. 2 A) (Yusuf et al. 2010). To better visualize the differences of the physiological memory to water deficit among the genotypes, the relative fluorescence between the steps O and J ( $V_{OJ}$ ) and O and K ( $V_{OK}$ ) were normalized and are shown as the kinetic difference  $\Delta V_{OJ}$  and  $\Delta V_{OK}$ , respectively, permitting identification of the appearance of the K- and L-bands.

The occurrence of positive K- and L-bands in the genotypes FMS Brillhante and FMS CR 1326 after exposure to one and three water deficit cycles (1WD and 3WD) and for FMS CR 1307 genotype after one water deficit cycle, respectively (Fig. 2B and C), reflects inhibition of electron donation to YZ (Tyr161 of protein D1) and disaggregation of PSII, respectively. Probably the water deficit resulted in damage to the oxygen-evolving complex (OEC), and consequently degradation of D1 protein (Strasser, 1997) and instability of the subunits associated with PSII (Lin et al., 2009). Thus, for FMS Brillhante and FMS CR 1326 genotypes, each water deficit cycle increased the damage due to lack of electron donation from the OEC to oxidized PSII (Takahashi and Badger, 2011), which may have resulted in photoinhibition. FMS Brillhante presented the highest positive amplitudes for both K- and L-bands in 1WD plants (Fig 2B and C insert). This higher amplitude of the L-band indicates that the water deficit caused dissociation of the PSII antenna complex (CP43 and CP47) (Chen et al., 2013).

The FMS CR 1307 genotype exposed to 1WD showed increased photon flux absorbed by the reaction centers (ABS/RC) and reduced stability of RC and their connection with the light-harvesting antenna complexes (RC/ABS) (Chen et al., 2014) (Table 1). These results suggest inactivation of the reaction centers and/or increase of the light-harvesting antenna size (Meng et al., 2016). According to Franić et al. (2017), the inactivation of reaction centers may



be an indication of susceptibility to photoinhibition, being used as a mechanism of negative regulation of excess light absorbed. The FMS CR 1307 genotype exposed to one water deficit cycle also showed an increase in energy capture per reaction center ( $TR_0/RC$ ). According to Kalaji et al. (2014), increases of  $TR_0/RC$  proportional to the increase of  $ABS/RC$  indicate impairment in the oxygen-evolving complex (Kalaji et al., 2014), through suppression of damaged repair (Takahashi and Murata 2008). In this study, the impairment caused to the oxygen-evolving complex was verified by the positive K-band in 1WD plants (Fig. 2B). However, part of the absorbed energy was dissipated as heat ( $DI_0/RC$ ). The improvement of energy dissipation protects the leaves against photooxidative damage (Franić et al., 2017). The results obtained in this study also suggest that repeated cycles of water deficit did not reduce the efficiency of photosynthesis by reaction centers (RCs) in the FMS Brillante genotype (Table 1). However, after the exposure to one and three water deficit cycles (1WD and 3WD), the FMS CR 1326 genotype presented increased  $TR_0/RC$  and  $ET_0/RC$  values.

Furthermore, the exposure of plants to three water deficit cycles (3WD) resulted in negative K- and L-bands only the FMS CR 1307 genotype (Fig. 2B and C). This result indicates probable photoprotective mechanism of reaction centers associated with PSII, in order to maximize the electron transport from the OEC to protein D1 and protect the grouping of PSII units, indicating better utilization of excitation energy and greater system stability. According to De Ronde et al. (2004), osmoregulation is an efficient mechanism to protect the OEC under environmental stress. In this study, as previously mentioned, reductions of EE (Fig. 1C) showed lower degree of cell membrane damage in FMS CR 1307 genotype, which suggests a possible osmoregulatory mechanism, which increased the stability of the OEC.

Also, this genotype, when submitted to 3WD, presented higher energy transport flow ( $ET_0/RC$ ) and reduced  $DI_0/RC$ . This may indicate that after the recovery from water deficit cycles, the FMS CR 1307 genotype had a more efficient photosynthetic apparatus, with increased electron transport from the OEC to protein D1 (negative L-band) and direction of electrons to reduce pheophytin,  $Q_A$  and the other electron acceptors of the carrier chain. This probably occurred in order to convert the excitation energy into redox energy, which leads to  $CO_2$  fixation (Strasser et al., 2000). According to Hu et al. (2015), stress memory can help delay the damages caused to  $CO_2$  fixation induced by abiotic stress, inhibiting the energy flow through of active RCs. These responses indicate photochemical memory to stress. Our data indicate that tolerance was improved under water deficit conditions and that the FMS CR 1307 crambe genotype is better able to cope with drought stress than FMS Brillante and FMS CR 1326.

The water deficit (one and three cycles) also altered the growth and anatomy of the plants (Table 2 and 3). According to Pimentel (2004) and Wu et al., (2018), morphological and anatomical changes are important for the plants' adaptation to water deficit conditions. An increase in root dry weight of plants submitted to 1WD and 3WD was observed. According to Marcos et al. (2018), sugarcane plants (*Saccharum* spp.) variety IACSP94-2094 exposed to repeated water deficit cycles showed increases in root dry matter. According to the authors, this increase is related to large and controlled H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations in the roots, without causing oxidative damage but increasing root growth. In this sense, plants under water deficit invest in root growth to increase water uptake from the soil. However, by increasing root growth, the shoot dry matter tends to decrease. In this study, after three cycles of water deficit, reductions in shoot dry matter and leaf area were observed (Table 2). Reductions of leaf area resulted in increased mesophyll thickness (Table 3), which increased the water storage capacity (Table 2) in 3WD plants, facilitating the CO<sub>2</sub> absorption and maintaining the photosynthetic activity under water deficit conditions (Chartzoulakis et al., 2000). The higher water storage capacity of 3WD plants was associated with increases in RWC (Fig. 1A), compared to 1WD plants. The results obtained in this study are the first demonstration that *Crambe abyssinica* plants exposed to repeated water deficit cycles are better able to cope with water shortage than their counterparts that experienced one water deficit exposure. According to Ding et al. (2013), the activation of a memory in response to an unfavorable environmental event may facilitate the response of the plant to future exposures to that environmental situation.

In summary, the results obtained in this study showed that previous exposure of genotype FMS CR 1307 to 3WD resulted in increased electron transport or energy exchange between independent photosystem II (PSII) units, showing activated stress memory, which was regulated for the PSII recovery process, in addition to greater energy transport flow. This result indicates that the transient chlorophyll a fluorescence is a good stress/tolerance indication tool for plants (Zhang et al., 2015, Meng et al., 2016, Falqueto et al. 2017) and an indicator of plant stress memory. Finally, from a practical perspective, our data indicate that tolerance of *Crambe abyssinica* to water deficit can be improved while saving water and energy through less frequent irrigation in regions characterized by low precipitation.

## **Conclusion**

In conclusion, our results showed that exposure of crambe plants to three water deficit cycles induced stress memory, involving physiological changes more directly than anatomical ones.

The stress memory resulting from previous exposure to water deficit is associated with the maintenance of the RWC, reductions in  $g_s$ , maintenance of the stability of cell membranes and utilization of excitation energy and greater stability of the system, besides increases in mesophyll and spongy parenchyma thickness and reductions in palisade parenchyma thickness. The FMS CR 1307 genotype showed better photochemical performance as well as anatomical adjustments that were synchronized to the maintenance of cell membrane integrity and stability. These results confirm the existence of water deficit memory in the PSII, improving the ability to absorb water from the soil.

### Acknowledgements

We are grateful to the Espírito Santo Research and Innovation Foundation (FAPES) for the financial support and scholarship. We are also thankful to the MS Foundation for providing the plant material and technical support during the study.

### References

- Bacelar, E, Correia, C, Moutinho-Pereira, J, Goncalves, B, Lopes, J, Torres-Pereira, J 2004. Sclerophylly and leaf anatomical traits of five field-grown olive cultivars growing under drought conditions. *Tree Physiology*. 24: 233–239.
- Bajji, M, Lutts, S, Kinet, J 2001. Water deficit effects on solute contribution to osmotic adjustment as a function of leaf ageing in three durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars performing differently in arid conditions. *Plant Science*. 160: 669–681.
- 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.
- Bassegio, D, Zanotto, MD, Santos, RF, Werncke, I, Dias, PP, Olivo, M 2016. Oilseed crop crambe as a source of renewable energy in Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 66: 311–321.
- Batista, PF, Costa, AC, Müller, C, Silva-Filho, OR, Silva, FB, Merchant, A, Mendes, GC, Nascimento, KJT 2018. Nitric oxide mitigates the effect of water deficit in *Crambe abyssinica*. *Plant Physiology et Biochemistry*. 129: 310–322.
- Chartzoulakis, K, Bosabalidis, A, Patakas, A, Vemmos, S 2000. Effects of water stress on water relations, gas exchange and leaf structure of olive tree. *Acta Horticulturae*. 537: 241–247.
- Chen, K, Chen, L, Fan, J, Fu, J 2013. Alleviation of heat damage to photosystem II by nitric oxide in tall fescue. *Photosynthesis Research*. 116: 21–31.

- Chen, SG, Strasser, RJ, Qiang, S2014. In vivo assessment of effect of phytotoxin tenuazonic acid on PSII reaction centers. *Plant Physiology and Biochemistry*. 84: 10–21.
- De Ronde, JA, Cress, WA, Kruger, GHJ, Strasser, RJ, Van Staden, J 2004. Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an *Arabidopsis* P5CR gene, during heat and drought stress. *Journal of Plant Physiology*. 161: 1211–1224.
- Ding, Y, Liu, N, Virilouvet, L, Riethoven, JJ, Fromm, M, Avramova, Z2013. Four distinct types of dehydration stress memory genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*. 13: 229.
- Falqueto, AR, Júnior, RAS, Gomes, MTG, Martins, JPR, Silva, DM, Partelli, FL 2017. Effects of drought stress on chlorophyll *a* fluorescence in two rubber tree clones. *Scientia Horticulturae*. 224: 238–243.
- Feller, U, Vaseva, II 2014. Extreme climate events: impacts of drought and high temperature on physiological processes in agronomically important plants. *Front. Environ. Sci*. 39: 1–17.
- Ferreira, DF (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)*. 35: 1039-1042.
- Fleta-Soriano, E, Munné-Bosch, S 2016. Stress memory and the inevitable effects of drought: a physiological perspective. *Frontiers in Plant Science*. 7: 143.
- Flexas, J, Barbour, MM, Brendel, O, *et al.* 2012. Mesophyll diffusion conductance to CO<sub>2</sub>: an unappreciated central player in photosynthesis. *Plant Science*. 193–194: 70–84.
- Franić, M, Galić, V, Mazur, M, Šimić, D 2017. Effects of excess cadmium in soil on JIP-test parameters, hydrogen peroxide content and antioxidant activity in two maize inbreds and their hybrid. *Photosynthetica*. 55: 1-10.
- Gotoh, E, Suetsugu, N, Yamori, W, Ishishita, K, Kiyabu, R, Fukuda, M, Higa, T, Shirouchi, B, Wada, M 2018. Chloroplast accumulation response enhances leaf photosynthesis and plant biomass production. *Plant Physiology*. 178:1358-1369.
- Guha, A, Chhajed, SS, Choudhary, S, Sunny, R, Jansen, S, Barua, D2018. Hydraulic anatomy affects genotypic variation in plant water use and shows differential organ specific plasticity to drought in *Sorghum bicolor*. *Environmental and Experimental Botany*. 156: 25-37.
- Hu, T, Jin, Y, Li, H, Amombo, E, Fu, J 2016. Stress memory induced transcriptional and metabolic changes of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) in response to salt stress. *Physiologia Plantarum*. 156: 54–69.
- Hu, T, Liu, SQ, Amombo, E, Fu, JM 2015. Stress memory induced rearrangements of HSP transcription, photosystem II photochemistry and metabolism of tall fescue (*Festuca*

*arundinacea* Schreb.) in response to high-temperature stress. *Frontiers in Plant Science*. 6: 403.

Johansen, DA 1940. *Plant microtechnique*, 2a edn. Mc Graw-Hill, New York, p 523

Kalaji, HM, Oukarroum, A, Alexandrov, V, Kouzmanova, M, Brestic, M, Zivcak, M, Samborska, IA, Cetner, MD, Allakhverdiev, SI, Goltsev, V 2014. Identification of nutrient deficiency in maize and tomato plants by *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence measurements. *Plant Physiology and Biochemistry*.81: 16-25.

Lin, Z-H, Chen, L-S, Chen, R-B, Zhang, F-Z, Jiang, H-X, Tang, N 2009. CO<sub>2</sub> assimilation, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, carbohydrates and photosynthetic electron transport probed by the JIP-test, of tea leaves in response to phosphorus supply. *BMC Plant Biology*. 9:43.

Liu Q, Li ZH, Wu JY 2016. Research progress on leaf anatomical structures of plants under drought stress. *Agricultural Science & Technology*. 17: 4–7.

Liu, C, Liu, Y, Guo, K, Zheng, Y, Li G, Yu, L 2010. Influence of drought intensity on the response of six woody species subjected to successive cycles of drought and rewatering. *Physiologia Plantarum*. 139: 39-54.

Marchi, S, Tognetti, R, Minnocci, A, Borghi, M, Sebastiani, L 2008. Variation in mesophyll anatomy and photosynthetic capacity during leaf development in a deciduous mesophyte fruit tree (*Prunus persica*) and an evergreen sclerophyllous Mediterranean shrub (*Olea europaea*). *Trees*.22: 559–571.

Marcos, FCC, Silveira, NM, Mokochinski, JB, Sawaye, ACHF, Machiori, PER, Machado, EC, Souza, GM, Landell, MGA, Ribeiro, RV 2018. Drought tolerance of sugarcane is improved by previous exposure to water deficit. *Journal Plant Physiology*.223: 9-18.

Martins, RFA, Souza, AFC, Pitol, C, Falqueto, AR 2017. Physiological responses to intense water deficit in two genotypes of crambe (*Crambe abyssinica* Hochst.). *Australian Journal of Crop Science*. 11: 821-827.

Mehta, P, Jajoo, A, Mathur, S, Bharti, S, 2010. Chlorophyll *a* fluorescence study revealing effects of high salt stress on Photosystem II in wheat leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*.48: 16-20.

Menezes-Silva, PE, Sanglard, LMPV, Ávila, RT, *et al.* 2017. Photosynthetic and metabolic acclimation to repeated drought events play key roles in drought tolerance in coffee. *Journal of Experimental Botany*. 68: 4309- 4322.

- Meng, LL, Song, JF, Wen, J, Zhang, J, Wei, JH 2016. Effects of drought stress on fluorescence characteristics of photosystem II in leaves of *Plectranthus scutellarioides*. *Photosynthetica*. 54: 414-421.
- Mickelbart, MV, Hasegawa, PM, Bailey-Serres, J 2015. Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. *Nature Reviews Genetics*. 16:237–251.
- Oliveira, RC, Reis, ACCS, Aguiar, CG, Viecelli, CA, Primieri, C, Tomasi, GA, Bleil Junior, HG, Andrade, MAA, Viana, OH (2015) *Agroindustrialização do Crambe Cascavel: ASSOESTE*.
- Oliveira, I, Meyerb, A; Afonso, S, Gonçalves, B 2018. Compared leaf anatomy and water relations of commercial and traditional *Prunus dulcis* (Mill.) cultivars under rain-fed conditions. *Scientia Horticulturae*. 229: 226–232.
- Osakabe, Y, Yamaguchi-Shinozaki, K, Shinozaki, K, Tran, LP 2014. ABA control of plant macroelement membrane transport systems in response to water deficit and high salinity. *New Phytologist*. 202: 35–49.
- Pimentel, C, 2004. A relação da planta com a água. (RJ: Edur, Seropédica)
- Pitol, C, Broch, DL, Roscoe, R (2012) *Introdução e Melhoramento do crambe no Brasil, Tecnologia e produção: crambe*, FMS, Ed., Fundação MS
- Stibert, A, Govindjee, V 2011. On the relation between the Kautsky effect (Chlorophyll *a* fluorescence induction) and photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biology*. 104: 236–257.
- Strasser, BJ 1997. Donor side capacity of photosystem II probed by chlorophyll *a* fluorescence transients. *Photosynthesis Research*. 52:147–155.
- Strasser, R, Srivastava, A, Tsimilli-Michael, M 2000. “The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples,” in *Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation, Chapter 25*, eds M. Yunus, U. Pathre, and P. Mohanty (Bristol: Taylor & Francis), 445–483.
- Strasser, RJ, Michael, MT, Srivastava, A, 2004. Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. In: George C, Govindje, Papageorgiou GC (eds) *Advances in photosynthesis and respiration chlorophyll fluorescence a signature of photosynthesis*. 1st edn. Springer, Netherlands. 321–362.
- Takahashi, S, Badger, MR 2011. Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trends in Plant Science*. 16: 1360-1385.
- Takahashi, S, Murata, N 2008. How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends Plant Science*. 13: 178–182.

- Trabelsi, L, Gargouria, K, Hassena, AB, Mbadra, C, Ghrab, M, Ncube, B, Staden, JV, Gargouri, R2019.Impact of drought and salinity on olive water status and physiological performance in an arid climate. *Agricultural Water Management*. 213: 749–759.
- Verlues, PE, Agarwal, M, Katiyar-Agarwal, S, Zhu, J, Zhu, JK 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought salt and freezing, abiotic stress that affect plant water status. *The Plant Journal*. 45: 523–539.
- Walter, J, Nagy, L, Hein, R, Rascher, U, Beierkuhnlein, C, Willner, E, Jentsch, A2011. Do plants remember drought? Hints towards a drought-memory in grasses. *Environmental and Experimental Botany*.71: 34–40.
- Wani, SH, Kumar, V, Shriram, V, Sah, SK 2016. Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *The Crop Journal*.4: 162–176
- Wingler, A, 2002. The function of trehalose biosynthesis in plants. *Phytochemistry*.60: 437–440.
- Wu, Y, Hong, W, Chen, Y 2018. Leaf physiological and anatomical characteristics of two indicator species in the limestone region of southern china under drought stress.*Pakistan Journal of Botany*.50: 1335-1342.
- Yusuf, MA, Kumar, D, Rajwanshi, R, Strasser, RJ, Tsimilli-Michael, M, Govindjee, V, Sarin, NB 2010. Overexpression of  $\gamma$ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1797: 1428–1438.
- Zanetti, F, Scordia, D, Vamerali, T, Copani, V, Dal Cortivo, C, Mosca, G 2016. *Crambe abyssinica* a non-food crop with potential for the Mediterranean climate: Insights on productive performances and root growth. *Industrial Crops and Products*. 90: 152-160.
- Zhang, RH, Zhang, XH, Camberato, JJ, Xue, JQ 2015. Photosynthetic Performance of Maize Hybrids to Drought Stress.*Russian Journal of Plant Physiology*. 62: 788–796.
- Zhang, S, Xu, X, Sun, Y, Zhang, J, Li, C 2018. Influence of drought hardening on the resistance physiology of potato seedlings under drought stress.*Journal of Integrative Agriculture*. 17: 336–347.

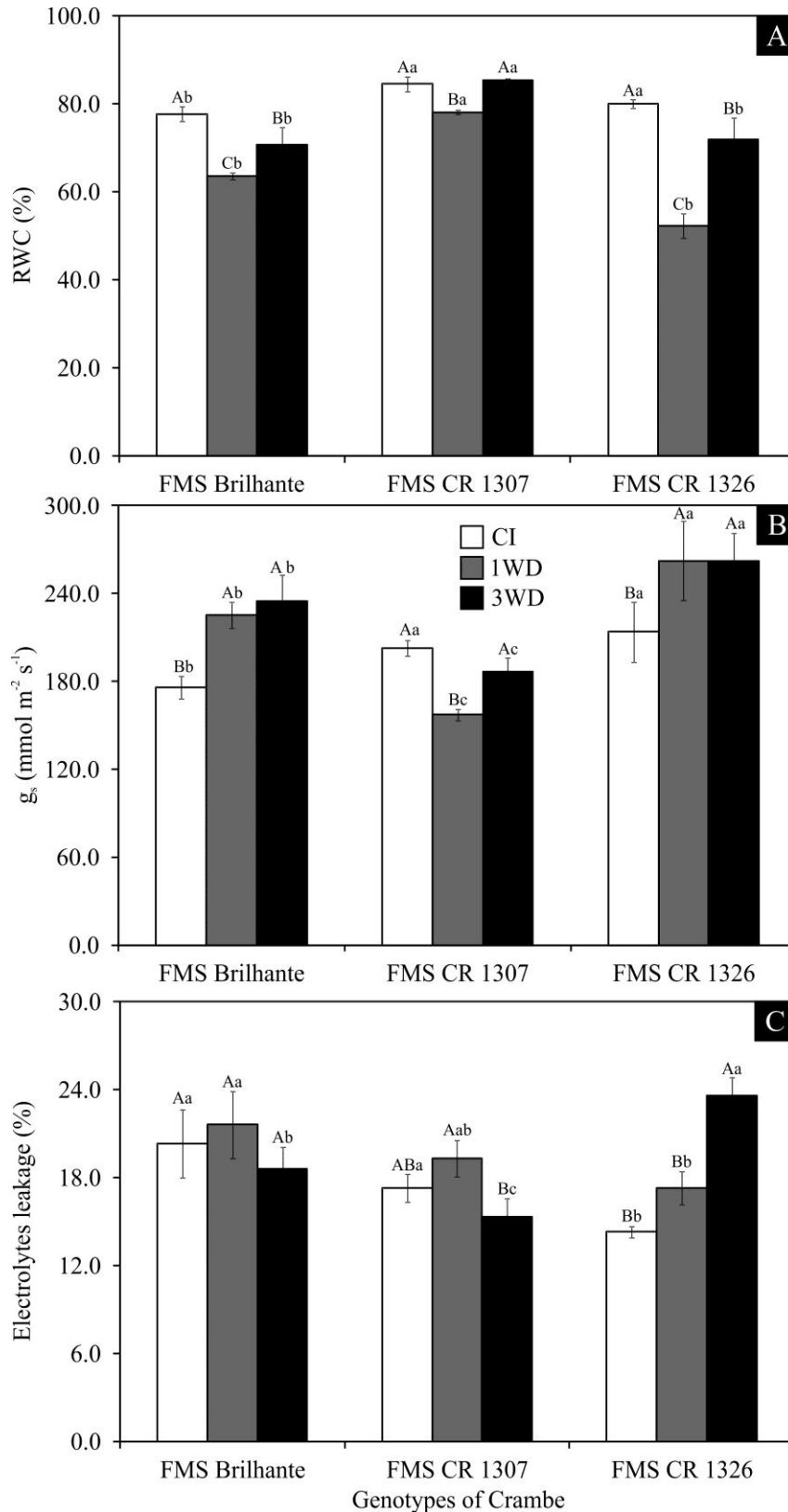


Figure 1 –Leaf relative water content (RWC) (a), Stomatal flow rate  $g_s$  (b) and electrolyte leakage (EE) (c) of three *C. abyssinica* genotypes submitted to repeated water deficit. Columns followed by the same letter, uppercase for water regime and lowercase for genotype, do not differ significantly from each other according to the Tukey test,  $p \leq 0.001$  ( $\pm$ SD).



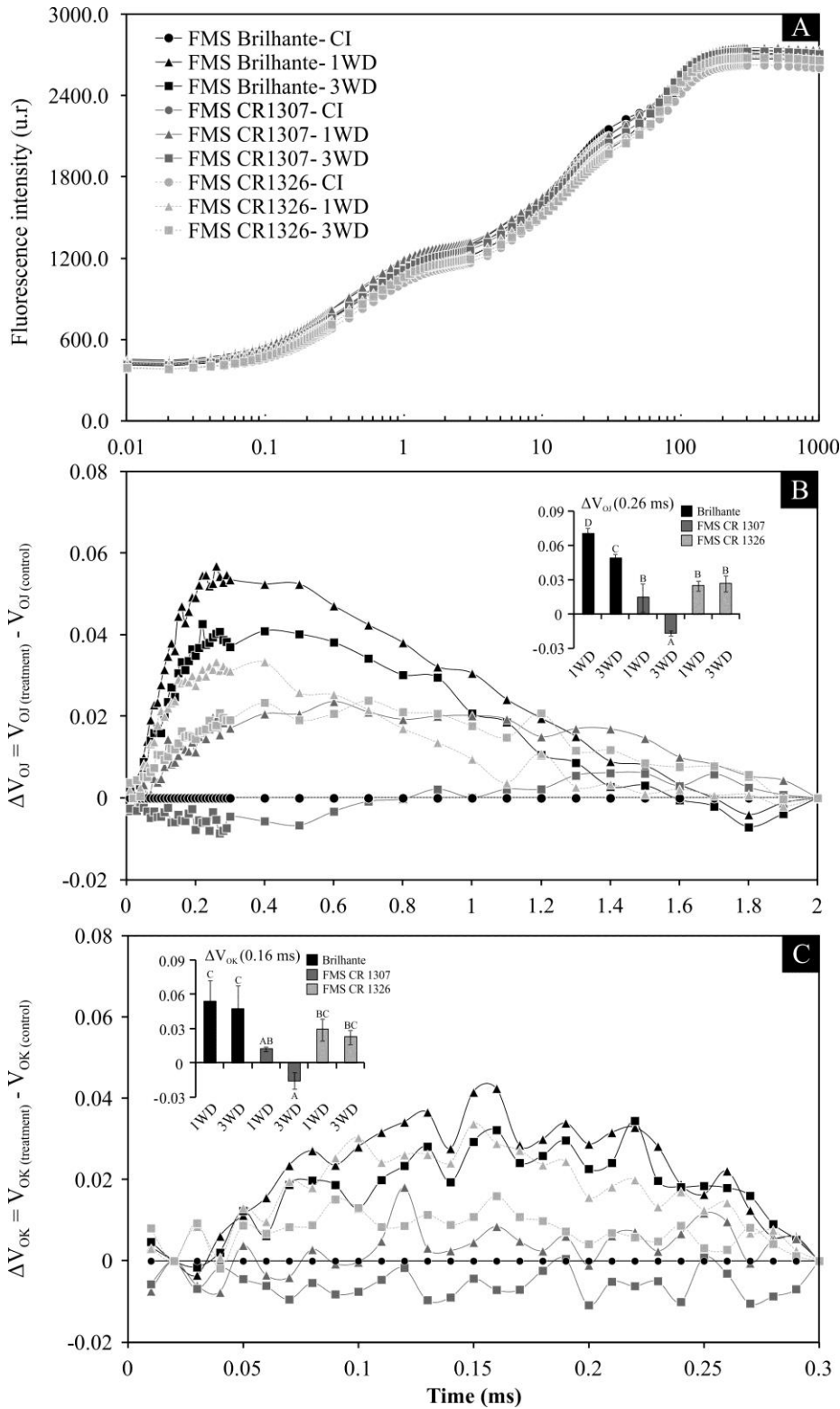


Figure 2 – Fluorescence intensity (a),  $V_{OJ}$  (b), and  $V_{OK}$  (c) obtained through the double normalization of the O-J ( $\Delta V_{OJ} = V_{OJ}(\text{treatment}) - V_{OJ}(\text{control})$ ) and O-K ( $\Delta V_{OK} = V_{OK}(\text{treatment}) - V_{OK}(\text{control})$ ) respectively, of three *C. abyssinica* genotypes submitted to repeated water deficit. Columns followed by the same letter do not differ significantly from each other according to the Tukey test,  $p \leq 0.001$  ( $\pm$ SD).

Table 1 – JIPtest parameters of dark-adapted leaves of three *C. abyssinica* genotypes submitted to repeated water deficit.

FMS Brillhante					
Water regime	ABS/RC	TRo/RC	ETo/RC	DIo/RC	RC/ABS
Continuously irrigated (CI)	1.98 ± 0.09 ns	1.64 ± 0.06 ns	1.08 ± 0.08 ns	0.33 ± 0.02 ns	0.50 ± 0.02 ns
Cycle 1	2.06 ± 0.13 ns	1.70 ± 0.09 ns	1.09 ± 0.07 ns	0.35 ± 0.03 ns	0.48 ± 0.03 ns
Cycle 3	1.94 ± 0.06 ns	1.63 ± 0.04 ns	1.07 ± 0.04 ns	0.31 ± 0.01 ns	0.51 ± 0.01 ns
CV (%)	4.89	4.48	6.53	7.79	4.93
FMS CR 1307					
Water regime	ABS/RC	TRo/RC	ETo/RC	DIo/RC	RC/ABS
Continuously irrigated (CI)	1.80 ± 0.05 b	1.52 ± 0.04 b	1.03 ± 0.04 b	0.28 ± 0.01 b	0.55 ± 0.01 a
Cycle 1	1.96 ± 0.01 a	1.63 ± 0.02 a	1.06 ± 0.03 ab	0.32 ± 0.01 a	0.51 ± 0.00 b
Cycle 3	1.88 ± 0.07 ab	1.58 ± 0.06 ab	1.10 ± 0.04 a	0.29 ± 0.01 b	0.53 ± 0.02 a
CV (%)	2.88	3.02	3.63	5.35	2.77
FMS CR 1326					
Water regime	ABS/RC	TRo/RC	ETo/RC	DIo/RC	RC/ABS
Continuously irrigated (CI)	1.85 ± 0.09 ns	1.55 ± 0.07 b	0.99 ± 0.07 b	0.30 ± 0.02 ns	0.54 ± 0.02 ns
Cycle 1	2.03 ± 0.019 ns	1.76 ± 0.11 a	1.16 ± 0.08 a	0.38 ± 0.07 ns	0.47 ± 0.04 ns
Cycle 3	2.14 ± 0.20 ns	1.68 ± 0.13 ab	1.13 ± 0.07 a	0.35 ± 0.07 ns	0.49 ± 0.05 ns
CV (%)	8.62	6.70	7.09	18.68	8.83

In each JIP test parameter, means followed by the same letter do not differ significantly from each other according to the Tukey test,  $p \leq 0.001$  ( $\pm$ SD).

Table 2 – Growth of *C. abyssinica* genotypes submitted to repeated water deficit.

Water regime	Root dry matter g plant <sup>-1</sup>	Shoot dry matter g plant <sup>-1</sup>	Leaf area per plant (cm <sup>2</sup> )
Continuously irrigated (CI)	2.6 ± 0.0006 C	50.5 ± 0.002 A	3072.07 ± 590.1 A
1DW	4.0 ± 0.0005 B	21.1 ± 0.003 B	1474.28 ± 537.1 B
3DW	4.9 ± 0.0002 A	15.7 ± 0.001 C	1581.28 ± 591.9 B
CV (%)	11.96	9.78	19.31

Different means followed by the same letter do not differ significantly from each other according to the Tukey test,  $p \leq 0.001$  ( $\pm$ SD).

Table 3 –Anatomical structure of *C. abyssinica* genotypes submitted to repeated water deficit.

Water regime	Mesophyll ( $\mu\text{m}$ )	Spongy parenchyma ( $\mu\text{m}$ )
Continuously irrigated		
(CI)	280 $\pm$ 20.65 B	119.31 $\pm$ 14.61 B
1WD	296 $\pm$ 22.26 AB	117.17 $\pm$ 10.45 B
3WD	308 $\pm$ 28.72 A	133.85 $\pm$ 17.82 A
CV (%)	7.49	11.09

Different means followed by the same letter do not differ significantly from each other according to the Tukey test,  $p \leq 0.001$  ( $\pm$ SD).

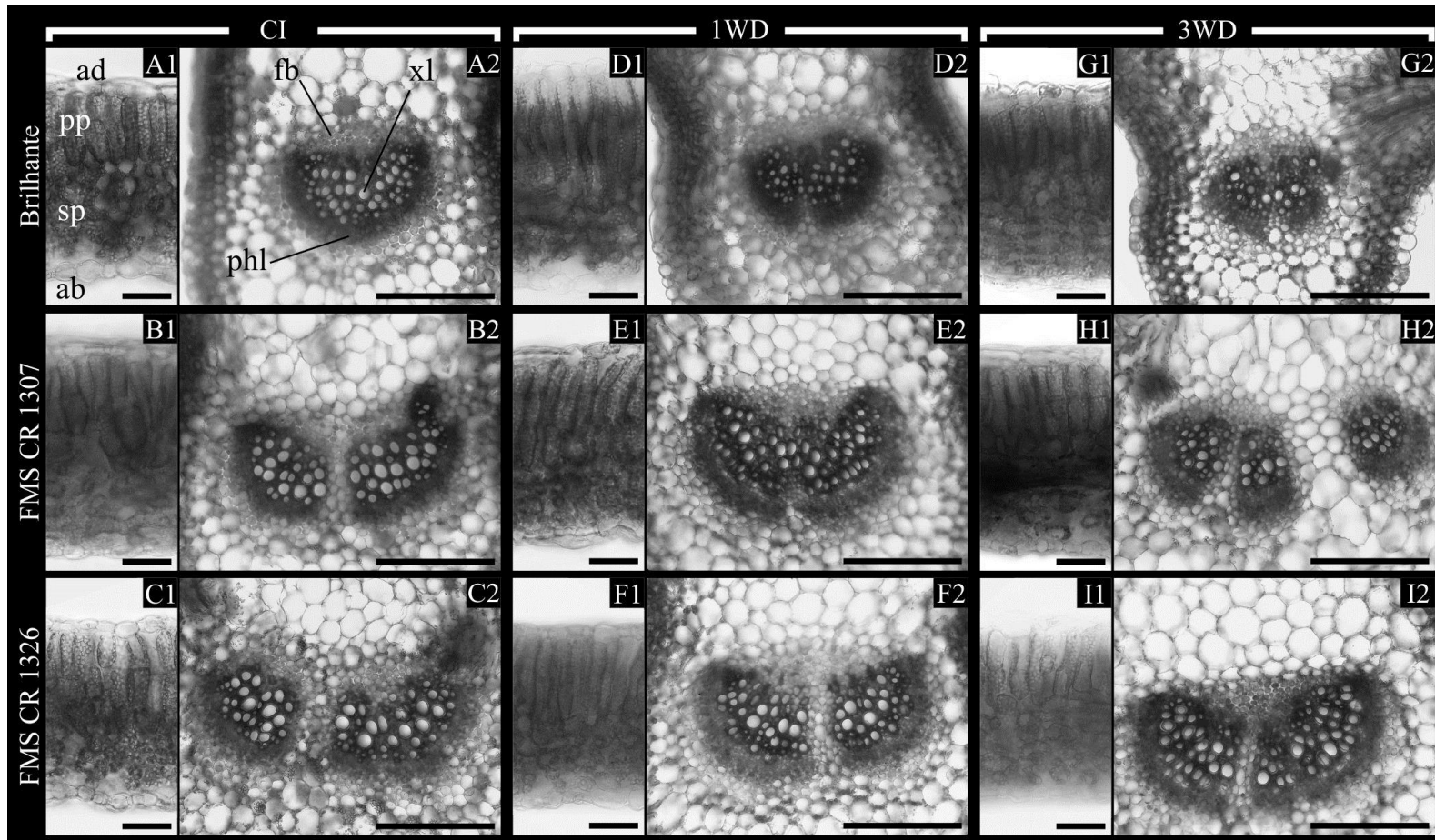


Figure 3 - Cross sections of *C. abyssinica* genotypes submitted to repeated exposures of water deficit. Bar = 50  $\mu$ m, sp – spongy parenchyma; pp – palisade parenchyma; ad – adaxial surface of the epidermis; ab – abaxial surface of the epidermis; xl – xylem; phl – phloem; fb – fibers.

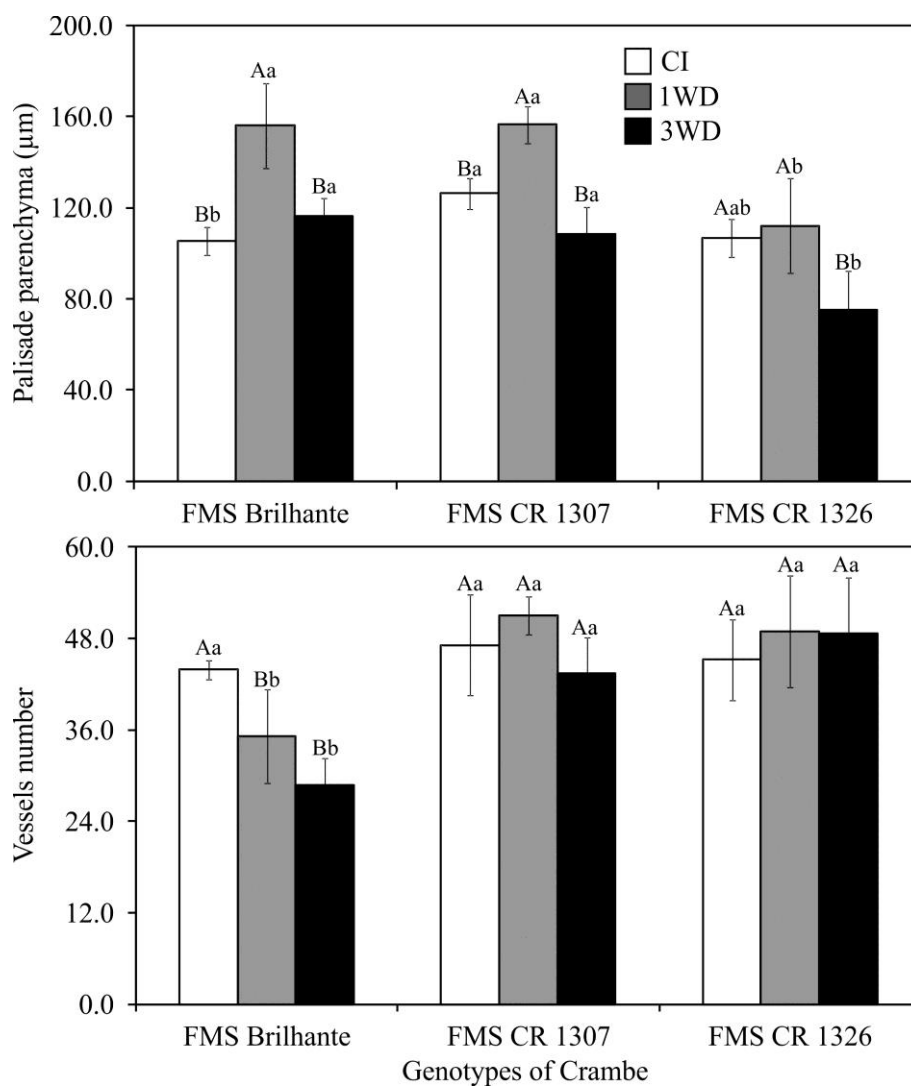


Figure 4 – Palisade parenchyma (a) and number of xylem vessels (b) of three *C. abyssinica* genotypes submitted to repeated water deficit. Columns followed by the same letter, uppercase for water regime and lowercase for genotype, do not differ significantly from each other according to the Tukey test,  $p \leq 0.001$  ( $\pm$ SD).

#### **CAPÍTULO 4 - Efeitos do déficit hídrico no início do florescimento sobre as características ecofisiológicas e de produção de dois genótipos de crambe**

Priscila da Conceição de Souza Braga<sup>1</sup>, João Paulo Rodrigues Martins<sup>2</sup>, Robson Bonomo<sup>3</sup>e Antelmo Ralph Falqueto<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>*Laboratório de Ecofisiologia Vegeral, Universidade Federal do Espírito Santo, Litorâneo, 29932-540 São Mateus, ES, Brasil*

<sup>2</sup>*Laboratorio de Cultura de Tecidos de plantas, Universidade Federal do Espírito Santo, Litorâneo, 29932-540 São Mateus, ES, Brazil*

<sup>3</sup>*Laboratorio de Irrigação de Plantas, Universidade Federal do Espírito Santo, Litorâneo, 29932-540 São Mateus, ES, Brazil*

\*Autor para correspondência: *\*antelmo.falqueto@ufes.br*

Periódico a ser submetido: *Agricultural Water Management*

A formatação de citação, referências, tabelas e figuras deste capítulo seguem as instruções das normas do PPGBV, que consta em <http://www.biologiavegetal.ufes.br/pt-br/normas-ppgbv>.

## RESUMO

O déficit hídrico aplicado no início do período do florescimento pode afetar o crescimento, desenvolvimento e produtividade agrícola, inviabilizando a comercialização de muitas culturas. O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos do déficit hídrico intenso aplicado no início do estágio do florescimento sobre as características fisiológicas, anatômicas e de produção de grãos de dois genótipos de crambe (FMS CR 1307 e FMS CR 1326) e investigar possível dormência causado pelo tratamento de déficit hídrico na progênie, a fim de selecionar genótipos com tolerância à deficiência hídrica. Plantas de crambe (genótipos FMS CR 1326 e 1307) foram cultivadas em vasos de 14,3 L e submetidas ao déficit hídrico por doze dias. O período do déficit hídrico iniciou quando mais da metade (50% + 1) das plantas encontrava-se em inflorescência. Como referência, as plantas foram cultivadas sob irrigação diária (continuamente irrigada - CI). Sob déficit hídrico intenso, reduções na condutância estomática, índice de clorofila e alterações no número de vasos xilemáticos foliar, crescimento da planta e produção foram observados. Além disso, banda K e L positiva ocorreram, indicando menor estabilidade e eficiência na utilização de energia sob déficit hídrico. O genótipo FMS CR 1307 foi capaz de manter o desempenho fotoquímico quando submetidos ao déficit hídrico moderado (06 DH), além de, após o período de déficit hídrico, isto é, na recuperação, possuir um mecanismo de melhor utilização de energia de excitação e maior estabilidade do fotossistema II refletindo maior tolerância ao déficit hídrico. Os resultados mostram que em campos irrigáveis, a irrigação não deve ser suspensa no início do estágio do florescimento. O genótipo FMS CR 1307 apresentou maior tolerância fotoquímica, além de maior vigor da progênie refletindo em maior tolerância ao déficit hídrico.

*Palavras-chave:* • anatomia • *Crambe abyssinica* • estresse hídrico • fluorescência da clorofila a • inflorescência • OJIP • teste JIP



## ABSTRACT

The water deficit applied at the beginning of the flowering period can affect the growth, development and agricultural productivity, making commercialization of many crops impossible. The objective of this study was to analyze the effects of the intense water deficit applied at the beginning of the flowering stage on the physiological, anatomical and grain yield characteristics of two crambe genotypes (FMS CR 1307 and FMS CR 1326) and to investigate possible dormancy caused by treatment of water deficit in the progeny, in order to select genotypes with tolerance to water deficit. Crambe plants (FMS CR 1326 and 1307 genotypes) were cultivated in pots of 14.3 L and submitted to water deficit for twelve days. The period of the water deficit began when more than half (50% + 1) of the plants were in inflorescence. As a reference, the plants were cultivated under daily irrigation (continuously irrigated - CI). Under severe water deficit, reductions in stomatal conductance, chlorophyll index and leaf or petiole vessel elements, plant growth and production were observed. In addition, positive band K and L occurred, indicating lower stability and efficiency in energy use under water deficit. The genotype FMS CR 1307 was able to maintain the photochemical performance when submitted to moderate water deficit (06 WD), besides, after the water deficit period, that is, in the recovery, to have a mechanism of better utilization of excitation energy and greater stability of photosystem II reflecting greater tolerance to water deficit. The results show that in irrigable fields, irrigation should not be suspended at the beginning of the flowering stage. The genotype FMS CR 1307 presented higher photochemical tolerance, besides a higher progeny vigor reflecting in a greater tolerance to the water deficit.

**Key words:**• anatomy • chlorophyll *a* fluorescence•*Crambe abyssinica*• inflorescence •water stress •JIP test •OJIP

**Abreviaturas:**ABS/RC, fluxo de absorção por RC; CEO, complexo de evolução de oxigênio; CI, plantas continuamente irrigadas; DH, déficit hídrico;  $DI_0/RC$ , fluxo de dissipação por RC;  $ET_0/RC$ , fluxo de transporte de elétrons (além de  $Q_A^-$ ) por RC;  $F_0 = F_{20}$   $\mu s$ , fluorescência mínima, quando todos os RCs do FSII estão abertos;  $F_2$  (0,1 ms) e  $F_3$  (0,3 ms), intensidade de fluorescência a 0,1 e 0,3 ms, respectivamente;  $F_4$  (2 ms) e  $F_5$  (30 ms), intensidade de fluorescência no ponto J (2 ms) e no ponto I (30 ms), respectivamente; Fluorescência variável de  $V_{OJ}$  ou banda K entre os pontos O (0,02 ms) e J (2 ms);  $F_M$ , fluorescência máxima, quando todos os RCs FSII estão fechados; FSI, fotossistema I; FSII, fotossistema II;  $g_s$ , condutância estomática;  $PI_{ABS}$ , índice de desempenho para conservação de energia desde éxcitons capturados até a redução dos aceptores de elétrons do intersistema;  $PI_{total}$ , índice de desempenho para conservação de energia de um éxciton capturado para redução dos aceptores finais do FSI;  $Q_A$ , quinona A; RC, centro de reação; RC/ABS, centros e reação redutores de  $Q_A$  por clorofila na antena do

FSII; S<sub>1</sub>CI; plantas controle - progênie das plantas continuamente irrigadas (CI); S<sub>1</sub>DH, progênie das plantas expostas a doze dias de déficit hídrico (DH); TR<sub>0</sub>/RC, Fluxo de energia capturada por RC; V<sub>I</sub>, fluorescência variável normalizada no ponto I (30 ms); V<sub>J</sub>, fluorescência variável normalizada no ponto J (2 ms); V<sub>OK</sub> ou banda L, fluorescência variável entre os passos O (0,02 ms) e K (0,3 ms);  $\phi D_0$ , rendimento quântico fotoquímico para dissipação de calor;  $\phi E_0$ , probabilidade de um fóton absorvido tem de se mover além de Q<sub>A</sub><sup>-</sup>;  $\phi P$ , rendimento quântico fotoquímico máximo para fotoquímica primária;  $\psi E_0$ , probabilidade de um éxciton capturado de se mover para além de Q<sub>A</sub><sup>-</sup>.

## 1. INTRODUÇÃO

O déficit hídrico é o principal fator ambiental que afeta as plantas em todo o mundo (ZHANG et al., 2018). Quando a deficiência hídrica ocorre no período do florescimento das plantas, afeta o crescimento, o desenvolvimento e a produtividade agrícola (ZHANG et al., 2017), o que pode inviabilizar a comercialização de muitas culturas. A principal causa da perda de produção sob estresse hídrico é o declínio da fotossíntese, levando à senescência de flores, impedindo o desenvolvimento de flores (aborto) e, conseqüentemente, a redução do número de grãos (MATHOBO et al., 2017). Além disso, o déficit hídrico no florescimento ainda pode causar impactos negativos às sementes da progênie, uma vez que esse estresse pode causar danos no desenvolvimento do embrião reduzindo a germinabilidade das sementes da progênie (Shi et al., 2018; Farooq et al., 2017). O impacto do estresse hídrico é determinado pela gravidade do estresse e pela capacidade de adaptação das plantas (ROSALES et al., 2012).

O déficit hídrico na fase fenológica do florescimento restringiu o crescimento de algodoeiro herbáceo (*Gossypium hirsutum* L.) cultivar BRS 286 e BRS 336 (CORDÃO et al., 2018). Os autores relataram que a fase fenológica de flor e maçã foram as mais sensíveis ao déficit hídrico. Plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) cultivar CD 105, CD 108, CD 111 submetidas ao déficit hídrico no início do período de florescimento também apresentaram menor produção de fitomassa e de grãos (SANTOS et al., 2012). No entanto, de acordo com os autores, a cultivar CD 111 apresentou maior eficiência na manutenção do potencial produtivo em condições de déficit hídrico. Identificar espécies/genótipos com capacidade de adaptação à ambientes com restrição hídrica é uma valiosa estratégia para se obter incremento na produtividade (VASCONCELOS et al., 2018; ARAÚJO et al., 2013).

O *Crambe abyssinica* Hochst. (crambe) é uma oleaginosa pertencente à família Brassicaceae com características promissoras para uso industrial devido ao seu elevado teor de óleo (30–35%) e conteúdo de ácido erúico (63-64%) (LALAS et al., 2012; WANG et al., 2000), além de possui um enorme potencial de produção de matéria-prima de biodiesel (OLIVEIRA et al., 2015). A cultura de crambe tem uma necessidade máxima ideal que varia entre 150 a 200 mm de água, em pelo menos 50 mm de água após a semeadura, distribuída em duas chuvas, concentrando-se principalmente até o florescimento pleno (PITOL et al., 2010). No Brasil, a região Centro-Oeste é a principal região produtora de crambe, onde a produtividade varia de 1.000 a 1.500 kg ha<sup>-1</sup> (Fundação MS 2014) (BATISTA et al., 2018). Segundo Pitol et al. (2012),

novos genótipos tem sido testados a fim de expandir a cultura e melhorar a produtividade da cultura no Brasil. Atualmente, o genótipo FMS CR 1307 pode ser considerado como material candidato a pré-lançamento e o genótipo FMS CR 1326 ainda está sendo testado pela Fundação Mato Grosso do Sul (Fundação MS) (OLIVEIRA et al., 2015). No entanto, ainda não se tem estudos descritos o quão tolerante / suscetível esses genótipos de crambe são ao déficit hídrico.

Várias regiões do Brasil possuem característica de reduções de chuvas em determinados período do ano. Dessa forma, considerando que os recursos hídricos podem ser limitados tornam-se necessárias técnicas de manejo da irrigação, afim de melhorar a produtividade e reduzir a irrigação, trazendo uma estratégia de irrigação apropriada para melhorar a produtividade da cultura de crambe sob condições de restrição hídrica. A hipótese deste estudo é que o déficit hídrico intenso subsequente recuperação durante a fase de florescimento causam impactos negativos nos parâmetros fisiológicos e anatômicos, resultando em redução na produção de grãos e dormência na progênie. Além disso, o genótipo FMS CR 1307 apresentará tolerância ao déficit hídrico, sendo possível expansão da cultura em ambientes com recorrência de déficit hídrico. O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos do déficit hídrico intenso aplicado no início do estágio do florescimento sobre (1) as características fisiológicas, anatômicas e de produção de grãos de dois genótipos de crambe (FMS CR 1307 e FMS CR 1326) e (2) investigar possível dormência causado pelo tratamento de déficit hídrico na progênie, a fim de selecionar genótipos com tolerância à deficiência hídrica.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 *Material vegetal e design experimental*

O experimento foi conduzido em casa de vegetação localizada na Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil (18 ° 43 'S, longitude 39 ° 51' W, altitude de 39 m). Sementes de *Crambe abyssinica* Hochst. (genótipos FMS CR 1326 e 1307) foram obtidos da Fundação Mato Grosso do Sul (Fundação MS), Maracaju / MS. As sementes foram previamente desinfestadas com etanol a 70% por 2 min., hipoclorito de sódio a 1% (v / v) por 20 min. e o fungicida Ridomil® por 10 minutos, seguido de lavagem tripla com água destilada autoclavada e colocados para germinar em vasos de 14,3 L (15 sementes por vaso) preenchidos com solo (75,5% areia, 17,2% argila e 5,2% silte). Previamente, a análise química do solo foi feita para correção de nutrientes e pH, seguindo as recomendações de Oliveira et al. (1991). Trinta gramas de superfosfato simples foram adicionados a cada 30 dias durante o experimento. Além disso, as aplicações de inseticidas (Evidence®) e fungicidas (Ridomil®) foram feitas de acordo com o manual de cultura. Após 20 dias da semeadura foi realizado o desbaste permanecendo apenas uma planta por vaso.

Os vasos foram irrigados diariamente para manter a umidade do solo em torno de 80% da capacidade de campo ( $\cong 0.20 \text{ m}^3 / \text{m}^3$ ) até iniciar o período da floração das plantas, quando foram divididas em dois grupos distintos: (1) plantas continuamente irrigadas (CI) e (2) plantas submetidas ao déficit hídrico (DH). O tratamento de déficit hídrico iniciou-se quando mais da metade (50% + 1) das plantas encontravam-se em inflorescência. Para os genótipos FMS CR 1326 e FMS CR 1307, o período do florescimento iniciou-se após 53 e 42 dias após a semeadura, respectivamente.

O déficit hídrico foi imposto pela suspensão da irrigação por um período de doze dias (determinado em estudos preliminares) após o início do período da floração. Após este período, a irrigação das plantas foi retomada diariamente (período de recuperação) mantendo a umidade do solo em torno de 80% da capacidade de campo, até o final do experimento (término do ciclo da cultura, ou seja, 110 após a semeadura). É importante mencionar que, após 12 dias sob déficit hídrico, sintomas visuais de murcha nas folhas foram evidentes em todas as plantas. Ainda, como a semeadura não foi escalonada, as avaliações foram realizadas em tempos diferentes para cada genótipo. Vale ressaltar que, devido ao pouco conhecimento sobre os genótipos de crambe FMS CR 1326 e 1307 (OLIVEIRA et al., 2015), não foi empregada uma semeadura escalonada. Todas

as medidas foram realizadas entre as 5 as 10 horas em folhas completamente expandidas (terceira ou quarta folha a partir do ápice).

### *2.2 Umidade do solo e déficit pressão de vapor (DPV)*

Os níveis de água do solo ( $\text{m}^3 / \text{m}^3$ ) foram monitorados utilizando-se um sensor de água do solo (ProCheck, versão 4, Dispositivos Decagon). A temperatura do ar e umidade relativa (UR) foram medidas em intervalos de 1 hora usando registradores de dados (Termo-higrômetro, Logger – Klimalogg Pro). Esses parâmetros também foram usados para determinar o déficit de pressão de vapor (DPV), calculado usando-se a fórmula  $\text{DPV} = [\text{pressão saturado de vapor (kPa)} - \text{pressão atual de vapor (kPa)}]$ .

### *2.3 Condutância estomática, índice de clorofila e fluorescência da clorofila a*

A condutância estomática ( $g_s$ ), o índice de clorofila e a fluorescência transiente da clorofila *a* foram medidas em nove plantas de cada tratamento. A condutância estomática ( $g_s$ ) foi medida na superfície foliar abaxial utilizando-se um porômetro foliar (SC-1Leaf Porometer, dispositivos Decagon). O índice de clorofila foi medido com um medidor de clorofila portátil (ClorofiLOG, modelo CFL 1030).

A fluorescência transiente da clorofila *a* foi medida utilizando um fluorômetro portátil (Handy-PEA, Hansatech, UK). As folhas foram previamente adaptadas ao escuro por 20 minutos utilizando-se cliques foliares (Hanstech) para a oxidação completa do sistema fotossintético. A intensidade da luz que atingiu a folha foi de  $3000 \mu\text{mol (fótons)} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , suficiente para gerar a fluorescência máxima para todas as amostras. A fluorescência transiente ( $F_0$  a  $F_M$ ) foi registrada de 10  $\mu\text{s}$  a 1 s. A intensidade de fluorescência a 20  $\mu\text{s}$  ( $F_0$ ), 100  $\mu\text{s}$ , 300  $\mu\text{s}$ , 2 ms ( $F_T$ ) e 30 ms ( $F_I$ ) e fluorescência máxima ( $F_M$ ) foram registradas e analisadas de acordo com o teste JIP (STRASSER et al., 2004; STIBERT e GOVINDJEE, 2011).

### *2.4 Anatomia foliar*

Após o período do déficit hídrico (12 dias) e sucessiva recuperação (12 dias), foi determinado o número de vasos xilemáticos foliar para cada tratamento em sete plantas. As amostras foram coletadas aleatoriamente e fixadas em FAA (formaldeído, ácido acético e etanol a 50%, 0,5: / 0,5 / 9, v / v) por 72 horas, seguidas de armazenamento em etanol a 50%

(JOHANSEN, 1940). Secções transversais foram obtidas com uma navalha de borda dupla na região média da terceira folha totalmente expandida. As secções foram clarificadas com hipoclorito de sódio a 2,5% (v / v) e depois coradas com solução de safrablau. As secções foram visualizadas e as imagens capturadas com um microscópio de luz Leica DM 1000 acoplado a uma câmara digital Leica ICC50 HD (Wetzlar, Alemanha). O software UTHSCSA-Imagetool® foi utilizado para medir as características anatômicas reveladas pelas fotomicrografias.

### *2.5 Crescimento da planta e produção de grãos*

No último dia do período experimental (110 dias após a semeadura) foi avaliada a massa seca da raiz e parte aérea em dezesseis plantas de cada tratamento. A massa seca da raiz e parte aérea foi determinada através do peso seco em gramas (g) após as plantas serem acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa de circulação forçada durante 72 horas a 60° C.

A massa de 100 grãos e produção por planta foi avaliada após colheita e secagem dos grãos. A massa de 100 grãos foi avaliada pela contagem e pesagem de 8 amostras de 100 grãos de cada tratamento. A produção de grãos por planta foi obtida por meio da pesagem em balança de precisão dos grãos produzidos por planta de cada tratamento. Para a massa de 100 grãos e produção de grãos por planta, foi feita a correção para 13% de umidade.

### *2.6 Germinação da progênie*

Após o período experimental (110 dias após a semeadura), sementes de cada tratamento foram colhidas, colocadas para devida secagem e em seguida colocadas para germinar e são descritas como: sementes S<sub>1</sub>CI [plantas controle - progênie das plantas continuamente irrigadas (CI)] e S<sub>1</sub>DH [progênie das plantas expostas a doze dias de déficit hídrico (DH)]. Para determinação da porcentagem de germinação (%G) e índice de velocidade de germinação (IVG), as sementes de crambe foram previamente esterilizadas com solução de etanol 70% por 2 min., hipoclorito de sódio a 1% v/v por 20 min. e fungicida Ridomil® por 10min., seguidas por tríplice lavagem com água destilada autoclavada. As sementes foram acondicionadas em caixa de gerbox (11 x 11 x 3 cm) sob papal filtro, umedecida com 10 ml de água destilada e autoclavada e colocadas para germinar em sala de crescimento a 25 °C, sob fotoperíodo de 16 h de luz e 8 h escuro. A porcentagem de germinação (% G) foi determinada de acordo com o critério de emissão de radícula e o índice de velocidade de germinação (IVG) foram medidos durante sete

dias de acordo com Brasil (2009), que foi calculado conforme descrito por Maguire (1962) usando a fórmula  $\%G = (\sum ni/N) \times 100$  e  $IVG = (G1/N1) + (G2/N2) + \dots (Gn/n)$

Onde: %G = porcentagem de germinação por emissão da radícula;

$\sum ni$  - número total de sementes germinadas;

N - número de sementes colocadas para germinar;

IVG - índice de velocidade de germinação;

G1, G2, Gn - número de sementes germinadas no primeiro, segundo e último dia;

N1, N2 e Nn - dias desde a sementeira do primeiro, segundo e último dia.

## 2.7. *Análise estatística*

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial, com dois regimes de irrigação [plantas continuamente irrigadas (CI) – 80% da capacidade de campo – aproximadamente  $0,20 \text{ m}^3/\text{m}^3$  de umidade no solo e plantas submetidas ao déficit hídrico – (DH - doze dias de suspensão da irrigação] e dois genótipos de crambe (FMS CR 1326 e 1307), com dezesseis repetições (vasos/uma planta por vaso) por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$  ou  $p < 0,001$ ) foram aplicadas aos fatores (tempo de monitoramento e regime hídrico; genótipos e regime hídrico) utilizando o programa estatístico Sisvar® (FERREIRA, 2011).



### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Condições de temperatura e déficit de pressão de vapor (VPD) na casa de vegetação

As temperaturas médias do ar durante o período experimental foram distintas, devidos genótipos (FMS CR 1307 e 1326) iniciarem o período da floração em tempos diferentes (Fig. 1) (ver material e métodos). As temperaturas médias máximas foram obtidas aos 12 dias de recuperação (12RH) para o genótipo FMS CR 1326 (Fig. 1A) e aos 09 dias de déficit hídrico (9DH) para o FMS CR 1307 (Fig. 1B) (~25,6 e ~23,7 °C, respectivamente), enquanto as temperaturas mínimas foram registradas aos 03 dias de recuperação (3RH) para os dois genótipos de crambe (~20,4 e ~20,2, respectivamente).

O déficit de pressão de vapor (VPD) foi maior aos 09 dias de déficit hídrico (9DH) para ambos os genótipos avaliados (~1,26 e ~1,9 KPa, respectivamente) (Fig. 1A e B). Por outro lado, os menores valores de VPD foram registrados aos 3DH para o genótipo FMS CR 1326 (~0,59 KPa) e aos 12RH para o genótipo FMS CR 1307 (~0,46 KPa).

#### 3.2 Condutância estomática ( $g_s$ ) e umidade do solo

Reduções significativas ( $p \leq 0,001$ ) nos valores da condutância estomática ( $g_s$ ) nas plantas de crambe expostas a doze dias de déficit hídrico (DH) e sucessiva recuperação (RH) foram observados. Reduções dos valores da umidade do solo ocorreram a partir do terceiro dia de déficit hídrico (3DH) para ambos os genótipos de crambe (~61,9 e ~171,8  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , para FMS CR 1326 e 1307, respectivamente) (Fig. 2). Os menores valores de  $g_s$  foram observados aos 12 dias de déficit hídrico (DH) (~7,0 e ~10  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para FMS CR 1326 e 1307, respectivamente). No período da recuperação (RH), os genótipos FMS CR 1307 e 1326 apresentaram aumentos em  $g_s$  (03 e 12 RH). No entanto, os maiores valores de  $g_s$  nesse período foram observados aos 12 dias de recuperação hídrica (RH) para o genótipo FMS CR 1326, um aumento de 21,3% em comparação ao genótipo FMS CR 1307 (Fig. 2A e B).

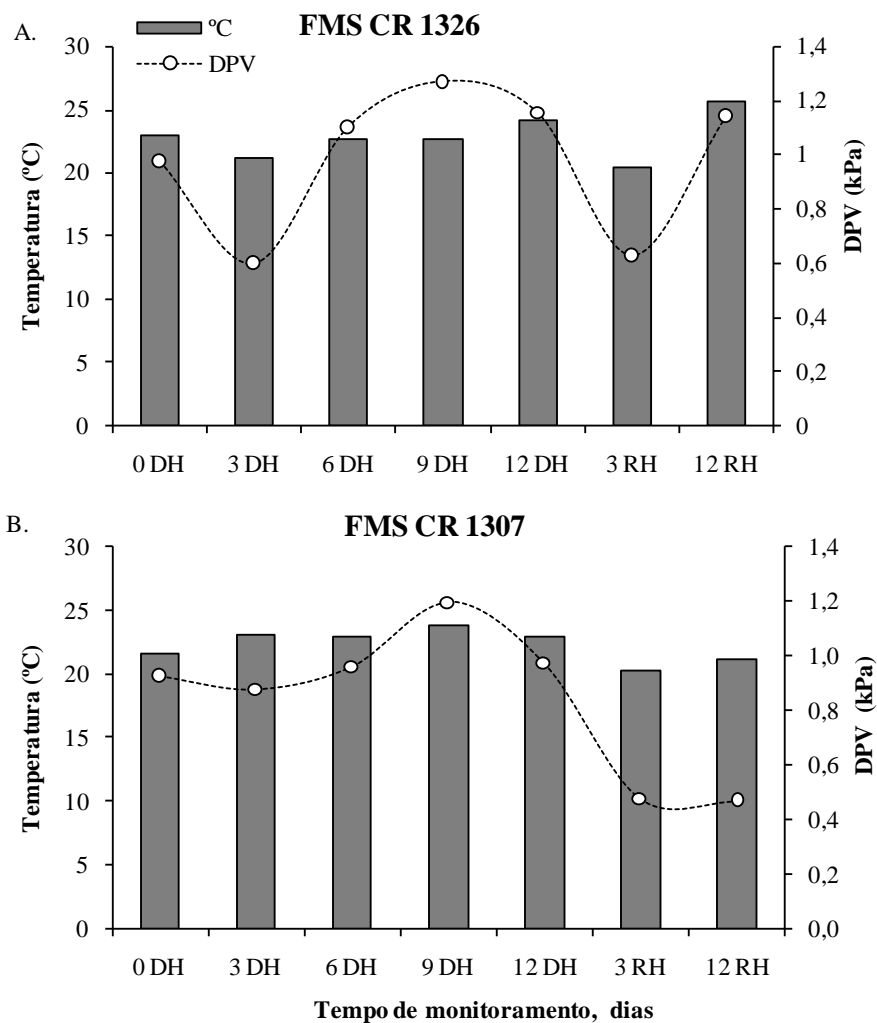


Figura 1 – Temperatura do ar (colunas – escala da ordenada principal à esquerda) e déficit de pressão de vapor (DPV) (linha – escala ordenada secundária à direita) durante a exposição do déficit hídrico e posterior recuperação no período do início da floração de dois genótipos de crambe, FMS CR 1326 (A) e FMS CR 1307 (B). Os dados apresentados são médias das temperaturas das 05:30 às 10:30 hs, ou seja o período na qual foram realizadas as análises.

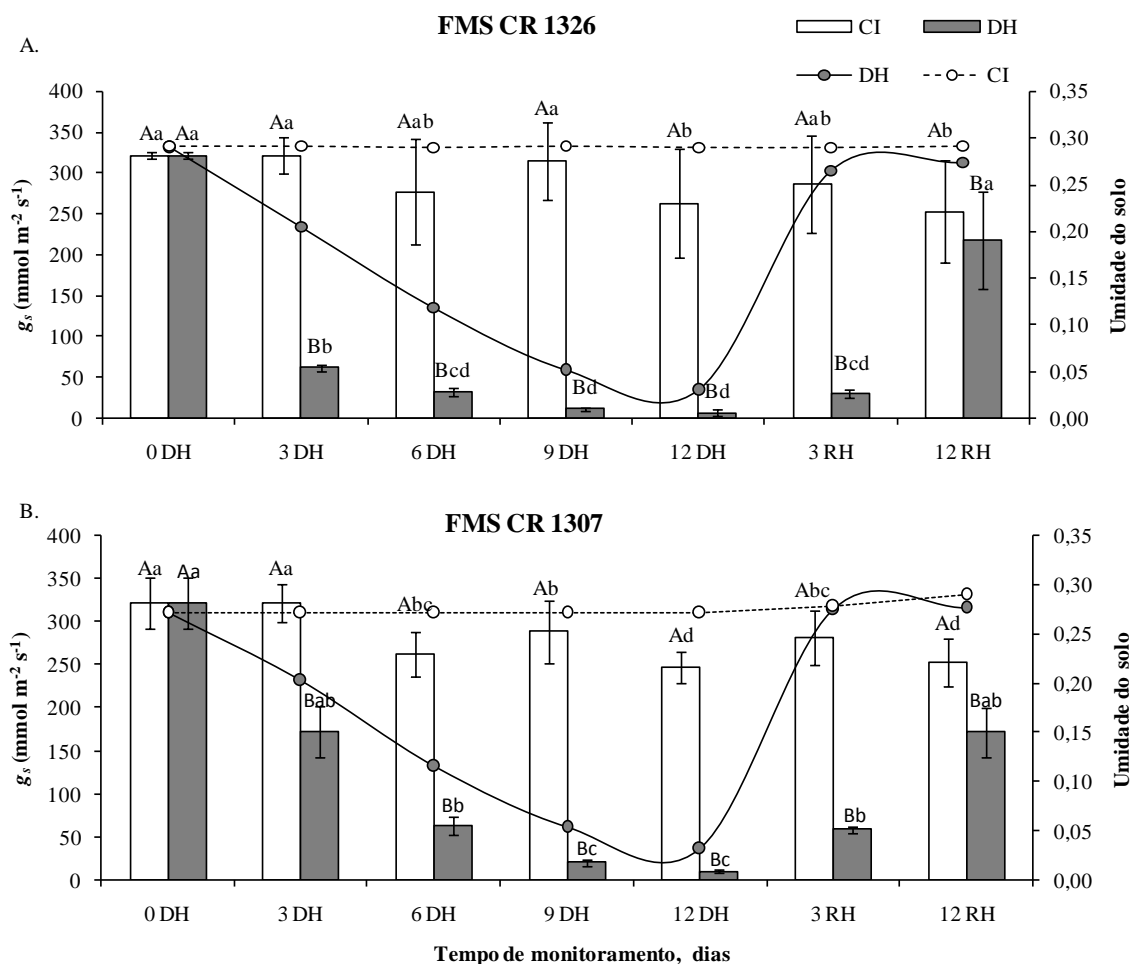


Figura 2 – Condutância estomática  $g_s$  (colunas – escala da ordenada principal à esquerda) em relação à umidade do solo (linha – escala ordenada secundária à direita) de dois genótipos de *C. abyssinica*, FMS CR 1326 (A) e FMS CR 1307 (B) submetidos ao déficit hídrico e posterior recuperação, CI – plantas continuamente irrigadas e DH – déficit hídrico. Colunas seguidas da mesma letra, maiúscula para regime hídrico e minúsculas para os data de monitoramento, não diferiram significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey,  $p \leq 0,001$  ( $\pm$ SD).

### 3.3 Índice de clorofila e fluorescência transiente da clorofila a - OJIP e teste JIP

Índice de clorofila total diferiu significativamente ( $p \leq 0,001$ ) em função dos regimes hídricos e as datas do período experimental (Fig. 3). Aumentos no índice de clorofila total foram observados para os dois genótipos de crambe à medida que o déficit hídrico ficou mais intenso, ou seja, aos 09 e 12 dias de déficit hídrico. Entretanto, ambos os genótipos não apresentaram recuperação total no índice de clorofila total, comparativamente ao dia 0DH.

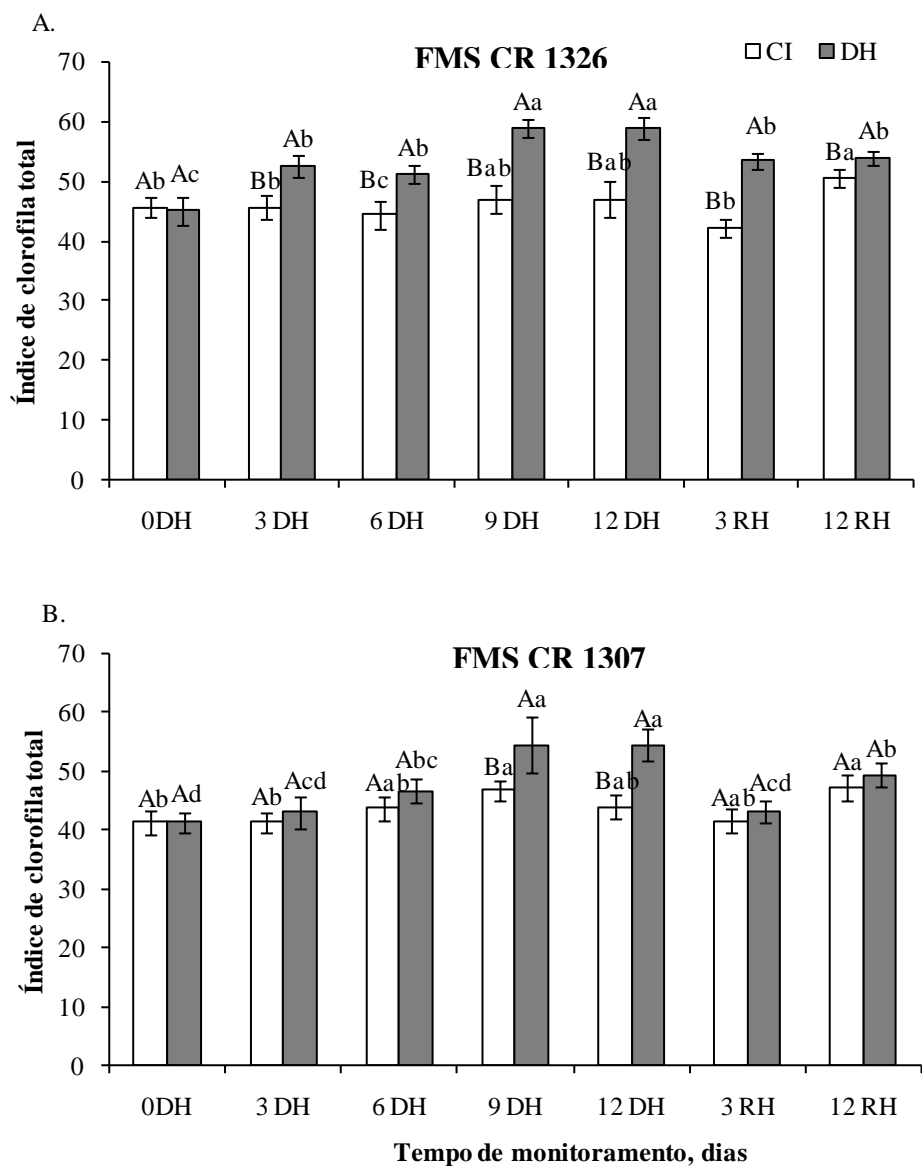


Figura 3 – Índice de clorofila de dois genótipos de *C. abyssinica*, FMS CR 1326 (A) e FMS CR 1307 (B) submetidos ao déficit hídrico e posterior recuperação, CI – plantas continuamente irrigadas e DH – déficit hídrico. Colunas seguidas da mesma letra, maiúscula para regime hídrico e minúsculas para os data de monitoramento, não diferiram significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey,  $p \leq 0,001$  ( $\pm$ SD)

Ambos os genótipos expostos ao déficit hídrico intenso no período da floração e recuperação mostraram uma curva típica polifásica OJIP desde um nível basal ( $F_0$ ) para um nível máximo ( $F_m$ ), com pontos J e I bem definidos (Fig. 4). Aumentos nos valores de  $V_J$  no genótipo FMS CR 1326, nas plantas submetidas a 03, 06, 09 e 12 dias de déficit hídrico (~0,42, 0,41, 0,41 e 0,38 respectivamente) comparativamente ao dia 0DH (~0,33), foram observados. No entanto, as

plantas desse genótipo apresentaram recuperação nos valores de  $V_I$  aos 03 e 12 dias de recuperação do déficit hídrico. Aumentos também foram observados em  $V_I$  (~0,76, 0,81, 0,82 e 0,80) aos 03, 06, 09 e 12 dias de déficit hídrico (inserção Fig. 4A) ( $p \leq 0,001$ ). Contudo, para os valores de  $V_I$  a recuperação do déficit hídrico (03 e 12 dias de recuperação) não foi completa, ou seja, os valores de  $V_I$  não reduziram comparativamente aos valores do dia 0DH. Por outro lado, o genótipo FMS CR 1307 não apresentou aumentos significativos em  $V_I$  no decorrer dos 12 dias de déficit hídrico (12DH) e recuperação ( $p \geq 0,05$ ), mas, aumentos nos valores de  $V_I$  ( $p \leq 0,001$ ) nas plantas submetidas a 03, 06, 09 e 12 dias de déficit hídrico foram observados (inserção Fig. 4B). Similarmente ao genótipo FMS CR 1326, o genótipo FMS CR 1307 também não apresentou recuperação completa dos valores de  $V_I$ , comparativamente ao dia 0DH.

A fluorescência variável relativa entre os passos O e J [obtidos em 0,02 e 2 ms, respectivamente e apresentados como  $V_{OJ} = (F_I - F_0) / (F_J - F_0)$ ] e entre os pontos O e K [(0,02 e 30 ms, respectivamente) , apresentado como  $V_{OK} = (F_I - F_0) / (F_K - F_0)$ ] foram normalizados e são mostrados como as diferenças cinética  $\Delta V_{OJ} = V_{OJ}(\text{tratamento}) - V_{OJ}(\text{controle})$  e  $\Delta V_{OK} = V_{OK}(\text{tratamento}) - V_{OK}(\text{controle})$ , respectivamente (Fig. 5). A diferença cinética  $\Delta V_{OJ}$  e  $\Delta V_{OK}$  tornar as bandas K e L visíveis, respectivamente. As bandas tem um pico em torno de 0,27 e 0,15 ms, respectivamente.

No geral, bandas K e L com amplitudes positivas foram reportadas para todos os genótipos de crambe analisados (Fig. 5A - F). No genótipo FMS CR 1326, a estabilidade do complexo de evolução do oxigênio (CEO) (banda K) (Fig. 5A) e a conectividade energética (banda L) diminuiu ( $p \leq 0,001$ ) (Fig. 5C) à medida que se aumentava a intensidade de déficit hídrico. Entretanto, aos 12RH as plantas do genótipo FMS CR 1326 não apresentaram completa recuperação da estabilidade do CEO (banda K) e da conectividade energética (banda L), comparativamente ao dia 0 déficit hídrico (DH). Diferentemente, o genótipo FMS CR 1307 (Fig. 5B e D) apresentou redução na estabilidade do CEO (banda K) (Fig. 5B) e conectividade energética (banda L) (Fig. 5D) apenas aos 09 e 12DH. Amplitudes negativas foram observadas aos 06 e 03DH e também para o período de recuperação (03 e 12RH). Ao comparar os genótipos, menores valores da banda K e L foram reportados para o genótipo FMS CR 1307 durante o período do déficit hídrico e recuperação (Fig. 5E e F).

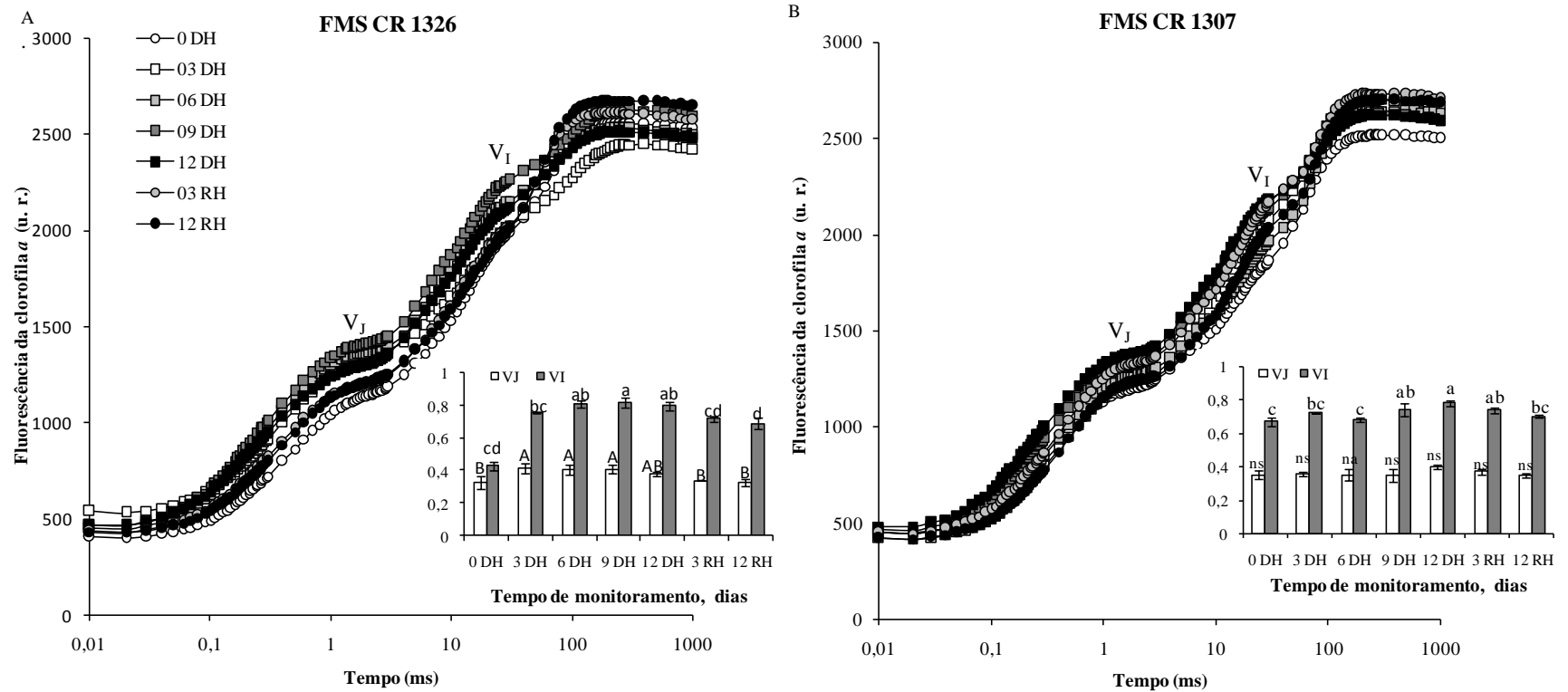


Figura 4 - Fluorescência transiente da clorofila *a* de dois genótipos de *C. abyssinica*, FMS CR 1326 (A) e FMS CR 1307 (B) submetidos ao déficit hídrico e posterior recuperação. A fluorescência variável relativa entre  $F_0$  e  $F_M$  mostrando a fluorescência relativa variável no ponto J ( $V_J$ ) e o ponto I ( $V_I$ ) em função dos tratamentos de déficit hídrico (insersão), DH – déficit hídrico e RH – recuperação hídrica. Colunas seguidas da mesma letra, maiúscula para  $V_J$  e minúsculas para  $V_I$ , não diferiram significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey,  $p \leq 0,001$  ( $\pm$ SD).

Um amplo conjunto de parâmetros do teste JIP foi usado para estimar o desempenho do aparato fotossintético das plantas de cramebe antes, durante e após o tratamento de déficit hídrico (Fig. 6). Todos os dados foram normalizados em 0 dia de déficit hídrico (0DH) e variaram significativamente em função dos regimes hídricos e dos dias sob déficit hídrico/recuperação ( $p \leq 0,05$  ou  $p \leq 0,001$ ). Para o genótipo FMS CR 1326 (Fig. 6A), o déficit hídrico induziu aumentos em  $F_0$ . Entretanto, os valores de  $F_M$  variaram pouco durante todo o período do experimento ( $p \geq 0,05$ ). Reduções nos valores de  $F_v/F_0$ , na taxa líquida de fechamento do FSII ( $S_m$ ) e aumentos da taxa relativa de redução de  $Q_A$  ( $M_0$ ) foram observados sob déficit hídrico ( $p \leq 0,001$ ). No entanto, no período da recuperação as plantas desse genótipo apresentaram recuperação total de  $F_v/F_0$  e  $S_m$  e parcial de  $M_0$  aos 12 dias de déficit hídrico.

Quando analisados os parâmetros dos fluxos específicos de energia (fluxo por RC de FSII), aumentos nos valores do fluxo de absorção ( $ABS/RC$ ), captura ( $TR_0/RC$ ), transporte ( $ET_0/RC$ ) e dissipação ( $DI_0/RC$ ) por centro de reação foram observados ( $p \leq 0,001$ ;  $DI_0/RC$ ,  $p \geq 0,05$ ). Inversamente, os centros de reação redutores de  $Q_A$  por clorofila no complexo antena do FSII ( $RC/ABS$ ) reduziram-se em resposta ao déficit hídrico ( $p \leq 0,001$ ). Para os valores de rendimento quântico da fotoquímica primária ( $\phi P_0$ ) houve pouca variação durante o período do experimento ( $p \geq 0,05$ ). Contudo, os valores do rendimento quântico do transporte de elétrons ( $\phi E_0$ ) e a probabilidades de um éxciton capturado mover-se para além da  $Q_A^-$  ( $\psi E_0$ ) reduziram significativamente ( $p \leq 0,001$ ). Por outro lado, o rendimento quântico para a dissipação de energia ( $\phi D_0$ ) foram maiores ( $p \geq 0,05$ ). Finalmente, os índices de desempenho ( $PI_{ABS}$  e  $PI_{Total}$ ) mostraram que o déficit hídrico resultou em reduções em  $PI_{ABS}$  e  $PI_{Total}$ . Contudo, as plantas desse genótipo apresentaram recuperação progressiva de  $PI_{ABS}$  e  $PI_{Total}$  (03 e 12 recuperação RH) ( $p \leq 0,001$ ). No geral, as plantas do genótipo FMS CR 1326 apresentaram maior prejuízo ao aparato fotossintético aos 03 e 12 dias de déficit hídrico, por meio dos parâmetros de teste JIP. Ainda, os parâmetros do teste JIP não apresentaram completa recuperação após 12 dias de recuperação hídrica para esse genótipo.

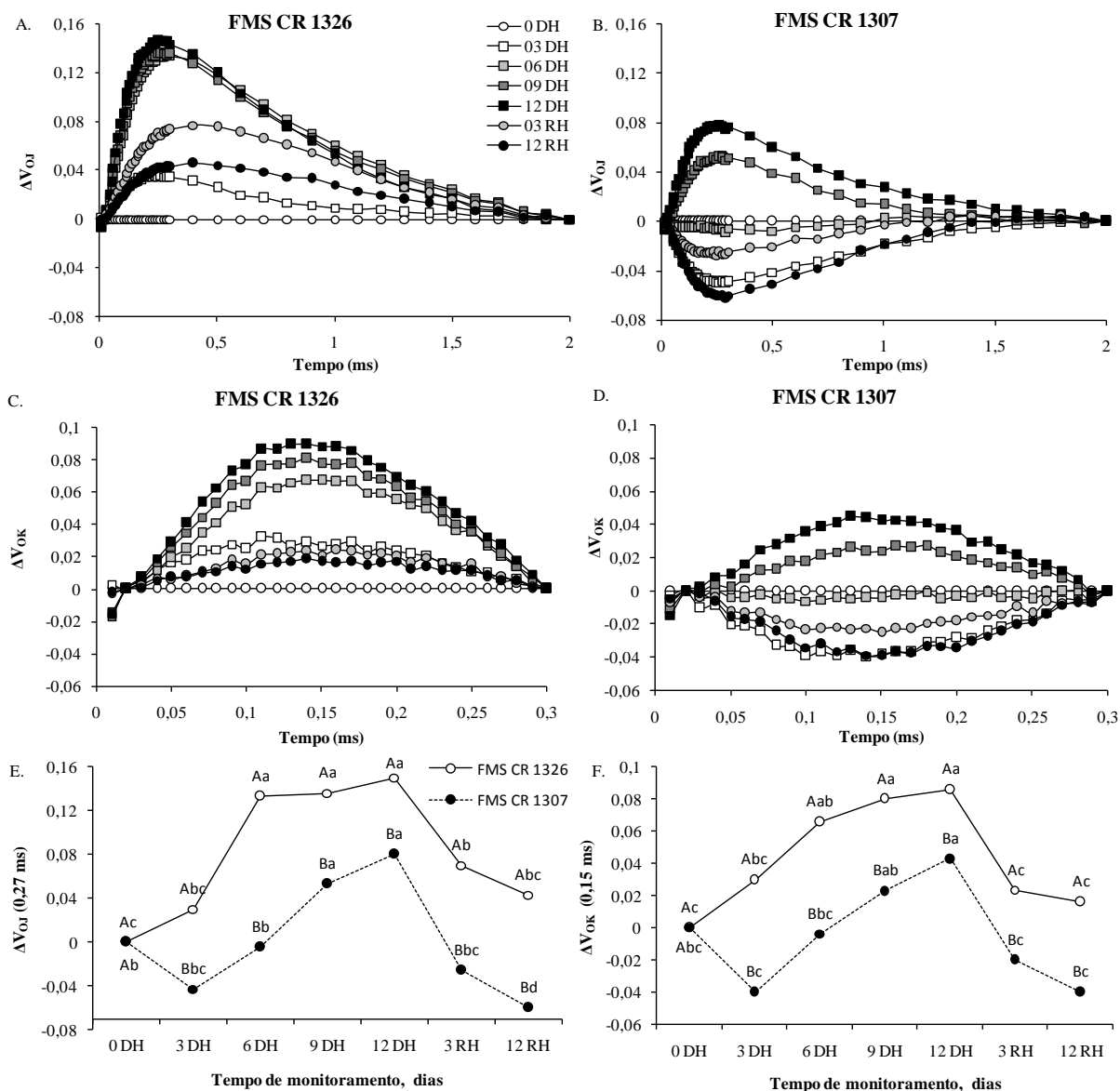


Figura 5 - Diferença cinética de  $V_{OJ}$  (A, B e E) e  $V_{OK}$  (C, D e F) obtidos através da dupla normalização da fase O-J ( $\Delta V_{OJ} = V_{OJ}(\text{tratamento}) - V_{OJ}(\text{controle})$ ) e O-K ( $\Delta V_{OK} = V_{OK}(\text{tratamento}) - V_{OK}(\text{controle})$ ) respectivamente, em dois genótipos de crambe FMS CR 1326 e FMS CR 1307 submetidas a déficit hídrico e posterior recuperação, DH – déficit hídrico e RH – recuperação hídrica. Linhas seguidas da mesma letra, maiúscula para regime hídrico e minúsculas para data de monitoramento, não diferiram significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey,  $p \leq 0,001$ .



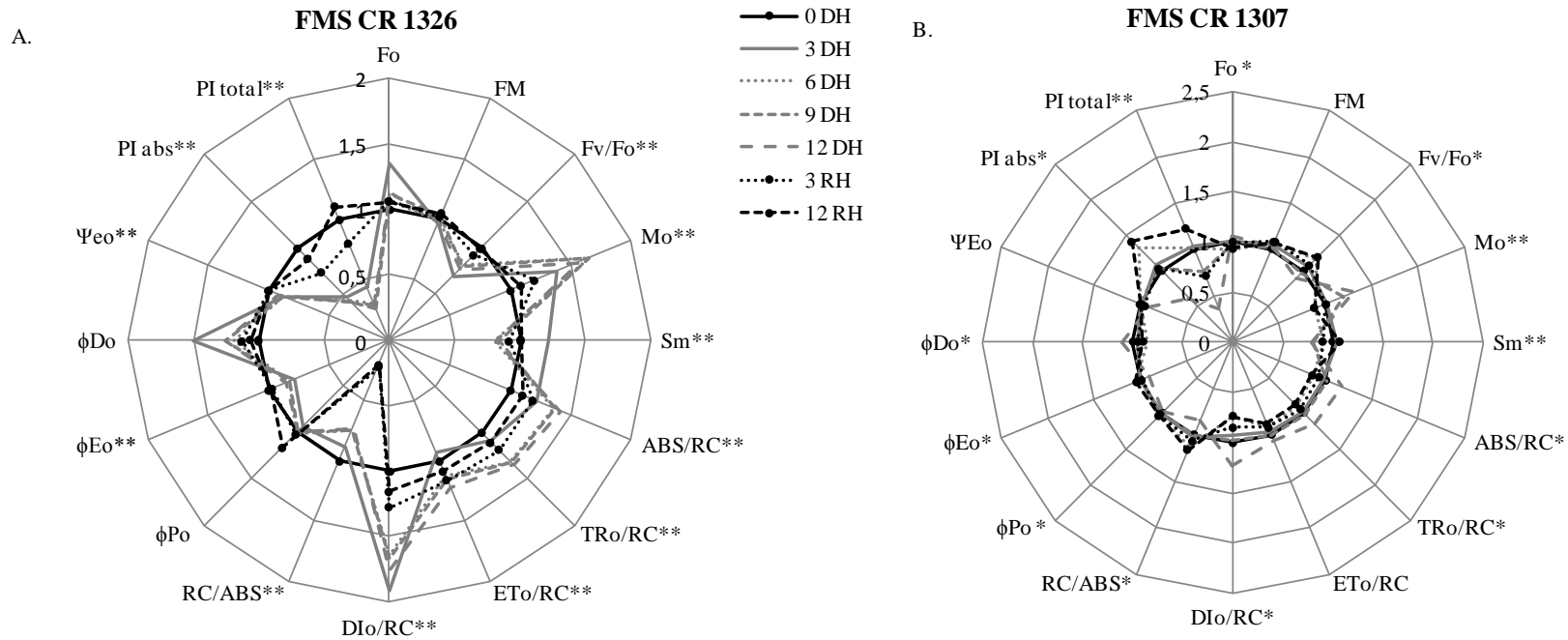


Figura 6 - Gráfico de radar dos parâmetros da fluorescência transiente da clorofila *a* deduzidos a partir da análise do teste JIP de plantas de dois genótipos de crambe FMS CR 1326 (A) e FMS CR 1307 (B) submetidas a déficit hídrico e posterior recuperação, DH – déficit hídrico e RH – recuperação hídrica. Médias seguidas de asterisco são significativamente diferentes em relação as datas de monitoramento sob déficit hídrico e recuperação de acordo com o teste de Tukey,  $p \leq 0,001$ .

O genótipo FMS CR 1307 apresentou resposta diferente quando submetido ao déficit hídrico (Fig. 6B). Aumentos de  $F_0$  ( $p \leq 0,05$ ) foram observados aos 12DH. Contudo, similarmente ao genótipo FMS CR 1326, os valores de  $F_M$  variaram pouco durante todo o período do experimento ( $p \geq 0,05$ ). Reduções nos valores de  $F_v/F_0$  aos 12DH e aumentos de  $M_0$  aos 09 e 12 DH foram observados. Entretanto, reduções em  $S_m$  foram observadas em 12DH ( $p \leq 0,05$ ). Aumentos nos parâmetros fluxos específicos de energia (fluxo por RC de FSII) também foram observados, entretanto, apenas para o 12º dia de DH para ABS/RC,  $TR_0/RC$ ,  $ET_0/RC$  e  $DI_0/RC$  ( $p \leq 0,05$ ;  $ET_0/RC$ ,  $p \geq 0,05$ ). O genótipo FMS CR 1307 apresentou redução de 19,6, 16,5, 14,1 e 66,2%, respectivamente, para os parâmetros de fluxos específicos de energia aos 12DH, comparativamente ao FMS CR 1326. No entanto, similarmente ao genótipo FMS CR 1326, os valores de RC/ABS reduziram-se sob déficit hídrico, exceto para as plantas sob recuperação (03 e 12 RH), para as quais, aumentos de RC/ABS ( $p \leq 0,05$ ) foram descritos. Reduções nos valores de  $\phi P_0$  e  $\phi E_0$  e aumento de  $\phi D_0$  ( $p \leq 0,05$ ) aos 12DH foram observados. Entretanto, a redução dos parâmetros do teste JIP não resultaram limitações nos índices de desempenho ( $PI_{ABS}$  e  $PI_{total}$ ), uma vez que as plantas, aos 12RH, apresentaram aumento de 18.0% em relação ao dia 0 DH ( $PI_{ABS}$ ,  $p \leq 0,05$ ;  $PI_{total}$   $p \leq 0,001$ ).

### 3.4 Anatomia foliar

A anatomia das folhas diferiu significativamente ( $p \leq 0,05$ ) no número de vasos xilemáticos em função dos regimes hídricos e genótipos após 12 dias de déficit hídrico e sucessiva recuperação (Fig. 7). O número de vasos xilemáticos foliar do genótipo FMS CR 1326 das plantas expostas a 12DH e sucessiva recuperação aumentou 11,9% em relação às plantas controle [continuamente irrigadas (CI)] (Fig. 7A). Por outro lado, o genótipo FMS CR 1307 apresentou reduções no número de vasos xilemáticos foliar quando as plantas foram submetidas ao déficit hídrico por 12 dias (12,4%). Comparando os genótipos, o FMS CR 1326 apresentou os maiores valores no número de vasos xilemático foliar quando as plantas foram expostas ao déficit hídrico, cerca de 15,5% (Fig. 7A).

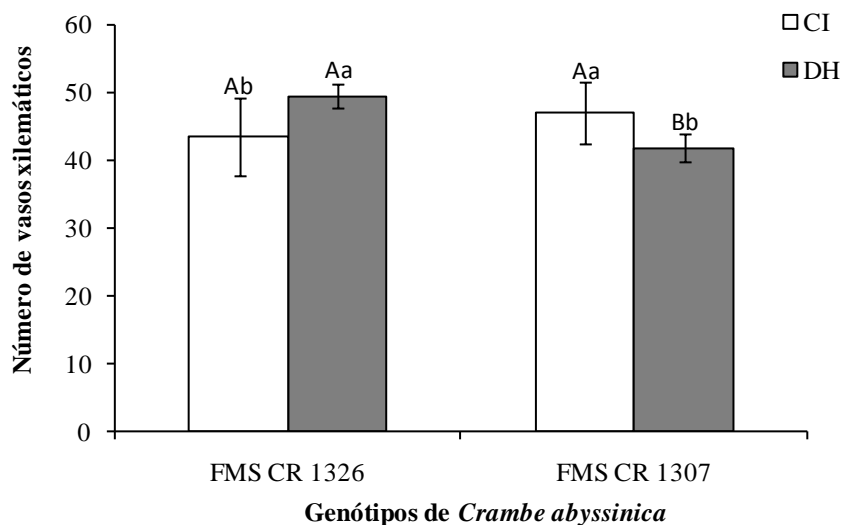


Figura 7 – Número de vasos xilemáticos foliares de dois genótipos de *C. abyssinica*, FMS CR 1326 e FMS CR 1307 submetidos ao déficit hídrico e posterior recuperação CI – plantas continuamente irrigadas e DH – déficit hídrico. Colunas seguidas da mesma letra, maiúscula para genótipos e minúsculas para regime hídrico, não diferiram significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey,  $p \leq 0,001$  ( $\pm$ SD).

### 3.5 Crescimento da planta e produção de grãos

A massa seca da raiz e da parte aérea variou significativamente ( $p \leq 0,001$ ) em função dos regimes hídricos (Tabela 1). As plantas controle (CI) apresentaram os maiores valores de massa seca da raiz e da parte aérea comparativamente as plantas sob déficit hídrico (DH) (45,4 e 30,5%, respectivamente em relação às plantas submetidas ao déficit hídrico). Da mesma forma, a massa de 100 grãos e produção de grãos por planta variou significativamente ( $p \leq 0,001$ ) em função dos regimes hídricos. As plantas controle (CI) apresentaram os maiores valores da massa de 100 grãos (~2.43) e produção de grãos por planta (~61,4) em comparação às plantas submetidas ao déficit hídrico (DH) (~1.76 e 31,7, respectivamente).

Tabela 1 – Crescimento das plantas e produção de grãos de dois genótipos de *C. abyssinica*, FMS CR 1326 e FMS CR 1307 submetidos ao déficit hídrico e posterior recuperação, CI – plantas continuamente irrigadas e DH – déficit hídrico.

Crescimento e produção	Regime hídrico	
	CI	DH
Massa seca da raiz (g. planta <sup>-1</sup> )	0,011 ± 0,005 A	0,006 ± 0,003 B
Massa seca parte aérea (g.planta <sup>-1</sup> )	0,085 ± 0,018 A	0,059 ± 0,014 B
Massa de 100 grãos (g.)	2,43 ± 0,50 A	1,76 ± 0,41 B
Produção por planta (g. planta <sup>-1</sup> )	61,4 ± 5,94 A	35,7 ± 8,01 B

Diferentes médias seguidas pela mesma letra entre colunas não diferiram significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey,  $p \leq 0,001$  ( $\pm$ SD).

### 3.6 Germinação de sementes

O déficit hídrico no período da floração resultou em diferenças significativas ( $p \leq 0,005$ ) em função ao potencial germinativo da progênie. Variações em função dos regimes hídricos e genótipos de crambe foram observados no índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes S<sub>1</sub>CI e S<sub>1</sub>DH (Fig. 8). No entanto, a porcentagem de germinação das sementes S<sub>1</sub>CI e S<sub>1</sub>DH foi significativamente influenciada apenas pelo fator regime hídrico ( $p \leq 0,001$ ) (inserção Fig. 8). Reduções no IVG das sementes S<sub>1</sub>DH do genótipo FMS CR 1326 foram observados. Entretanto, para o genótipo FMS CR 1307, o IVG das sementes S<sub>1</sub>DH não foram influenciados pelo déficit hídrico no período da floração ( $p \geq 0,05$ ). Comparando os genótipos, FMS CR 1326 apresentou os maiores valores de IVG das sementes S<sub>1</sub>CI. Entretanto, quando as plantas-mãe foram submetidas ao déficit hídrico não foram observadas diferenças entre os genótipos nas sementes S<sub>1</sub>DH (Fig. 8). Ainda, foram observados reduções na porcentagem de germinação das sementes em S<sub>1</sub>DH (cerca de 17,2%, inserção Fig. 8).

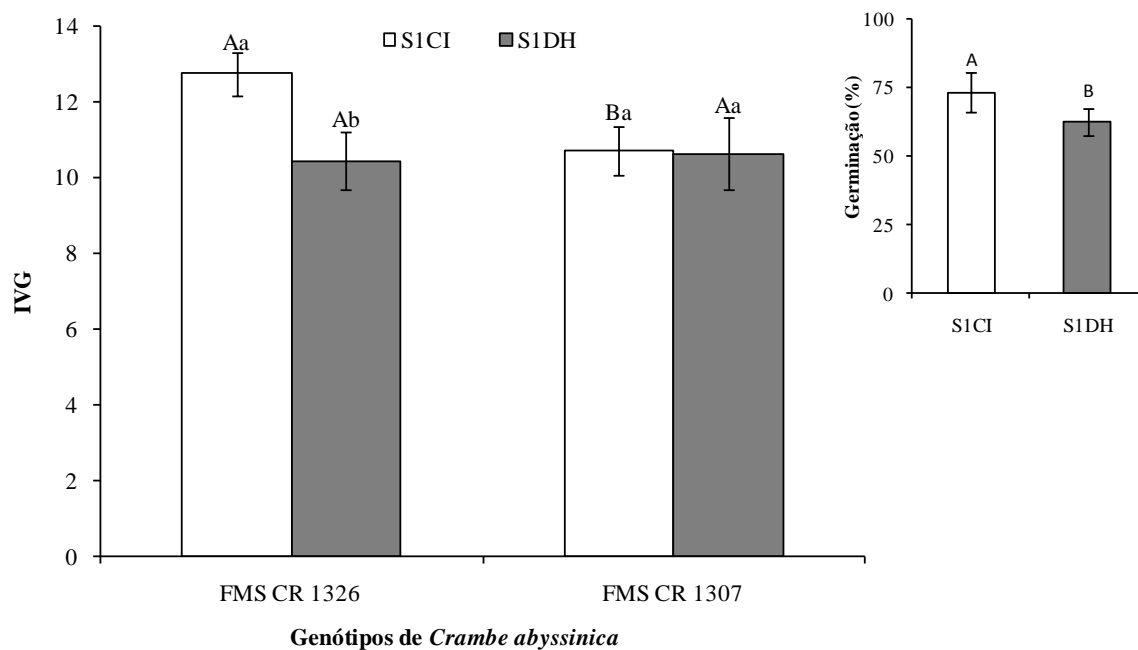


Figura 8 - Índice de velocidade de germinação (IVG) e Germinação (%) (inserção), de progênie de dois genótipos de *C. abyssinica*, FMS CR 1326 e FMS CR 1307 submetidos ao déficit hídrico e posterior recuperação, S1CI – plantas continuamente irrigadas e S1DH – déficit hídrico. Colunas seguidas da mesma letra, maiúscula para genótipos e minúsculas para regime hídrico, não diferiram significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey,  $p \leq 0,001$  ( $\pm$ SD).

#### 4. DISCUSSÃO

O déficit hídrico no início do período do florescimento pode causar redução em muitos processos fisiológicos e metabólicos podendo afetar o desenvolvimento das plantas e o rendimento dos grãos (ZHANG et al., 2017), o que pode, conseqüentemente, inviabilizar a comercialização de muitas culturas. Dessa forma, determinar se o estresse hídrico no período da floração afeta os parâmetros fisiológicos e anatômicos e, conseqüentemente, a produtividade e sementes da progênie pode possibilitar a uma economia de água, levando a uma estratégia para melhorar e reduzir a irrigação em campos irrigados. Este estudo foi realizado para investigar se o déficit hídrico intenso aplicado no início do estágio do florescimento nas plantas crambe (FMS CR 1307 e FMS CR 1326) pode resultar em mudanças nas características fisiológicas e anatômicas, afetando a produção de grãos, bem como, investigar possível dormência causado pelo tratamento de déficit hídrico na progênie, a fim de selecionar genótipos com tolerância à deficiência hídrica.

A temperatura do ar durante todo o período experimental para os dois genótipos de crambe estudados manteve-se nas temperaturas consideradas ideais para o cultivo desta cultura (igual ou abaixo de 25°C) (FALASCA et al., 2010). Os maiores valores do déficit de pressão de vapor (DPV) observados aos 09 e 12 de déficit hídrico (DH) (Fig. 1) resultaram em mudanças fisiológicas nos genótipos de crambe. Contudo, a redução da umidade do solo parece ter sido a principal causa para as mudanças fisiológicas.

A redução da umidade do solo resultou em diminuição progressiva da condutância estomática ( $g_s$ ) nos dois genótipos de crambe e pode ter sido um ajuste da transpiração, a fim de reduzir a perda de água durante o período de déficit hídrico (Fig. 2). Um dos primeiros efeitos do déficit hídrico nas plantas é o fechamento dos estômatos (ZANDALINAS et al., 2018). Além disso, de acordo com Devi e Reddy (2018), sob alto déficit de pressão de vapor (VPD), as plantas também tendem a reduzir a condutância estomática ( $g_s$ ) com intuito de ajustar a transpiração durante o dia.

Reduções no número de vasos xilemáticos freqüentemente são observadas devido a uma maior predisposição a embolia, a qual resulta em redução da transpiração foliar (GUAH et al., 2018). A embolia é uma séria ameaça para as plantas porque diminui a capacidade condutora do xilema, e pode, assim, prejudicar o fornecimento de água para transpiração das folhas (COCHARD, 2002). Neste sentido, a redução no número de vasos xilemáticos no genótipo FMS

CR 1307 sugere que sob condição limitada de água (induzida provavelmente pela transpiração) o número de vasos xilemáticos podem ter sofrido embolia (Fig. 7). Para o genótipo FMS CR 1326 foi observada elevação no número de vasos xilemáticos sob déficit hídrico, isso indica provável redução nas tensões do xilema abaixo do ponto de embolia, devido às maiores reduções de  $g_s$  comparativamente ao genótipo FMS CR 1307 (Fig. 2). Embora esse genótipo tenha apresentado aumento no número de vasos xilemáticos, não foram observadas diferenças no crescimento e produção entre os genótipos (Tabela 1), uma vez que, frequentemente o aumento no número de vasos xilemáticos está relacionado ao desempenho do crescimento e maior produção das plantas sob déficit hídrico (COCHARD, 2002). Em dois genótipos de milho (*Zea mays* L.) Aprilia e Belonia a resistência a embolia não aumentou o desempenho de crescimento sob condições de seca, no entanto, o aumento da resistência a embolia pode ter ajudado as plantas de milho a sobreviverem a períodos prolongados de seca (COCHARD, 2002).

O déficit hídrico também resultou em aumentos progressivos no índice de clorofila total nos dois genótipos de crambe (Fig. 3). Esse resultado evidencia que o déficit hídrico reduziu o volume celular, resultando em maior clorofila por unidade de área (ARUNYANARK et al., 2008). No entanto, da mesma forma que os valores de  $g_s$  (Fig. 2), os valores do índice de clorofila total não apresentaram recuperação total após 12 dias de recuperação hídrica em relação ao dia 0 DH, indicando recuperação lenta do volume celular das folhas de crambe.

Os genótipos de crambe sob déficit hídrico também apresentaram efeitos diferenciais nos parâmetros fotoquímicos, analisados através de medidas da fluorescência da clorofila *a*. Neste estudo, o efeito do déficit hídrico sobre a fluorescência transiente da clorofila *a* são apresentados nas Figs. 4 - 6. Os genótipos de crambe apresentaram curvas OJIP com aumento polifásico característico, indicando que as amostras permaneceram fotossinteticamente ativas após os tratamentos com déficit hídrico intenso (Fig. 3) (YUSUF et al., 2010). No entanto, para melhor elucidar se o déficit hídrico intenso aplicado no início do estágio do florescimento nas plantas de crambe resultou em mudanças fotoquímicas, os dados da fluorescência relativa entre os pontos O e K ( $V_{OK}$ ) (Fig. 4 C e D) e O e J ( $V_{OJ}$ ) (Fig. 4 A e B) foram normalizados e são mostrados como a diferença cinética  $\Delta V_{OK}$  e  $\Delta V_{OJ}$ , respectivamente, permitindo-nos identificar o aparecimento das bandas L e K, respectivamente.

O aparecimento de banda K positiva indica inativação do complexo de evolução do oxigênio (CEO) (YUSUF et al., 2010). Neste estudo, amplitudes positivas da banda K foram

observadas no genótipo FMS CR 1326 à medida que se aumentou o período de déficit hídrico (Fig. 5A), enquanto para o FMS CR 1307, amplitudes positivas da banda K foram observadas apenas aos 09 e 12 de déficit hídrico (Fig. 5B). Esse resultado pode ser ainda confirmado pela redução de  $F_v/F_0$  observado no genótipo FMS CR 1326 (Fig. 6A) em todos os dias de déficit hídrico e recuperação bem como aos 09 e 12DH para o genótipo FMS CR 1307 (Fig. 6B). Reduções de  $F_v/F_0$  mostram redução na eficiência do complexo doador de elétrons do FSII (Fig. 6A) (KALAJI et al., 2011). Esse resultado sugere redução na eficiência no lado doador do FSII, ou seja, inativação do complexo de evolução do oxigênio.

Da mesma forma, amplitudes positivas de banda L foram observadas no genótipo FMS CR 1326 à medida que se aumentou o período de déficit hídrico (Fig. 5C), enquanto no FMS CR 1307, amplitudes positivas da banda L foram observadas apenas aos 09 e 12 dias de déficit hídrico (09 e 12DH) (Fig. 5D). Valores positivos da banda L podem ser interpretados como inibição na doação de elétrons para YZ (Tyr161 da proteína D1) e um desagrupamento do FSII (STRASSER 1997; LIN et al., 2009). Esse aumento crescente das amplitudes positivas na banda L no FMS CR 1326 sugere que a cada novo dia sob déficit hídrico, maiores danos à conectividade de energia ou agrupamento entre as unidades FSII ocorreram. Para o FMS CR 1307, os danos fotoquímicos começaram a partir de 09 dias de déficit hídrico. Entre os genótipos, os resultados indicam que o FMS CR 1307 foi capaz de manter o equilíbrio entre os elétrons nos locais do acceptor e doador dentro do FSII quando submetidos ao déficit hídrico moderado (06 DH), mas não ao déficit hídrico intenso (09 e 12DH), enquanto o genótipo FMS CR 1326 não foi capaz de manter equilíbrio entre os elétrons nem no início do déficit hídrico (03DH) (Fig. 5E e F).

O comportamento de  $F_0$  diferiu entre genótipos, apesar de não significativos para o genótipo FMS CR 1326, para o qual os valores de  $F_0$  mostraram uma maior sensibilidade à privação de água (notadamente, valores de  $F_0$  aumentaram sob déficit hídrico, comparativamente o FMS CR 1307) (Fig. 6A e B). Aumentos em  $F_0$  refletem inibição do centro de reação do FSII, inibindo o fluxo de elétrons de  $Q_A$  para  $Q_B$ , além de danos rapidamente reversíveis a proteína D1 ligada ao FSII (STRASSER and STRASSER 1995; GOLTSEV et al. 2016). Além disso, aumentos em  $M_0$  e redução de  $S_m$  observados para o genótipo FMS CR 1326 sob déficit hídrico e recuperação e aos 09 e 12 dias de déficit hídrico para o genótipo FMS CR 1307, mostraram diminuição no número de centros de reação ativos e, portanto, um aumento no número de centros



de reação fechados ( $M_0$ ) (EINALI e SHARIATI 2015) e diminuição da capacidade dos portadores de elétrons captar elétrons no intersistemas ( $S_m$ ) (JEDMOWSKI et al., 2013). Esta redução na transferência de elétrons no FSII indica um acúmulo de  $Q_A$  reduzida, o que resultou em aumento de  $V_J$  (inserção Fig. 4A e B). Embora, diferenças estatísticas em  $V_J$  não tenham sido observadas para o FMS CR 1307, aos 12 dias de déficit hídrico, aumentos de 12,5% em relação ao dia 0DH ocorreram (inserção Fig. 4B).

Alterações nos valores de  $V_I$  também foram observadas para os dois genótipos de crambe (FMS CR 1326 e 1307) (inserção Fig. 4A e B). Segundo Gravano et al. (2004), aumentos em  $V_I$  indicam acúmulo de plastoquinona reduzida. Esses autores sugerem que os aumentos de  $V_I$  refletem em redução dos elétrons que seriam utilizados nas atividades do ciclo de Calvin, conseqüentemente, reduções nas taxas fotossintéticas podem ser encontradas. Neste sentido, o genótipo FMS CR 1326, por apresentar aumentos de  $V_J$  e  $V_I$  aos 03, 06, 09 e 12 DH em relação ao dia 0DH, reduziu a capacidade de realizar o transporte de elétrons de  $Q_A$  para  $Q_B$ , além de acumular plastoquinona reduzida, o que pode ter reduzido as taxas fotossintéticas. Aumentos nos valores de  $V_J$  proporcionais aos valores de  $V_I$  indicam que a inibição do lado doador do FSII é possivelmente maior do que a do lado do aceptor (WANG et al., 2016a), ou seja, refletem danos ocorridos no início da cadeia transportadora de elétrons, isto é, inativação do complexo de evolução do oxigênio, inibição na doação de elétrons para YZ e um desagrupamento do FSII (amplitudes positivas da banda K e L, respectivamente; Fig. 5). Entretanto, quando analisado o período de recuperação, os genótipos de crambe aos 12 dias de recuperação, apresentaram redução nos valores de  $V_J$  e  $V_I$  indicando aumento na capacidade de realizar o transporte de elétrons de  $Q_A$  para  $Q_B$  e redução/oxidação da plastoquinona.

Aumento de  $F_0$  aos 12 de déficit hídrico observado para o genótipo FMS CR 1326, pode ter refletido em um aumento significativo no fluxo de absorção ( $ABS/RC$ ) e dissipação ( $DI_0/RC$ ) por centro de reação em relação às plantas 0DH (Fig. 6A). Os valores dos fluxos específicos de energia aumentaram para o genótipo FMS CR 1326 (Fig. 6A) à medida que se foram aumentando os dias sob déficit hídrico, enquanto para FMS CR 1307 (Fig. 6B), aumentos aos 12 de déficit hídrico foram observados. Para os dois genótipos, o aumento do fluxo absorção de energia ( $ABS/RC$ ) resultou em um aumento do fluxo energia capturada por centro de reação ( $TR_0/RC$ ), fluxo de transporte de energia ( $ET_0/RC$ ) e no fluxo de dissipação de energia ( $DI_0/RC$ ). De acordo com Kalaji et al. (2014), aumentos de  $TR_0/RC$  proporcional ao aumento de  $ABS/RC$  indicam

comprometimento no complexo de evolução de oxigênio, através da supressão de reparo do FSII danificado (TAKAHASHI e MURATA, 2008), na qual, neste estudo foram verificados pelo aumento positivo da banda K (Fig. 5). Por outro lado, reduções nos valores de  $\phi E_0$  e  $\psi E_0$  nas plantas expostas ao déficit hídrico, podem indicar que a energia absorvida não foi capturada e usada para reduzir a  $Q_A$ , o que aumentou a perda de energia por dissipação ( $\phi D_0$ ) (HERMANS et al. 2003; OUKARROUM et al. 2009). Em plantas de arroz (*Oryza sativa* L., genótipo Liangyoupeijiu), respostas ao déficit hídrico também foram relatados com aumentos no fluxo de dissipação de energia ( $DI_0/RC$ ), bem como, aumentos no rendimento quântico para a dissipação de energia ( $\phi D_0$ ) e diminuição de  $RC/ABS$ , indicando menor utilização de energia durante o período do déficit hídrico (WANG et al., 2016b). A dissipação dessa energia em excesso é aprimorada a fim de proteger as folhas contra os danos foto-oxidativos uma vez que as mesmas estavam sob estresse intenso (FRANIĆ et al., 2017).

Reduções nos índices de desempenho ( $PI_{ABS}$  e  $PI_{total}$ ) foram observados em ambos os genótipos de crame (Fig. 6).  $PI_{ABS}$  é regulado pela absorção de energia (ABS), captura de energia de excitação (TR) e conversão de energia de excitação (ET) (CHEN et al., 2014), enquanto, o  $PI_{total}$  engloba, além dos parâmetros do  $PI_{ABS}$ , a probabilidade de um elétron do intersistema mover-se para reduzir os aceptores finais do lado acceptor do FSI (TSIMILLI-MICHAEL e STRASSER, 2008). Segundo Yusuf et al. (2010), reduções nos valores de PI representam redução na habilidade do potencial de conservação de energia do aparato fotossintético. Neste estudo, as reduções nos valores de  $PI_{ABS}$  e  $PI_{total}$  durante o período experimental foram maiores no genótipo FMS CR 1326 (Fig. 6A) sugerindo menor desempenho do aparato fotossintético sob déficit hídrico intenso. O genótipo FMS CR 1307 apresentou aumentos nos valores de  $PI_{ABS}$  e  $PI_{total}$  no período de recuperação ao déficit hídrico (Fig. 6B). Esses resultados mostram que após o retorno da irrigação o FMS CR 1307 foi capaz de manter uma transferência eficiente de energia e captura no fotossistema FSII, evidenciando recuperação e maior tolerância fotoquímica ao déficit hídrico (ZHANG et al., 2015).

Frequentemente a escassez de água também reduz o crescimento vegetativo das plantas (COVRE et al., 2016), como foi observado neste estudo (Tabela 1). Sob déficit hídrico, reduções em  $g_s$  e conseqüente diminuição nas taxas fotossintéticas são frequentemente encontradas, o que pode resultar em redução na capacidade progressiva das raízes em absorver água necessária do solo reduzindo o crescimento normal das plantas (TRABELSI et al., 2019). Neste estudo, os

resultados permitem inferir que a redução de  $g_s$  resultou em menor investimento na matéria seca das plantas devido à provável redução de carbono interno. Além disso, a produção de sementes por planta e a massa de 100 grãos foram afetadas negativamente pelo déficit hídrico aplicado no início do florescimento (Tabela 1). A redução na produção de sementes e massa dos grãos das plantas de crambe pode ter sido causada pela senescência e aborto das flores no período do déficit hídrico, como previamente verificado por Mathobo et al. (2017). Os autores verificaram que o déficit hídrico aplicado no período do florescimento em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L., cultivar DBS 360) resultou em reduções no número de vagens e sementes por plantas como resultado da senescência das flores e do aborto de flores devido ao declínio das taxas fotossintéticas sob estresse hídrico. É bem estabelecido que o estresse durante o período da floração também afeta negativamente as taxas fotossintéticas de diversas plantas (BAHUGUNA et al., 2018). Neste sentido, reduções na abertura estomática e danos à fotossíntese foliar podem ter influenciado na redução do desenvolvimento das flores e enchimento dos grãos precoces (TRICKER et al., 2018), o que pode ter resultado em diminuição da produção nas plantas de crambe.

O déficit hídrico influenciou a progênie reduzindo a porcentagem de germinação e o índice de velocidade de germinação das sementes de crambe (Fig. 8). O déficit hídrico também é refletido como um impacto consistente nos processos sucessivos da planta (SHI et al., 2018), como o desenvolvimento das sementes da progênie. O efeito do déficit hídrico durante o desenvolvimento de semente causa redução do tempo de desenvolvimento da flor, impedindo o desenvolvimento do embrião devido à falta de fotoassimilados (FAROOQ et al., 2017), além de geralmente aumentar a espessura ou dureza, a fim de retardar a germinação até que a água adequada esteja disponível (FENNER, 1991). No desenvolvimento de sementes de cevada (*Hordeum vulgare* L.) sob déficit hídrico, a acumulação de ácido abscísico (ABA) no desenvolvimento de sementes foi fundamental para aumentar a dormência das sementes (SEILER et al., 2011). No entanto, a dormência de sementes agriculturáveis geralmente não é desejável em condições de campo, uma vez que, o atraso na germinação predispõe as sementes a uma maior exposição à ação de patógenos e ataques de insetos e pragas (MACHADO et al., 2017). Neste estudo, os resultados similares de IVG das sementes  $S_{1DH}$  e  $S_{1CI}$  do genótipo FMS CR 1307 sugerem que o déficit hídrico no período da floração não reduziu o vigor das sementes desse

genótipo, o que pode resultar em uma emergência mais rápida de plântulas em campo (MARCOS-FILHO, 2015).

Em resumo, o déficit hídrico intenso no início do período do florescimento nos genótipos de crambe (FMS CR 1326 e 1307) causou uma desestabilidade na estrutura e funcionalidade do aparato fotossintético, que resultou em redução na produção e germinabilidade da progênie. Finalmente, do ponto vista prático, os dados indicam que em campos irrigáveis, a irrigação não deve ser suspensa no início do florescimento nas plantas de crambe. No entanto, os resultados mostram que o genótipo FMS CR 1307 por apresentar maior tolerância fotoquímica pode ser irrigado com menor frequência, economizando água e energia em regiões caracterizadas por baixa precipitação.

## **5. CONCLUSÕES**

Em conclusão, os resultados mostraram que o déficit hídrico intenso no início do estágio do florescimento nas plantas de crambe resulta em alterações fisiológicas e anatômicas, resultando em redução na produção e germinabilidade da progênie. O déficit hídrico reduziu  $g_s$ , alterou o número de vasos xilemáticos foliar e reduziu a utilização da energia de excitação e a estabilidade do fotossistema II. O genótipo FMS CR 1307 é capaz de manter o desempenho fotoquímico quando submetidos ao déficit hídrico moderado (06 DH) e após o período de déficit hídrico (período de recuperação), possui um mecanismo de melhor utilização de energia de excitação e maior estabilidade do fotossistema II, além de maior vigor da progênie sob déficit hídrico refletindo em maior tolerância ao déficit hídrico.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à FAPES pela bolsa de estudos e apoio financeiro. Também agradecemos à Fundação MS (Fundação Mato Grosso do Sul) pelo fornecimento das sementes de crambe e suporte técnico necessários durante o estudo.

## 6. REFERÊNCIAS

ARAÚJO, L.F.; BERTINI, C.H.C.M.; BLEICHER, E.; NETO, F.C.V.; ALMEIDA, W.S. Características fenológicas, agronômicas e tecnológicas da fibra em diferentes cultivares de algodoeiro herbáceo. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, vol. 8, p. 448-453, 2013.

ARUNYANARK, A.; JOGLOY, S.; AKKASAENG, C.; VORASOOT, N.; KESMALA, T.; NAGESWARA RAO, R.C.; WRIGHT, G.C.; PATANOTHAI, A. Chlorophyll stability is an indicator of drought tolerance in peanut. **Journal Agronomy and Crop Science**, vol. 194, p. 113–125, 2008.

BAHUGUNA, R.N.; TAMILSELVAN, A.; MUTHURAJAN, R.; SOLIS, C.A.; JAGADISH, S.V.K. Mild preflowering drought priming improves stress defences, assimilation and sink strength in rice under severe terminal drought. **Functional Plant Biology**, vol. 45, p. 827 – 839, 2018.

BATISTA, P.F.; COSTA, A.C.; MÜLLER, C.; SILVA-FILHO, O.R.; SILVA, F.B.; MERCHANT, A.; MENDES, G.C.; NASCIMENTO, K.J.T. Nitric oxide mitigates the effect of water deficit in *Crambe abyssinica*. **Plant Physiology and Biochemistry**, vol. 129, p. 310 - 322, 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA. 2009.

COCHARD, H. Xylem embolism and drought-induced stomatal closure in maize. **Planta**, vol. 215, p. 466–471, 2002.

CORDÃO, M.A.; ARAÚJO, W.P.; PEREIRA, J.R.; ZONTA, J.H.; LIMA, R.F.; FERREIRA, F.N. Cultivares de algodoeiro herbáceo sob déficit hídrico aplicado em fases fenológicas. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, vol. 13, p. 313 – 321, 2018.

COVRE, A.M., PARTELLI, F.L., BONOMO, R., BRAUN, H., RONCHI, C.P. Vegetative growth of Conilon coffee plants under two water conditions in the Atlantic region of Bahia State, Brazil. **Acta Scientiarum**, v. 38, n. 4, p. 535-545, 2016.

CHEN, S.G.; STRASSER, R.J.; QIANG, S. *In vivo* assessment of effect of phytotoxin tenuazonic acid on PSII reaction centers. **Plant Physiology and Biochemistry**, vol. 84, p. 10–21, 2014.

DEVI, M.J.; REDDY, V.R. Transpiration response of cotton to vapor pressure deficit and its relationship with stomatal traits. **Frontiers in Plant Science**, vol. 9, article 1572, 2018.

EINALI, A.; SHARIATI, M. Effects of propyl gallate on photosystem II efficiency in *Dunaliella bardawil* under high illumination as investigated by chlorophyll fluorescence measurements. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, vol. 67, p. 61 – 73, 2015.

FALASCA, S.L.; FLORES, N.; LAMAS, M.C.; CARBALLO, S.M.; ANSCHAU, A. *Crambe abyssinica*: An almost unknown crop with a promissory future to produce biodiesel in Argentina. **International Journal of Hydrogen Energy**, vol. 35, p. 5808-5812, 2010.

FAROOQ, M.; GOGOI, N.; BARTHAKUR, S.; BAROOWA, B.; BHARADWAJ, N.; ALGHAMDI, S.S.; SIDDIQUE, K.H.M. Drought stress in grain legumes during reproduction and grain filling. **Journal of Agronomy and Crop Science**, vol. 203, p. 81–102, 2017.

FENNER, M. The effects of the parent environment on seed germinability. **Seed Science Research**, vol. 1, p. 75-84, 1991.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia (UFLA)**, vol. 35, p. 1039-1042, 2011.

FRANIĆ, M.; GALIĆ, V.; MAZUR, M.; ŠIMIĆ, D. Effects of excess cadmium in soil on JIP-test parameters, hydrogen peroxide content and antioxidant activity in two maize inbreds and their hybrid. **Photosynthetica**, vol. 55, p. 1-10, 2017.

GOLTSEV, V.N.; KALAJI, H.M.; PAUNOV, M.; BAĀBA, W.; HORACZEK, T.; MOJSKI, J.; KOCIEL, H.; ALLAKHVERDIEV, S.I. Variable chlorophyll fluorescence and its use for assessing physiological condition of plant photosynthetic apparatus. **Journal Russian of Plant Physiology**, vol. 63, 881–907, 2016.

GRAVANO, E.; BUSSOTTI, F.; STRASSER, R.; SCHAUB, M.; NOVAK, K.; SKELLY, J.; TANI, C. Ozone symptoms in leaves of woody plants in open top chambers: Ultrastructural and physiological characteristics. **Physiol Plantarum**, vol. 121, p. 620-633, 2004.

GUHA, A.; CHHAJED, S.S.; CHOUDHARY, S.; SUNNY, R.; JANSEN, S.; BARUA, D. Hydraulic anatomy affects genotypic variation in plant water use and shows differential organ specific plasticity to drought in *Sorghum bicolor*. **Environmental and Experimental Botany**, vol. 156, p. 25-37,2018.

HERMANS, C.; SMEYERS, M.; RODRIGUEZ, R. M.; EYLETTERS, M.; STRASSER, R. J.; DELHAYE, J-P. Quality assessment of urban trees: a comparative study of physiological characterisation, airborne imaging and on site fluorescence monitoring by the OJIP-test. **Journal of Plant Physiology**, vol. 160, p. 81-90,2003.

JEDMOWSKI, C.; ASHOUB, A.; BRÜGGEMANN, W. Reactions of Egyptian landraces of *Hordeum vulgare* and *Sorghum bicolor* to drought stress, evaluated by the OJIP fluorescence transient analysis. **Acta Physiologiae Plantarum**, vol. 35, p. 345 – 354,2013.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**, Mc Graw-Hill: New York. 1940.

KALAJI, H.M.; BOSA, K.; KOS'CIELNIAK, J.; HOSSAIN, Z. Chlorophyll *a* Fluorescence — A useful tool for the early detection of temperature stress in spring barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal of Integrative Biology**, vol. 15, p. 925 – 934,2011.

KALAJI, H.M.; OUKARROUM, A.; ALEXANDROV, V.; KOUZMANOVA, M.; BRESTIC, M.; ZIVCAK, M.; SAMBORSKA, I.A.; CETNER, M.D.; ALLAKHVERDIEV, S.I.; GOLTSEV, V. Identification of nutrient deficiency in maize and tomato plants by *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence measurements. **Plant Physiology and Biochemistry**, vol. 81, p. 16-25, 2014.

LALAS, S.; GORTZI, O.; ATHANASIADIS, V.; DOURTOGLOU, E.; DOURTOGLOU, V. Full characterization of *Crambe abyssinica* Hochst. seed oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, vol. 89, p. 2253-2258, 2012.

LIN, Z-H.; CHEN, L-S.; CHEN, R-B.; ZHANG, F-Z.; JIANG, H-X.; TANG, N. CO<sub>2</sub> assimilation, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, carbohydrates and photosynthetic electron transport probed by the JIP-test, of tea leaves in response to phosphorus supply. **BMC Plant Biology**, vol. 9, article 43, p. 1-12, 2009.

MACHADO, F. H. B.; DAVID, A. M. S. DE S.; CANGUSSÚ, L.V. S.; FIGUEIREDO, J. C.; AMARO, H. T. R. Physiological quality of seed and seedling performance of crambe genotypes



under water stress. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, vol. 21, p. 175-179, 2017.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, vol. 2, p. 176-77, 1962.

MARCO- FILHO, J. Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. **Scientia Agricola**, vol. 72, p. 363-374, 2015.

MATHOBO, R.; MARAIS, D.; STEYN, J. M. The effect of drought stress on yield, leaf gaseous exchange and chlorophyll fluorescence of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Agricultural Water Management**, vol. 180, p. 118–125, 2017.

OLIVEIRA, A.J.; GARRIDO, W.E.; ARAUJO, J.D.; LOURENÇO, S. **Métodos de pesquisa em fertilidade do solo**. EMBRAPA-SEA: Brasil. 1991

OLIVEIRA, R.C., REIS, A. C. C. S., AGUIAR, C. G., VIECELLI, C. A., PRIMIERI, C., TOMASI, G. A., BLEIL JUNIOR, H. G., ANDRADE, M. A. A., VIANA, O. H. **Agroindustrialização do Crambe**. Cascavel: ASSOESTE. 2015.

OUKARROUM, A.; SCHANSKER, G.; STRASSER, R.J. Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using Chl *a* fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance. **Physiologia Plantarum**, vol. 137, p. 188-199, 2009.

PITOL, C.; BROCH, D. L.; ROSCOE, R. **Introdução e Melhoramento do crambe no Brasil, Tecnologia e produção: crambe**. FMS Fundação: MS. 2012.

PITOL, C.; BROCH, D.L; ROSCOE, R. **Tecnologia e Produção: Crambe 2010**. Maracaju: Fundação MS. 2010.

ROSALES, M.A.; OCAMPO, E.; RODRIGUEZ-VALENTIN, R.; OLVERA-CARRILLO, Y.; ACOSTA-GALLEGOS, J.; COVARRUBIAS, A.A. Physiological analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars uncovers characteristics related to terminal drought. **Plant physiology and Biochemistry**, vol. 56, p. 24–34, 2012.

SANTOS, D.; GUIMARÃES, V.F.; KLEIN, J.; FIOREZE, S.; MACEDO JÚNIOR, E.K. Cultivares de trigo submetidas a déficit hídrico no início do florescimento, em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, vol. 16, p. 836–842, 2012.

SEILER, C.; HARSHAVARDHAN, V.T.; RAJESH, K.; REDDY, P.S.; STRICKERT, M.; ROLLETSCHEK, H.; SCHOLZ, U.; WOBUS, U.; SREENIVASULU, N. ABA biosynthesis and degradation contributing to ABA homeostasis during barley seed development under control and terminal drought-stress conditions. **Journal and Experimental of Botany**, vol. 62, p. 2615–2632, 2011.

SHI, W.; LI, X.; SCHMIDT, R.C.; STRUIK, P.C.; YIN, X.; JAGADISH, S.V.K. Pollen germination and in vivo fertilization in response to high-temperature during flowering in hybrid and inbred rice. **Plant Cell Environmental**, vol. 41, p. 1287 – 1297, 2018.

STIBERT, A.; GOVINDJEE. On the relation between the Kautsky effect (Chlorophyll *a* fluorescence induction) and photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient. **Journal Photochemistry and Photobiology B: Biology**, vol. 104, p. 236–257, 2011.

STRASSER, B.J.; STRASSER, R.J. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP-test. In: MATHIS, P. (Ed.) **Photosynthesis: from light to biosphere**. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, p. 977–980, 1995.

STRASSER, B.J. Donor side capacity of photosystem II probed by chlorophyll *a* fluorescence transients. **Photosynthesis Research**, vol. 52, p. 147–155, 1997.

STRASSER, R.J.; MICHAEL, M.T.; SRIVASTAVA, A. Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. In: GEORGE, C.; GOVINDJE, P.; PAPAGEORGIOU, G.C. (Ed.) **Advances in photosynthesis and respiration chlorophyll fluorescence a signature of photosynthesis**. Springer: Netherlands, p. 321–362, 2004.

TAKAHASHI, S.; MURATA, N. How do environmental stresses accelerate photoinhibition? **Trends Plant Science**, vol. 13, p. 178–182, 2008.

TRABELSI, L.; GARGOURIA, K.; HASSENA, A. B.; MBADRA, C.; GHRAB, M.; NCUBE, B.; STADEN, J. V.; GARGOURI, R. Impact of drought and salinity on olive water status and

physiological performance in an arid climate. **Agricultural Water Management**, vol. 213, p. 749–759, 2019.

TRICKER, P.J.; ELHABTI, A.; SCHMIDT, J.; FLEURY, D. The physiological and genetic basis of combined drought and heat tolerance in wheat. **Journal Experimental Botany**, vol. 69, p. 3195–3210, 2018.

TSIMILLI-MICHAEL, M.; STRASSER, R.J. *In vivo* assessment of plants' vitality: applications in detecting and evaluating the impact of Mycorrhization on host plants, *In*: VARMA, A. (Ed.), **Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco- Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics**. Springer: Dordrecht, p. 679-703, 2008.

VASCONCELOS, U.A.A.; CAVALCANTI, J.J.V.; FARIAS, F.J.C. VASCONCELOS W. S.; SANTOS; R C. Diallel analysis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) for water stress tolerance. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, vol. 18, p. 24-30, 2018.

WANG, Y.P.; TANG, J.S.; CHU, C.Q.; TIAN, J. A preliminary study on the introduction and cultivation of *Crambe abyssinica* in China, an oil plant for industrial uses. **Industrial Crops and Products**, vol. 12, p. 47-52, 2000.

WANG, Y.W.; XU, C.; LV, C.F.; WU, M.; CAI, X.J.; LIU, Z.T.; SONG, M.X.; CHEN, C.X.; LV, C.G. Chlorophyll *a* fluorescence analysis of high-yield rice (*Oryza sativa* L.) LYPI during leaf senescence. **Photosynthetica**, vol. 54, p. 422-429, 2016a.

WANG, Y.; XU, C.; WU, M.; CHEN, G. Characterization of photosynthetic performance during reproductive stage in high-yield hybrid rice LYPI exposed to drought stress probed by chlorophyll *a* fluorescence transient. **Plant Growth Regulation**, vol. 81, p. 489 – 499, 2016b.

YUSUF, M.A.; KUMAR, D.; RAJWANSHI, R.; STRASSER, R.J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; GOVINDJEE, SARIN, N.B. Overexpression of  $\gamma$ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: physiological and chlorophyll *a* fluorescence measurements. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1797, p. 1428–1438, 2010.

ZANDALINAS, S.I.; MITTLER, R.; BALFAGÓN, D.; ARBONA, V.; GÓMEZ-CADENAS, A. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. **Physiologia Plantarum**, vol. 162, p. 2–12, 2018.

ZHANG, R.H.; ZHANG, X.H.; CAMBERATO, J.J.; XUE, J.Q. Photosynthetic performance of maize hybrids to drought stress. **Russian Journal of Plant Physiology**, vol. 62, p. 788–796, 2015.

ZHANG, M.; WANG, L.; ZHANG, K.; LIU, F.; WAN, Y. Drought-induced responses of organic osmolytes and proline metabolism during pre-flowering stage in leaves of peanut (*Arachis hypogaea*L.). **Journal of Integrative Agriculture**, vol. 16, p. 2197–2205, 2017.

ZHANG, S.; XU, X.; SUN, Y.; ZHANG, J.; LI, C. Influence of drought hardening on the resistance physiology of potato seedlings under drought stress. **Journal of Integrative Agriculture**, vol. 17, p. 336–347, 2018.

## CONCLUSÕES GERAIS

A qualidade fisiológica das sementes e o desenvolvimento inicial dos genótipos de crambe aumentam no  $\Psi_w = -0,2$  MPa. No entanto, a germinação e o índice de vigor das sementes são reduzidos pelo potencial a partir de  $-0,4$  MPa. O genótipo FMS CR 1203 é o mais tolerante ao déficit hídrico, enquanto o FMS CR 1307 e 1312 são mais sensíveis.

Na fase do crescimento vegetativo o genótipo FMS CR 1326 sob déficit hídrico foi capaz de manter uma maior eficiência fotoquímica do FSII, indicando maior vantagem das plantas de crambe em termos de estabilidade e eficiência para usar a energia de excitação sob supressão de água. Entretanto, o genótipo FMS CR 1307 possui maior fotoproteção do FSI, devido a menores amplitudes negativas  $\Delta V_{IP}$ .

Em relação às exposições prévias ao déficit hídrico, os três ciclos de déficit hídrico induziram a memória ao estresse, envolvendo mudanças fisiológicas mais diretamente do que mudanças anatômicas. A memória ao estresse resultante da exposição prévia ao déficit hídrico está associada à manutenção do CRA, reduções na  $g_s$ , manutenção da estabilidade das membranas celulares e utilização de energia de excitação e maior estabilidade do sistema, além de aumento da espessura do mesofilo e parênquima esponjoso e reduções na espessura do parênquima paliçádico. O genótipo FMS CR 1307 apresentou melhor desempenho fotoquímico e ajustes anatômicos que foram sincronizados com a manutenção da integridade e estabilidade da membrana celular.

O déficit hídrico intenso no início do estágio do florescimento nas plantas de crambe resulta em alterações fisiológicas e anatômicas, resultando em redução na produção e germinabilidade da progênie. O déficit hídrico reduziu  $g_s$ , alterou o número de vasos xilemáticos foliares e reduziu a utilização da energia de excitação e a estabilidade do FSII. O genótipo FMS CR 1307 é capaz de manter o desempenho fotoquímico quando submetidos ao déficit hídrico moderado (06 DH) e após o período de déficit hídrico (período de recuperação) e ainda possui um mecanismo de melhor utilização de energia de excitação e maior estabilidade do fotossistema II, além de maior vigor da progênie sob déficit hídrico refletindo em maior tolerância ao déficit hídrico.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Nesse estudo, o déficit hídrico aplicado em diferentes fases fenológicas (capítulo de 1 – 4) de diferentes genótipos de crambe resultou em respostas distintas. O genótipo FMS CR 1307 apresentou maior suscetibilidade ao déficit hídrico na fase fenológica de crescimento inicial. No entanto, na fase do crescimento vegetativo apresentou maior fotoproteção do FSI. Analisando a ‘memória’ ao déficit hídrico, na qual as plantas foram submetidas às recorrentes ciclos de déficit hídrico e déficit hídrico no início do estágio do florescimento, o genótipo FMS CR 1307 apresentou maior tolerância fotoquímica, além de maior vigor da progênie refletindo em maior tolerância ao déficit hídrico.

Por fim, apesar dos resultados promissores de tolerância fotoquímica e o maior vigor da progênie sob déficit hídrico no genótipo FMS CR 1307, faz-se necessária a realização de experimentos de campo, a fim de averiguar se essa resposta irá refletir em maior produção de grãos.