

**ESTRESSE HÍDRICO E EXPRESSÃO DE GENES NO INÍCIO DE  
CRESCIMENTO DE ALGODOEIROS NATURALMENTE COLORIDOS**

**ALEXANDRE MUNIZ SIQUEIRA DE SOUZA**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CAMPINA GRANDE/PB**

**MARÇO 2014**

**ESTRESSE HÍDRICO E EXPRESSÃO DE GENES NO INÍCIO DE  
CRESCIMENTO DE ALGODOEIROS NATURALMENTE COLORIDOS**

**ALEXANDRE MUNIZ SIQUEIRA DE SOUZA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias / Área de Concentração: Agricultura Familiar e Sustentabilidade.

**Orientador: Prof. Dr. PEDRO DANTAS FERNANDES**  
**Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. LIZIANE MARIA DE LIMA**

**CAMPINA GRANDE/PB**  
**MARÇO 2014**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

S729e Souza, Alexandre Muniz Siqueira de.  
Estresse hídrico e expressão de genes no início de crescimento de algodoeiros naturalmente coloridos [manuscrito] / Alexandre Muniz Siqueira de Souza. - 2014.  
73 p. : il.  
  
Digitado.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação, 2014.  
"Orientação: Prof. Dr. Pedro Dantas Fernandes, Departamento de Ciências Agrárias".  
"Co-Orientação: Profa. Dra. Liziane Maria de Lima, Embrapa Algodão".  
  
1. Algodão colorido. 2. *Gossypium hirsutum*. 3. Expressão gênica. 4. Genética vegetal. I. Título.

21. ed. CDD 633.51

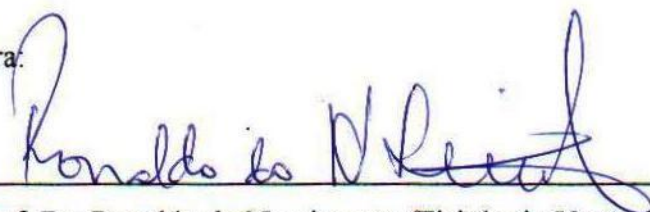
# ESTRESSE HÍDRICO E EXPRESSÃO DE GENES NO INÍCIO DE CRESCIMENTO DE ALGODOEIROS NATURALMENTE COLORIDOS

ALEXANDRE MUNIZ SIQUEIRA DE SOUZA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias / Área de Concentração: Agricultura Familiar e Sustentabilidade.

Aprovada em 27 de março de 2014

Banca Examinadora:



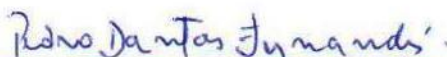
Prof. Dr. Ronaldo do Nascimento (Fisiologia Vegetal) - UFCG



Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses (Biotecnologia Vegetal) - UEPB



Prof.ª Dra. Liziane Maria de Lima (Biologia Molecular) – Embrapa Algodão  
Coorientadora



Prof. Dr. Pedro Dantas Fernandes (Fisiologia vegetal) - UEPB  
Orientador

## AGRADECIMENTOS

Acima de tudo e todos, agradeço, primeiramente a Jeová Deus, por toda sua benevolência, amor e amparo, me ajudando sempre, dando força e sabedoria para superar todo desafio.

A minha mãe, uma batalhadora, sempre ao meu lado; a minha vó, um exemplo de garra e bravura, a meu pai, a meu irmão e toda minha família, por me apoiarem e acreditarem em mim.

Aos meus orientadores, pela gigante contribuição em minha formação profissional e pessoal, sem sombra de dúvidas, belos exemplos a me espelhar, prof. Dr. Pedro Dantas, um forte, apaixonado por sua profissão; a prof<sup>a</sup>. Dra. Liziane Maria de Lima um exemplo de determinação.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Agrárias (UEPB), a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Algodão), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Agrárias (UEPB), ao prof. Dr. Alberto Soares, Prof. Dr. Carlos Henrique e a todos professores do curso.

*In memória* ao prof. Dr. Napoleão Beltrão, uma pessoa muito humana e amante da erudição.

A minha namorada Mariel Leon, pela força que me deu.

A toda equipe de biotecnologia da Embrapa Algodão: Vandrê, Antônio, Juarez, Lane, Morgana, Monaliza, Emanuele, Eveline, Geise, Valeska, Milena, Aline.

As pessoas que tive a oportunidade de conhecer, cultivar uma boa amizade e que me ajudaram de modo direto e indireto, Renan, Janivan, Antônio, Jeferson Dutra, Flávio, Ivomberg Junior, Alisson, Sérgio.

Agradeço a todos que de qualquer forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
2.1. Geral .....	14
2.2. Objetivos específicos.....	14
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
3.1. Algodão – considerações gerais .....	15
3.2. Estresse hídrico .....	15
3.3. Expressão gênica .....	18
3.3.1. Ácido Abscísico (ABA).....	19
3.3.2. Late-embryogenesis-abundant (LEA).....	21
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
4.1. Localização do experimento.....	23
4.2. Fatores em estudo e delineamento experimental.....	23
4.3. Descrição do experimento .....	23
4.3.1. Recuperação das plantas pós-estresse hídrico .....	24
4.4. Variáveis analisadas .....	25
4.4.1. Crescimento e fisiologia .....	25
4.4.2. Expressão dos genes NCED e LEA .....	26
4.4.2.1. Extração de RNA total .....	26
4.4.2.2. Desenho dos oligonucleotídeos .....	26
4.4.2.3. Síntese de cDNA e RT-PCR Semiquantitativa.....	27
4.5. Análises estatísticas.....	28
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>29</b>
5.1. Crescimento das plantas .....	29
5.1.1. Altura de plantas (ALT) Diâmetro de Caule (DC) e Número de Folhas (NF), em avaliações com 1 e 7 dias de estresse hídrico (DEH) e recuperação. ....	29
5.2. Área foliar e fitomassas para tratamentos com 5 dias de estresse hídrico (DEH), final do estresse e recuperação. ....	34
5.3. Umidade do solo.....	42
5.4. Reidratação foliar .....	43
5.5 Trocas gasosas.....	44
5.5.1. Condutância estomática (gs).....	47
5.5.2. Fotossíntese (A) .....	49
5.5.4. Transpiração (E) .....	52
5.5.5. Eficiência instantânea do uso da água (A/E) .....	54
5.5.6. Eficiência instantânea da carboxilação (EiC) .....	56
5.6. Expressão gênica .....	58

5.6.1. NCED (9-cis-epoxicarotenoide dioxigenase) .....	58
5.6.2. LEA (Late Embryogenesis Abundant) .....	59
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>62</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>63</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Identificação gênica, sequência nucleotídica dos oligonucleotídeos e temperaturas de anelamento. ....	27
<b>Tabela 2.</b> Resumo da análise de variância para número de folhas (NF), altura de plantas (ALT) (cm) e diâmetro do caule (DC) (mm) em genótipos de algodoeiros, sob dois manejos hídricos (Tratamentos). Campina Grande-PB, 2013. ....	30
<b>Tabela 3.</b> Altura de Plantas (ALT), Diâmetro de Caule (DC) e Número de Folhas (NF) com um dia de estresse hídrico e sem estresse hídrico para genótipos. ....	31
<b>Tabela 4.</b> Altura de Plantas (ALT), Diâmetro de Caule (DC) e Número de Folhas (NF) com sete de estresse hídrico e sem estresse hídrico para genótipos. ....	33
<b>Tabela 5.</b> Altura de Plantas (ALT), Diâmetro de Caule (DC) e Número de Folhas (NF) no período de recuperação estresse hídrico e sem estresse hídrico para genótipos. ....	34
<b>Tabela 6.</b> Resumos das análises de variância para variáveis área foliar (AF), fitomassa da folha (FSF), fitomassa do caule (DC), fitomassa da raiz (FSR) e relação raiz/parte aérea (R/PA), sob dois manejos hídricos (Tratamentos), Campina Grande, 2013. ....	35
<b>Tabela 7.</b> Área Foliar (AF), Fitomassa Folha (FSF), Fitomassa Caule (FSC), Fitomassa Raiz (FSR) e Raiz/Parte Aérea (R/PA), com cinco dias de estresse hídrico para genótipos. ....	37
<b>Tabela 8.</b> Área Foliar (AF), Fitomassa Folha (FSF), Fitomassa Caule (FSC), Fitomassa Raiz (FSR) e Raiz/Parte Aérea (R/PA), no final do estresse hídrico para genótipos. ....	39
<b>Tabela 9.</b> Área Foliar (AF), Fitomassa Folha (FSF), Fitomassa Caule (FSC), Fitomassa Raiz (FSR) e Raiz/Parte Aérea (R/PA), na recuperação para genótipos. ....	41
<b>Tabela 10.</b> Resumo da análise de variância para umidade de solo ao final da exposição ao estresse hídrico de cada genótipo, Campina Grande, 2013. ....	42
<b>Tabela 11.</b> Resumo da análise de variância para reidratação foliar ao final da exposição ao estresse hídrico de cada genótipo, Campina Grande, 2013. ....	43
<b>Tabela 12.</b> Resumo da análise de variância para carbono interno (Ci) ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ), transpiração (E) ( $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), condutância estomática (gs) ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), fotossíntese (A) ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), eficiência instantânea do uso da água (EUA - A/E), eficiência instantânea da carboxilação (E/Ci). ....	45



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Rota de biossíntese de ABA em plantas.....	20
<b>Figura 2.</b> Umidade de solo.....	42
<b>Figura 3.</b> Teste de média para capacidade foliar de absorção de água de cada genótipo, ao final da exposição do estresse hídrico.....	44
<b>Figura 4.</b> Condutância estomática (gs).....	48
<b>Figura 5.</b> Fotossíntese (A).....	50
<b>Figura 6.</b> Concentração interna foliar de CO <sub>2</sub> (Ci).....	52
<b>Figura 7.</b> Transpiração (E).....	53
<b>Figura 8.</b> Eficiência instantânea do uso da água (EUA).....	55
<b>Figura 9.</b> Eficiência instantânea da carboxilação (EiC).....	57
<b>Figura 10.</b> Eletroforese em gel de Agarose 0,8% (p/v) da RT-PCR semi-quantitativa com o oligonucleotídeo constitutivo Ubiquitina e os específicos NCED e LEA.....	60

## LISTA DE ABREVEATURAS

A.....	Fotossíntese
ABA.....	Ácido abscísico
AF.....	Área foliar
ALT.....	Altura de plantas
CH.....	Com estresse hídrico
<i>C<sub>i</sub></i> .....	Carbono interno
DAE.....	Dias após emergência
DC.....	Diâmetro de caule
DEH.....	Dias de estresse hídrico
<i>E</i> .....	Transpiração
<i>E<sub>i</sub>C</i> .....	Eficiência instantânea da carboxilação
EH.....	Estresse hídrico
EUA.....	Eficiência instantânea do uso da água
FSC.....	Fitomassa caule
FSF.....	Fitomassa folha
FSR.....	Fitomassa raiz
<i>g</i> .....	Condutância estomática
LEA.....	Late Embryogenesis Abundant
NCED.....	9-cis-epoxicarotenoide dioxigenase
NF.....	Número de folhas
R/PA.....	Relação raiz parte aérea
SEH.....	Sem estresse hídrico

## RESUMO

A cultura do algodoeiro colorido no Nordeste brasileiro, em grande parte, é praticada por pequenos produtores, o que a torna de suma importância para a economia local, gerando emprego e renda. Considerando as peculiaridades climáticas da região, principalmente, as frequentes estiagens, é importante a identificação de genótipos tolerantes ao estresse hídrico. Com esse enfoque, objetivou-se nesta pesquisa estudar a tolerância de genótipos de algodão colorido, na fase inicial de crescimento, com base em parâmetros fisiológicos e de expressão gênica. Foram utilizadas sementes de 6 genótipos de algodão colorido, oriundos do BAG da Embrapa Algodão: ‘CNPA 2009-6’, ‘CNPA 2009-11’, ‘BRS SAFIRA’, ‘BRS TOPÁZIO’, ‘CNPA 2009-13’ e ‘CNPA 2009-50’. A semeadura foi em tubetes, em ambiente protegido. Foram testados dois manejos, sem estresse hídrico e com estresse hídrico, iniciando-se este quando as primeiras folhas verdadeiras atingiram 6 cm<sup>2</sup>, permitindo a avaliação de trocas gasosas. Para os estudos de expressão dos genes NCED e LEA, foram coletadas folhas em três datas, no dia em que ocorreu a queda da condutância estomática, dois dias depois e na recuperação da turgescência. A redução da condutância estomática foi um bom indicativo da deficiência de umidade do solo. Os genótipos CNPA 2009-11 e CNPA 2009-13 não expressaram o mesmo gene NCED na redução da condutância estomática de 61% para 31%, e de 83 para 28% respectivamente; foi observada presença das proteínas LEA nos genótipos CNPA 2009-6 e BRS SAFIRA, aos seis dias de estresse hídrico e nos genótipos CNPA 2009-3 e BRS SAFIRA na recuperação. Ao final do estresse hídrico, os tubetes contendo os genótipos tinham um teor similar de umidade de solo. Os genótipos CNPA 2009-13 e CNPA 2009-50 foram mais tolerantes ao estresse hídrico, pois foram os últimos a externarem sinais de debilidade causados pelo estresse hídrico, no entanto o genótipo CNPA 2009-6 reagiu melhor à reidratação, possuindo maiores índices de número de folhas, área foliar e fitomassa folha, todavia, ao final do tratamento sem estresse hídrico, os genótipos CNPA 2009-11, CNPA 2009-13 e CNPA 2009-50 obtiveram maiores fitomassas, folha, caule e raiz.

**Palavras-chave:** *Gossypium hirsutum*, trocas gasosas, expressão gênica, genes LEA e NCED

## ABSTRACT

The culture of naturally colored cotton in the Brazilian Northeast has great part of its production due to small farmers, what makes it of vital importance for the local economy, generating employment and income. Considering the climate peculiarities of the region, mainly frequent droughts, it is important the identification of genotypes tolerant to water stress. With this focus, the objective of this research was to study the tolerance of naturally colored cotton genotypes, in the initial growth phase, based on physiologic parameters and gene expression. Were used seeds of 6 naturally colored cotton genotypes, originated from the BAG of Embrapa Cotton: CNPA 2009-6', 'CNPA 2009-11', 'BRS SAFIRA', 'BRS TOPÁZIO', 'CNPA 2009-13' e 'CNPA 2009-50'. The seeding was done in root trainers, in a protected environment. Two handlings were tested, without water stress and with water stress, initiating this when the first real leaves measured 6 cm<sup>2</sup>, allowing the evaluation of gas exchange. For the NCED and LEA genes expression studies, leaves were collected in the day that occurred the fall of stomatal conductance, two days after and in the recovery. The reduction of stomatal conductance was a good indicator of the humidity deficiency in the soil. The genotypes CNPA 2009-11 and CNPA 2009-13 didn't express the gene NCED in the reduction of stomatal conductance from 61% to 31%, and of 83% to 28%, respectively; it was observed the presence of LEA proteins in the genotypes CNPA 2009-6 and BRS SAFIRA, on the sixth day of water stress and in the genotypes CNPA 2009-3 and BRS SAFIRA on the recovery. In the end of the water stress, the root trainers containing these genotypes had a similar rate of soil humidity. The genotypes CNPA 2009-13 and CNPA 2009-50 were more tolerant to water stress, as they were the last to show signs of weakness due to water stress. However, the genotype CNPA 2009-6 reacted better to the rehydration, possessing higher indexes of number of leaves, leaf area, leaf phytomass. Nonetheless, in the end of the treatment without water stress, the genotypes CNPA 2009-11, CNPA 2009-13 and CNPA 2009-50 obtained greater phytomass, leaf, stem and root.

**Keywords:** *Gossypium hirsutum*, gas exchange, gene expression, and LEA genes NCED

## 1. INTRODUÇÃO

O algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L. var. *latifolium* Hutch.) é uma das principais culturas agrícolas em muitos países, sendo plantados, anualmente, cerca de 35 milhões de hectares. Dentre os vários tipos de fibras, de origem natural, artificial ou sintética, a pluma do algodão se destaca como a mais importante matéria-prima, com aumento gradual de sua demanda desde a década de 1950, a um crescimento anual médio de 2%. Plantada em mais de 60 países, movimenta cerca de US\$ 12 bilhões e envolve mais de 350 milhões de pessoas em sua produção, desde as fazendas até a logística, envolvendo descaroçamento, processamento e embalagem (ABRAPA, 2014).

No Brasil, as projeções de algodão em pluma indicam um aumento da produção de 1,6 milhão de toneladas em 2010/2011 para 2,4 milhões de toneladas em 2020/2021. Essa expansão corresponde a uma taxa de crescimento de 4,3% ao ano neste período (MAPA, 2011).

No Nordeste brasileiro, nos anos 1950, cerca de 50% de sua população estava empregada no setor do algodão, do plantio ao beneficiamento da pluma. Na década de 1960 e início dos anos 1970, o algodão nordestino chegou a representar mais de 40% da produção nacional, porém esse bom desempenho mudou na década de 1980, graças a agentes de ordem natural (irregularidades de chuvas) e a chegada ao país de uma praga oriunda do México, o bicudo (TORRES, 2009).

No entanto, as melhorias das técnicas de manejo da cultura na região, o manejo integrado de pragas (MIP), o melhoramento genético, a exploração de variedades de características mais atraentes, como a pluma colorida, têm permitido a recuperação da cultura na região Nordeste.

Da mesma maneira que as pesquisas voltadas à produção fizeram com que o estado de Goiás aumentasse a produtividade do algodão branco de 1,400 kg ha<sup>-1</sup> para 3,825 kg ha<sup>-1</sup> em quinze anos, também poderão contribuir para o aumento da produtividade do algodão de pluma colorida, pois este possui uma produtividade média de 615 kg ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2013). Por possuir

morfologia e fisiologia semelhante a do branco, é vista uma margem grande de melhoria para o algodão colorido.

Entretanto, para se conseguir aumentar sua produtividade, será necessário o desenvolvimento de genótipos mais adaptados à seca, condição predominante da região Nordeste, aumentando a sua capacidade de produção, mesmo nas condições de baixa umidade do solo, pois é sabido que o algodão pode suportar períodos de seca (MENESES, 2006; BATISTA, 2010).

Muitos trabalhos enfocando estresse hídrico em algodoeiro foram realizados, pesquisando, entre outros aspetos, zoneamento para seu cultivo (MEDEIROS, 1996), crescimento e desenvolvimento (MENESES et al., 2006), produção de biomassa (BLANCO et al, 2011), crescimento e produção (CAVALCANTE, et al, 2005), produção e qualidade intrínseca de fibras (BELTRÃO, ALMEIDA, 2003), trocas gasosas (CUSTÓDIO, et al., 2007), complementados com estudos envolvendo expressão gênica, como os realizados por Ackerson (1981), Payton et al. (2011) e Park et al. (2012), ao identificarem e relacionarem alguns genes associados ao mecanismo de defesa do algodoeiro ao estresse hídrico.

Considerando o exposto, esses estudos reforçam a necessidade da investigação científica por genótipos de melhores respostas ao estresse hídrico para atender à demanda mundial.

Visto a tolerância à seca, em plantas, não ser uma característica simples, mas uma série complexa de mecanismos que atuam em conjunto ou não para evitar ou tolerar o estresse hídrico. Assim pode-se concluir que a tolerância à seca é uma característica poligênica, e a fisiologia juntamente com a biologia molecular assumem papel chave na identificação e compreensão de genes envolvidos nesse processo, levando a elucidar rotas metabólicas de respostas à seca. Compreender como esses eventos são ativados/desativados e como interagem entre si será essencial no desenvolvimento de novas variedades mais tolerantes a períodos de seca (NEPOMUCEMO et al., 2001).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral**

Avaliar a tolerância de genótipos de algodoeiro ao estresse hídrico, com base em estudos fisiológicos e de expressão gênica, na fase inicial de crescimento.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar o crescimento inicial de seis genótipos de algodoeiro submetidos à deficiência hídrica;
- Analisar as alterações em trocas gasosas nos genótipos de algodoeiro em função de déficit hídrico;
- Analisar as expressões dos genes NCED e LEA e a possível relação com a tolerância dos genótipos à deficiência hídrica;
- Avaliar o grau de recuperação dos genótipos após cessado o fator de estresse;
- Identificar os níveis de tolerância dos genótipos, utilizados na pesquisa, ao estresse hídrico.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Algodão – considerações gerais

Há vários registros sobre cultivo de algodão, desde a antiguidade. No Brasil, sabe-se que, na época do descobrimento, os indígenas cultivavam o algodão e o transformavam em fios e tecidos (CAMINHA, 2000).

O gênero *Gossypium* é constituído de 52 espécies, sendo cultivadas apenas quatro, dentre elas: *G. arboreum* L. e *G. herbaceum* L., diploides ( $2n = 2x = 26$ ) e nativas do Velho Mundo; *G. hirsutum* L. e *G. barbadense* L., alotetraploides ( $2n = 4x = 52$ ) e nativas do novo mundo. As demais espécies são silvestres e não apresentam valor econômico. O *G. hirsutum* L. contribui com a maioria da fibra produzida mundialmente, em torno de 90% (BELTRÃO E SOUZA, 1999).

No que se refere ao meio de propagação, Beltrão e Souza (1999) explicam que a principal via de propagação do algodoeiro é por intermédio de sementes. Em relação à polinização e a fecundação, o algodoeiro é classificado como uma planta autógama, que se autofecunda, embora a taxa de cruzamento natural possa atingir 50% ou mais (CIA, FREIRE, SANTOS, 1999).

#### 3.2. Estresse hídrico

De acordo com Salamoni (2008), o estresse na planta pode ser entendido como qualquer fator externo que exerce influência desvantajosa sobre a planta, induzindo respostas reversíveis ou permanente em todos os níveis do organismo. Para Lechinoski et al. (2007), o estresse é como uma pressão excessiva de algum fator adverso que apresenta a tendência de inibir o normal funcionamento dos sistemas.

No que se refere às condições hídricas, segundo Osmond et al. (1982), na planta existe uma absorção contínua de água que é essencial para o seu crescimento e desenvolvimento, pois em certas condições a maioria das plantas chega a perder mais água, em um dia, do que o seu próprio peso (OSMOND et al., 1982). As plantas cultivadas estão constantemente expostas a tal



fato. Devido a isso, desde o início do século XX, os fisiologistas vegetais já se preocupavam com o efeito da perda de água pela transpiração sobre o crescimento das plantas (PIMENTEL, 2004), pois, no mundo, provavelmente, mais plantas sofrem injúrias ou morrem por desidratação causada pela transpiração excessiva que por outro fator (KRAMER e BOYER, 1995).

Sabe-se também que uma das características mais marcantes do semiárido brasileiro é a má distribuição espacial e temporal de chuvas, somado às elevadas temperaturas intrínsecas, alto índice de radiação solar e as variações nas concentrações de CO<sub>2</sub> incidentes sobre as plantas. Estes fatores podem induzir a distúrbios morfofisiológicos, influenciando na conformação física dos vegetais, refletindo na diminuição do crescimento e produção (BELTRÃO e OLIVEIRA 2008; FERRAZ et al. 2011).

A seca é considerada um estresse ambiental que, segundo Larcher (2006), é um estado em que a demanda de energia pela planta para sua manutenção (sobrevivência) é maior que a produção, o que leva a uma desestabilização inicial das funções da planta, seguida por normalização e indução dos processos fisiológicos de adaptação.

Conforme a teoria de Dixon, proposta no ano de 1894, na planta, existe uma coluna de água contínua, desde a raiz até a parte aérea (TYREE, 1997). Quando uma árvore transpira, a água sai do topo formando uma tensão, pressão hidrostática negativa, a qual puxa a água pelo xilema, levando-a a todas as partes da planta, teoria tensão-pressão-transpiração (TAIZ e ZIEIGER, 2009), diminuindo a água disponível do solo. O problema ocorre quando a taxa de transpiração da planta é maior que a reposição de água no solo e a reserva de água diminui, tornando o balanço hídrico da cultura negativo (ANGELOCCI, 2002).

De acordo com fontes da AGEVAP (2013), Instituto Nacional de Meteorologia (2014) e CPTEC (2014), na região semiárida do Nordeste Brasileiro, onde o algodoeiro colorido é cultivado, as precipitações médias anuais são em torno de 500 a 800 mm.ano<sup>-1</sup> e há uma evaporação média de 2000 mm.ano<sup>-1</sup>, ou seja, as plantas dessa região vivem em constante estresse hídrico.

A circunstância de estresse hídrico, além de reduzir o crescimento, reduz também a produtividade vegetal mais que todos os outros estresses combinados, podendo ocorrer em qualquer local, mesmo em regiões úmidas (CUSHMAN e BOHNERT, 2000).

O desenvolvimento do sistema radicular do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) é de controle genético, mas pode ser modificado por fatores ambientais. O sistema radicular é uma parte integral do sistema “solo-planta” e, como tal, fornece os meios para absorção de água e nutrientes, bem como a produção de hormônios chave para a planta, como ácido abscísico,

citocininas e geberelinas. Além disso, o sistema radicular está sujeito a inúmeras influências, tais como: diferentes propriedades do solo; microflora do solo e animais que agem sozinhos ou em conjunto, causando impactos no desenvolvimento das raízes e, conseqüentemente, das plantas (MCMICHAEL et al., 2011).

O sistema radicular de uma planta funciona como um sensor primário, detectando deficiência hídrica em função da diminuição de água no solo (PIMENTEL, 2004). Em condições de seca, o desenvolvimento das raízes das plantas pode sofrer alteração, diminuindo, mantendo ou aumentando em tamanho, área e volume. O aumento das raízes é desejável, pois nas conforme Duncan e Baligar (1992) alguns atributos radiculares como profundidade, volume, área superficial, longevidade, condutância hidráulica, entre outras, trazem benefícios principalmente para a agricultura tropical de baixo custo tecnológico.

Para Fernandes (2005), o estresse hídrico moderado no algodoeiro, faz com que a planta aumente seu sistema radicular, por aprofundar suas raízes em busca de água. Todavia, o aumento do estresse resultará na formação de folhas pequenas, com redução do índice de área foliar e conseqüente redução na absorção de luz pela planta e na produção de fotoassimilados. Citações similares são feitas por Meneses (2006), ao citar que baixos potenciais hídricos promovem a redução na alocação de biomassa para as folhas, sendo uma condição de restrição ao desenvolvimento foliar. O autor cita, também, que o déficit hídrico determina reduções em condutância estomática, fitomassa foliar e área foliar das plantas e, ainda, que o crescimento e desenvolvimento foliar de algodoeiro são influenciados pela variação do potencial hídrico do solo e pelo genótipo.

Nepomuceno (1998), ao analisar respostas fisiológicas de plantas de algodoeiro submetidas a estresse hídrico, por meio de polietilenoglicol, verificou queda na fotossíntese de duas das quatro variedades em estudo. Genty et al. (1987), ao analisarem o efeito da restrição hídrica nos fotossistemas de algodoeiro, também observaram que a restrição hídrica induzia a diminuição da fotossíntese, sendo o fato atribuído a uma desaceleração dos mediadores de transporte de elétrons após as plastoquinonas. Nepomuceno (1998) também busca justificativa à diminuição da produção da fotossíntese, e ao comparar as plantas que tiveram diminuição da fotossíntese com as que mantiveram o nível fotossintético, atribuiu tal fato à queda da turgescência dos tecidos, conseqüência do desequilíbrio osmótico. Outra explicação buscada por Nepomuceno é dada a uma provável ausência de um mecanismo de proteção redox, que ajudaria a manter a função metabólica.

No algodoeiro, Batista (2010) cita que o estresse por deficiência hídrica também pode levar à diminuição do número de estruturas reprodutivas, da altura das plantas, do número de capulhos por plantas, rendimento de fibra, produtividade de algodão em caroço e, conseqüentemente, na produtividade.

O algodoeiro necessita de cuidados, principalmente, no período entre a emissão dos primeiros botões florais e a abertura da flor, o período de maior sensibilidade da planta à deficiência hídrica (MARIANATO E LIMA, 1982; PAYTON et al., 2002; PETTIGREW, 2004).

Mesmo sendo o algodoeiro uma planta com mecanismos que antecipam os efeitos negativos da seca, com a síntese de osmólitos – proteínas de choque térmico e acumulação de antioxidantes – sua capacidade de proteção depende de vários fatores, como, tempo de exposição ao estresse, momento e a forma do estresse (súbita ou gradual), sendo as reduções de produtividade e qualidade inevitáveis. Contudo, os avanços fisiológicos aumentam na identificação de substâncias exógenas ou endógenas, que possam amenizar os efeitos negativos da seca e a nível molecular na busca de genes envolvidos na tolerância à seca (LOKA, 2011).

### **3.3. Expressão gênica**

A expressão gênica pode ser descrita como um conjunto de processos que ocorrem para que um organismo, tecido ou célula, inicie, aumente, diminua ou cesse a elaboração de produtos finais de seus genes, proteínas e/ou RNAs (MARTINS e FILHO, 2010).

Ao ser submetida a estresse, biótico ou abiótico, a planta inicia um complexo processo de adaptação, mudanças morfológicas e fisiológicas, incluindo a expressão de genes que dão à planta o caráter de tolerância ao estresse. A identificação e o entendimento de como esses eventos são ativados/desativados e como interagem entre si é essencial no desenvolvimento de variedades mais tolerantes, dessa maneira genótipos que diferem em tolerância, devem apresentar diferenças qualitativas e quantitativas em expressão gênica (NEPOMUCENO et al., 2001).

Os estudos com *Arabidopsis thaliana* têm fundamental relevância, pois os meios de defesa abrangidos no processo de tolerância à seca entre as plantas aparentam ser muito similares, apontando ocorrência de etapas comuns nas rotas de sinalização e percepção molecular (KASUGA et al., 2004; STOLF, 2007). Dessa maneira, as pesquisas de expressão gênica desenvolvidas nas espécies modelos, podem ajudar nos estudos e compreensões de genes com função chave nos mecanismos de várias espécies (STOLF, 2007).

No que se refere ao estresse hídrico, estudos em *A. thaliana* evidenciaram que a resposta inicial do estresse hídrico é mediada por uma Histidina Quinase Transmembrana (AtHK1), em alta ou baixa osmolaridade, o gene é altamente expresso nas raízes (RIERA, 2005). Esta enzima possui o papel de regular as mudanças no potencial osmótico dentro da célula, iniciando a indução de genes relacionados ao estresse hídrico. Estas respostas seguem em dois caminhos distintos, envolvendo ou não a ação do Ácido Abscísico (ABA) (CHAVES, 2003).

A tolerância à seca é uma complexa via que ainda precisa ser elucidada completamente. Um dos principais fatores que dificulta o maior esclarecimento sobre o assunto, é por este ser diretamente relacionada à expressão de diversos genes que dependem de ações conjuntas e da interação de caracteres morfológicos (área reduzida da folha, índice de cera, sistema radicular eficiente), fisiológicos (transpiração reduzida, elevado e eficiente uso de água, fechamento estomático e eficiência fotoquímica) e bioquímicos (acúmulo de solutos como prolina e glicina, betaína, entre outros), no entanto, avançadas técnicas da engenharia genética tem ajudado nessa resolução. Por meio de mecanismos moleculares de respostas ao estresse hídrico, modificações genéticas de tolerância ao estresse hídrico têm apresentado resultados promissores que podem ser aplicados na agricultura (NEPOMUCENO et al. 2001; WANG et al., 2003; HUNDERTMARK, HINCHA, 2008; LOKA, 2011).

### **3.3.1. Ácido Abscísico (ABA)**

Entre os anos de 1950 a 1960, dois grupos de cientistas descobriram, em plantas de algodão, um hormônio vegetal, antagônico à auxina, com capacidade potencial para reduzir o crescimento da planta. Sua atividade substancial estava diretamente ligada à queda prematura dos frutos e, a partir de então, foram desvendadas funções hormonais no controle de: (a) abscisão; (b) dormência de sementes e gemas; (c) fechamento estomático e permeabilidade das células em geral; (d) resposta a fatores de estresse, em especial, ao hídrico; (e) amadurecimento de frutos e outros fenômenos relacionados à senescência. Somente com os representantes dos dois grupos científicos, B. V. Milborrow e F. T. Addicott, responsáveis pela descoberta deste hormônio, na 6ª Conferência Internacional sobre Substâncias de Crescimento de Plantas em 1967 em Ottawa, Canadá, foi eleito o nome ácido abscísico, e sua sigla ABA (ADDICOTT e LYON, 1969).

Logo após sua descoberta, as funções, os momentos e as condições de atuação do ABA vêm sendo estudadas, citando-se, como exemplo, o trabalho desenvolvido por Ackerson (1981), ao confirmar que o estresse hídrico em algodoeiro causa acúmulo de ABA em folhas e



Em estudo com estresse hídrico em plantas de feijão, Quin e Zeevaart (1999) confirmaram a expressão do gene NCED e uma grande acumulação de ABA nas folhas e nas raízes, porém, em proporções bem menores nestas últimas. Eles atribuíram a produção de ABA ao estresse hídrico, pois ao reidratarem as plantas, a quantidade de ABA foi diminuindo.

Wei et al.(2012) ao analisarem a dinâmica fonte-dreno de ABA, relataram ser necessário um constante suprimento de ABA nas raízes, para manter os níveis de ABA nas folhas, e acrescentam que no sentido oposto do NCED existem enzimas que possuem funções controladoras, que degradam o ABA.

É plausível a habilidade das plantas em direcionar o ABA das raízes (local onde é sintetizado) às partes mais distantes, como as folhas e toda copa da planta. Apesar do fluxo principal de água na raiz se dar no sentido solo raízes, existe um pequeno fluxo de água que sai da raiz para o solo, e a planta faz uso desse fluxo, para expelir o ABA, e assim absorvê-lo, dessa vez por via apoplástica alocando-o, de modo emergencial, para a parte aérea (FRENSCH, 1997; HARTUNG et al., 2002; PIMETEL, 2004).

### **3.3.2. Late-embryogenesis-abundant (LEA)**

A deficiência hídrica provoca um complexo de respostas a partir da percepção do estresse, iniciando-se na transdução de sinal e se manifesta em alterações celulares, fisiológicas e em níveis de desenvolvimento. O conjunto de respostas da planta depende de vários fatores: gravidade; duração do estresse; genótipo da planta; estágio de desenvolvimento e dos fatores ambientais proporcionadores do estresse. Considerando tal complexidade, a busca por respostas que levem a melhorias na tolerância ao estresse tem sido intensificada nos últimos anos, principalmente no isolamento de genes envolvidos no estresse hídrico, a fim de estudar a função e as vias que levam a sua indução (PARK et al., 2012).

As proteínas LEA também atuam durante o processo de desidratação e dissecação celular, ocasionado pelo estresse hídrico. No citoplasma ocorre acumulação de macromoléculas, tais como oligossacarídeos, e proteínas aumentando a viscosidade citoplasmática, fazendo com que essas proteínas se unam a moléculas de açúcares formando cristais, proporcionando dessa maneira proteção contra a desnaturação intracelular de moléculas grandes, estabilizando as membranas plasmáticas (BURKE, 1986; SHIH, et al., 2008). Após serem submetidas a elevados níveis de estresse hídricos, ou a tratamentos com ABA exógeno, nas plantas mais tolerantes são registrados perfis mais elevados de LEA, que as plantas menos resistentes, caracterizando a

maior tolerância da planta ao estresse hídrico por sua maior capacidade de sintetizar e acumular LEA (MOONS et al., 1995; BRAY, 1993).

Entre os genes estudados, envolvidos na tolerância da planta ao estresse hídrico, estão os genes do grupo LEA. Esses genes codificam proteínas de baixo peso molecular (10 a 30 kDa) envolvidas na proteção das plantas a danos causados por estresses ambientais, especialmente a seca (desidratação). As proteínas LEA são geralmente classificadas em seis grupos ou famílias, de acordo com a sequência de aminoácidos e as correspondentes homologias de mRNA, os quais são localizados, basicamente, no citoplasma e na região nuclear. A síntese das proteínas LEA, a expressão e as atividades biológicas podem ser reguladas por vários fatores como, estágios de desenvolvimento, hormônios, mudanças de íons e desidratação. Apesar de serem amplamente divulgadas por desempenharem um papel crucial à desidratação, suas funções fisiológicas e bioquímicas são em grande parte desconhecidas (HUNDERTMARK e HINCHA, 2008), sendo a caracterização do mecanismo regulatório da expressão gênica do LEA um fator muito importante da biologia molecular das plantas a ser esclarecido (HONG-BO et al., 2005).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Localização do experimento**

Inicialmente, foi realizado um ensaio preliminar na mesma casa de vegetação, usando os mesmos genótipos e as mesmas condições, para serem definidos os dias da implantação dos tratamentos a serem analisados.

O experimento foi realizado em casa de vegetação, no período de abril a maio de 2013, no Centro de Tecnologia e Recursos Naturais (CTRN) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), em Campina Grande - PB, nas coordenadas 07° 13' 50" de latitude, -35° 52' 52" de longitude e 551 m altitude. Os estudos de expressão gênica foram realizados no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão, Campina Grande - PB.

### **4.2. Fatores em estudo e delineamento experimental**

Foram estudados seis genótipos de algodoeiro (CNPA 2009-6, CNPA 2009-11, CNPA 2009-13, CNPA 2009-50, BRS Safira, BRS Topázio) e manejos hídricos (com e sem estresse hídrico), combinados no esquema fatorial 6 x 2 e organizados no delineamento experimental em blocos ao acaso (3 blocos), com 15 plantas por parcela.

### **4.3. Descrição do experimento**

Os genótipos de algodoeiro foram obtidos no Banco de Germoplasma de Algodão da Embrapa Algodão. Foram semeadas três sementes por tubete (capacidade volumétrica de 288 mL) preenchido com substrato comercial, composto por terra vegetal, coco verde triturado, cavaco de madeira, esterco de curral e adubo químico. Transcorridos dez dias após a emergência das plântulas, realizou-se o desbaste, deixando-se apenas uma planta por tubete.

A irrigação foi efetuada diariamente, pela manhã, aplicando-se uma quantidade de água suficiente para começar drenagem, procurando-se manter o teor de umidade do solo próximo ao da capacidade de campo. Em metade das plantas a irrigação foi diária durante todo o



experimento, correspondendo ao tratamento sem estresse hídrico (SEH). No outro grupo, foi suspensa a irrigação no 13º dia após a emergência (DAE) das plântulas, quando o limbo da primeira folha definitiva atingiu dimensões mínimas de 6 cm<sup>2</sup> (3 x 2 cm de área contínua), possibilitando as avaliações de trocas gasosas, constituindo essas plantas o tratamento com estresse hídrico (CE).

A partir do 13º DAE, foram realizadas leituras de trocas gasosas no 1º, 3º, 4º e 6º dia de estresse hídrico, nas plantas do grupo com e sem estresse hídrico, utilizando um aparelho contendo IRGA (Infra Red Gas Analyser), modelo LCpro+ (ADC Bioscientific).

Essas leituras sucessivas visaram identificar o dia que as plantas estressadas tivessem com a condutância estomática (*gs*) de 50% ou menor em comparação com a planta não estressada, momento determinante para coleta de folhas, para as análises de expressão dos genes NCED (9-cis-epoxicarotenoide dioxigenase) e LEA (abundantes na embriogênese tardia), envolvidos na síntese do ABA (ácido abscísico).

A queda média dos valores da *gs* de 79% para 36% aconteceu no quarto dia após suspensão da irrigação, coletando-se, também, material foliar no sexto dia, quando a média da *gs* estava em 25%, objetivando avaliar as alterações gênicas entre as duas amostragens.

Para a análise de expressão gênica, foram coletadas apenas folhas verdadeiras, jovens, bem formadas e íntegras. As folhas foram destacadas das plantas com auxílio de bisturi, separando-as na base do pecíolo. As plantas usadas para análise de expressão gênica, após as coletas de folhas, foram descartadas.

#### **4.3.1. Recuperação das plantas pós-estresse hídrico**

Foi determinado que as plantas de cada genótipo permanecessem sob estresse até que 50% de suas folhas cotiledonares estivessem secas ou caídas, tempo esse que variou, sendo dez dias para o CNPA 2009-6, treze dias para os CNPA 2009-11, BRS SAFIRA, BRS TOPÁZIO e quinze dias para os CNPA 2009-13 e CNPA 2009-50. Após isso, as plantas foram novamente irrigadas, realizando análises de trocas gasosas com aparelho contendo IRGA. Quando as plantas recuperaram a turgidez das folhas, (o que variou entre os genótipos, sendo necessários três dias de reidratação para o genótipo CNPA 2009-6 e quatro dias para os demais genótipos) foram realizadas análises de trocas gasosas e, logo em seguida, fez-se nova coleta de folhas para os estudos de expressão gênica. Todos os genótipos permaneceram sob rega por um total de nove dias, para ser analisada a capacidade de recuperação.

## 4.4. Variáveis analisadas

### 4.4.1. Crescimento e fisiologia

Foram realizadas três avaliações de crescimento, com 1 (um) e 7 (sete) dias de estresse hídrico (DEH) e na recuperação. As variáveis foram: altura da planta (ALT), diâmetro do caule (DC) e número de folhas (NF). A altura foi medida do colo à gema apical em cm e o diâmetro foi mensurado na base do caule (rente à superfície do solo), com auxílio de um paquímetro digital, em mm. Para números de folhas, foram consideradas as que atingiam o tamanho aproximado de 1/3 de uma folha desenvolvida.

No momento final do estresse hídrico foram coletadas amostras de solos, colocadas em bandejas de alumínio, em seguida, pesadas em balança analítica de quatro casas decimais, e colocadas para secagem à lâmpada por 24 horas, logo após, pesadas novamente e, por meio de diferença de peso foi obtida a porcentagem de umidade do solo.

Ao final do período de estresse hídrico, também foi avaliada a reidratação foliar de cada genótipo, pesando as folhas e colocando-as em embebição por um período de oito horas. Transcorrido esse tempo, retirou-se, rapidamente, o excesso de água da superfície das folhas, com auxílio de papel toalha, e foram pesadas imediatamente em balança analítica de quatro casas decimais, calculando-se a absorção de água por diferença de peso.

Com uso de um aparelho contendo IRGA, iniciando às 8h00min da manhã, as trocas gasosas foram determinadas, sempre na mesma folha, regulando-se a densidade de fluxo de fótons fotossintéticos em  $1.200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , temperatura do ar de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  e concentração interna de  $\text{CO}_2$  no nível do ambiente (MAGALHÃES FILHO et al., 2008). Foram observadas as leituras das seguintes variáveis: condutância estomática ( $g_s$ ) ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ) ( $\mu\text{mol. m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); transpiração ( $E$ ) ( $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ). Através da relação entre a taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ) e a transpiração ( $E$ ), obteve-se a eficiência intrínseca no uso da água (EUA) ( $A/E$ ) [ $(\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}) (\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1})^{-1}$ ]. Estimou-se, também, a eficiência instantânea da carboxilação ( $E_iC$ ) ( $A/C_i$ ) obtida pela relação entre a taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ) e a concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) [ $(\mu\text{mol. m}^{-2} \text{s}^{-1}) (\mu\text{mol mol}^{-1})^{-1}$ ] (MAGALHÃES FILHO et al., 2008).

Por ocasião da coleta das plantas, realizadas com 5 DEH, final do estresse hídrico e na recuperação, as folhas foram separadas. Com uso do equipamento medidor de área foliar da marca LI-COR e modelo Li-3100C, foi realizada a medição da área foliar (AF), separando-se, também, as raízes e o caule, acondicionando as várias partes em sacos de papel, colocados em

estufa a 65 °C, para secagem, até obtenção de peso constante. Após isso, realizou-se a pesagem desse material, obtendo-se a fitomassa de raiz (FSR), caule (FSC) e folhas (FSF) e, a partir desses valores, obteve-se a relação raiz/parte aérea (FSR)/(FSC+FSF).

Para os resultados de laboratório, a expressão gênica foi validada pela presença ou ausência de bandas correspondentes aos genes NCED e LEA.

#### **4.4.2. Expressão dos genes NCED e LEA**

Para as análises de expressão gênica foram coletadas folhas íntegras, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C. A data da coleta das folhas foi determinada a partir das análises de trocas gasosas, sendo utilizado como critério determinante para a primeira coleta o dia que as plantas estressadas tivessem com a condutância estomática de 50% ou menor em comparação à planta não estressada, o que ocorreu aos quatro dias de estresse hídrico. A segunda coleta de folhas foi realizada dois dias após a queda da condutância estomática, ou seja, seis dias após iniciado o estresse hídrico, na continuidade do estresse. A terceira coleta de folhas foi realizada na fase de recuperação das plantas, para verificar a atuação desses genes quando as folhas das plantas estivessem completamente turgidas, sendo no terceiro dia para o genótipo CNPA 2009-6 e no quarto dia para os demais.

##### **4.4.2.1. Extração de RNA total**

Para a extração de RNA total, as folhas foram maceradas em N<sub>2</sub> líquido, com o auxílio de almofariz e pistilo, até a obtenção de um pó fino, em seguida o RNA total foi extraído utilizando o Invisorb Kit (Invitek), seguindo as recomendações do fabricante. Os RNAs totais foram analisados em gel de agarose a 0,8% e quantificados em espectrofotômetro na absorvância 230 nm (marca eppendorf e modelo BioPhotometer plus).

Com o objetivo de diminuir a presença de falsos positivos que poderiam resultar da amplificação de fragmentos de DNA genômico, 1 µg de RNA total extraído de cada amostra foi tratado com 1U/µL da DNase I (BioLab), seguindo as recomendações do fabricante, para digestão de qualquer DNA genômico presente na amostra.

##### **4.4.2.2. Desenho dos oligonucleotídeos**

Os oligonucleotídeos específicos, para dois genes NCED (GenBank: HM145908.1 e NCBI Reference Sequence: NM\_117945.2) e LEA (GenBank: M73752.1; GenBank: M86754.1; GenBank: M86753.1; GenBank: M85261.1; GenBank: M83303.1; GenBank: M83304.1), foram desenhados e sintetizados a partir das sequências selecionadas utilizando o programa

computacional Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>). O programa Clustal X foi utilizado para fazer o alinhamento dos genes encontrados com o intuito de identificar a sua homologia, assim como o programa Oligo Analysis Tool, para conferir a possível formação de dímeros nas sequências.

O desenho seguiu os seguintes critérios: máximo de 20 pares de base (pb), conteúdo de GC entre 45% a 50%, temperatura de anelamento até 60°C e amplicons de aproximadamente 200 pb. Como pode ser observado na tabela 1.

**Tabela 1.** Identificação gênica, sequência nucleotídica dos oligonucleotídeos e temperaturas de anelamento.

Gene	Sequência de nucleotídeos	Temperatura de anelamento
NCED	F - 5' ATGATCCACGATTTTCGCCAT 3'	58°C
	R - 3' TCCCAAGCATTCCAAAGATG 5'	
LEA	F - 5' TGAGGAATGCACCACAAGAG 3'	45°C
	R - 3' TCACCGCCAGACATATCAGA 5'	
UBIQUITINA	F - 5' CAACGCTCCATCTTGTCCTT 3'	55°C
	R - 3' TGATCGTCTTTCCCGTAAGC 5'	

#### 4.4.2.3. Síntese de cDNA e RT-PCR Semiquantitativa

A síntese do cDNA foi feita a partir de 1 µg de RNA total de folha tratado com *DNase I*, onde os RNAs poli-A<sup>+</sup> foram isolados utilizando oligo (dT)<sub>15</sub> presente no kit e os cDNAs sintetizados utilizando o *ImProm-II™ Reverse Transcription System* (Promega), seguindo as recomendações do fabricante.

A técnica realizada para o estudo da expressão gênica foi a RT-PCR semiquantitativa, utilizando oligonucleotídeos específicos para os genes NCED e LEA e o oligonucleotídeo para o gene constitutivo ubiquitina. Para as reações de RT-PCR foram seguidos os seguintes parâmetros: 1 µL de cDNA; 2,5 µL de cada oligonucleotídeo senso e antisense (2 µMol/L); 0,2 µL de Taq Polimerase (5 U/µL); 0,5 µL de dNTP (10 mMol/L); 2,0 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mMol/L) e 2,5 µL de tampão (10X), para um volume final de 25 µL. As condições das PCRs foram: pré-desnaturação a 96 °C por 1 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação à 96 °C por 1 min, anelamento por 1 min com temperatura de acordo com os oligonucleotídeos (tabela 1), extensão à 72 °C por 1 min e extensão final à 72 °C por 10 min. Em seguida as reações foram analisadas em gel de agarose à 1% e fotodocumentadas. Para estimar o padrão das bandas foi utilizado o marcador de 50 pb (Invitrogen).

#### **4.5. Análises estatísticas**

Os dados obtidos foram avaliados mediante análise de variância com teste 'F' até o nível de 5% de probabilidade de erro. Para se avaliar o efeito comparativo do estresse hídrico entre os genótipos, procedeu-se à análise por aglutinação de médias (Scott-Knott,  $p < 0,05$ ) e, para comparação de médias entre os tratamentos, utilizou-se o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os procedimentos estatísticos foram realizados com auxílio do software SISVAR versão 5.3 (FERREIRA, 2010).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Crescimento das plantas

#### 5.1.1. Altura de plantas (ALT) Diâmetro de Caule (DC) e Número de Folhas (NF), em avaliações com 1 e 7 dias de estresse hídrico (DEH) e recuperação.

Conforme análise de variância, para as variáveis de crescimento (Tabela 2), com 1 DEH houve diferenças significativas entre os genótipos, quando foram avaliados altura de planta (ALT) ( $p < 0,05$ ), diâmetro de caule (DC) ( $p < 0,01$ ) e número de folhas (NF) ( $p < 0,01$ ), porém, somente o DC foi afetado de maneira significativa ( $p < 0,01$ ) pelos manejos hídricos. Com 7 DEH, verificaram-se diferenças significativas entre os genótipos, nas variáveis DC ( $p < 0,01$ ) e NF ( $p < 0,01$ ) e a aplicação do estresse hídrico (EH) influenciou, significativamente, a ALT, o DC e o NF, todos em nível de  $p < 0,01$ . Após a retomada das irrigações, com a recuperação das plantas do EH, foi realizada a terceira avaliação de crescimento, constatando-se diferenças entre os genótipos nas variáveis ALT ( $p < 0,01$ ) e DC ( $p < 0,01$ ), sendo ambas afetadas de maneira significativa pelos tratamentos com estresse hídrico (CEH) e sem estresse hídrico (SEH) em 1%.

Apenas na recuperação, após o EH, foi verificada significância estatística na interação entre os fatores Genótipos x Tratamentos, para NF, que não havia ocorrido significativo efeito dos genótipos, e para DC (Tabela 2).

**Tabela 2.** Resumo da análise de variância para número de folhas (NF), altura de plantas (ALT) (cm) e diâmetro do caule (DC) (mm) em genótipos de algodoeiros, sob dois manejos hídricos (Tratamentos). Campina Grande-PB, 2013.

Avaliações	Fontes de Variação	GL	Quadrado médio		
			ALT	DC	NF
1ª avaliação, um dia após iniciado estresse hídrico	Genótipos	5	3,136438*	0,070347**	0,394796**
	Tratamento	1	0,88011 <sup>ns</sup>	0,060295**	0,010007 <sup>ns</sup>
	Interação G x T	5	1,290105 <sup>ns</sup>	0,001378 <sup>ns</sup>	0,009405 <sup>ns</sup>
	Bloco	2	2,352401 <sup>ns</sup>	0,007981 <sup>ns</sup>	0,018278 <sup>ns</sup>
	Resíduo	28	0,856420	0,005751	0,011842
	Total	35	44,366748	0,561404	2,342116
	CV (%)		5,06	2,74	2,57
Avaliações	Fontes de Variação	GL	Quadrado médio		
			ALT	DC	NF
2ª avaliação, sete dias após iniciado estresse hídrico	Genótipos	5	2,392999 <sup>ns</sup>	0,076284**	0,211254**
	Tratamento	1	230,590805**	6,934532**	11,864121**
	Interação G x T	5	0,987161 <sup>ns</sup>	0,017325 <sup>ns</sup>	0,058433 <sup>ns</sup>
	Bloco	2	4,385971 <sup>ns</sup>	0,027937 <sup>ns</sup>	0,207146*
	Resíduo	28	1,810861	0,018121	0,058613
	Total	35	296,102480	7,857121	14,916345
	CV (%)		6,26	4,49	4,66
Avaliações	Fontes de Variação	GL	Quadrado médio		
			ALT	DC	NF
3ª avaliação, recuperação após estresse hídrico	Genótipos	5	16,033833**	0,166171**	0,388064 <sup>ns</sup>
	Tratamento	1	927,2025**	8,313611**	76,173911**
	Interação G x T	5	10,197833 <sup>ns</sup>	0,078224*	0,575644*
	Bloco	2	10,6275*	0,042178 <sup>ns</sup>	0,073428 <sup>ns</sup>
	Resíduo	28	3,824167	0,028844	0,161675
	Total	35	1163,747500	10,254522	84,696157
	CV (%)		7,26	4,91	7,77

<sup>ns</sup> - não significativo; \*\*, \* - significativo a 1% e 5% de probabilidade de erro, pelo teste F

As avaliações foram realizadas com 1 e 7 DEH e na recuperação, (Tabelas 3, 4 e 5, respectivamente), contendo valores de médias para as variáveis: ALT, DC e NF, extraídas da análise de desdobramento dos tratamentos (com e sem estresse hídrico) dentro de cada genótipo e de genótipo dentro de cada tratamento hídrico.

Com 1 DEH (Tabela 3) pode-se observar que não houve diferença para nenhuma das variáveis em estudo. Analisando o tratamento SEH os genótipos G5 (CNPA 2009-6) e G6 (BRS TOPÁZIO) obtiveram maior ALT com diferenças significativas, no DC os melhores resultados

foram para G1 (CNPA 2009-11), G2(CNPA 2009-13) e G5 (CNPA 2009-6), no NF apenas o G5 difere estatisticamente dos demais. Quando se analisa CEH, percebe-se que todos os genótipos foram iguais em ALT, já com relação ao DC, os genótipos G1 (CNPA 2009-11), G2(CNPA 2009-13)e G5 (CNPA 2009-6) permanecem com diferenças significativas, como observado no tratamento SEH, no NF apenas o G5 se difere dos demais genótipos.

**Tabela 3.** Altura de Plantas (ALT), Diâmetro de Caule (DC) e Número de Folhas (NF) com um dia de estresse hídrico e sem estresse hídrico para genótipos.

Genótipo	Altura de planta		Diâmetro de caule		Número de folhas	
	(ALT)		(DC)		(NF)	
	SEH	CEH	SEH	CEH	SEH	CEH
<b>G1 CNPA 2009-11</b>	17,37 <b>Ab</b>	18,87 <b>Aa</b>	2,86 <b>Aa</b>	2,81 <b>Aa</b>	4,16 <b>Ab</b>	4,11 <b>Ab</b>
<b>G2 CNPA 2009-13</b>	16,62 <b>Ab</b>	17,00 <b>Aa</b>	2,88 <b>Aa</b>	2,78 <b>Aa</b>	4,18 <b>Ab</b>	4,22 <b>Ab</b>
<b>G3 CNPA 2009-50</b>	16,91 <b>Ab</b>	16,69 <b>Aa</b>	2,73 <b>Ab</b>	2,69 <b>Ab</b>	4,11 <b>Ab</b>	4,29 <b>Ab</b>
<b>G4 BRS SAFIRA</b>	17,61 <b>Ab</b>	17,14 <b>Aa</b>	2,67 <b>Ab</b>	2,57 <b>Ab</b>	4,04 <b>Ab</b>	4,09 <b>Ab</b>
<b>G5 CNPA 2009-6</b>	18,21 <b>Aa</b>	17,53 <b>Aa</b>	2,97 <b>Aa</b>	2,86 <b>Aa</b>	4,76 <b>Aa</b>	4,73 <b>Aa</b>
<b>G6 BRS TOPÁZIO</b>	19,13 <b>Aa</b>	18,02 <b>Aa</b>	2,76 <b>Ab</b>	2,67 <b>Ab</b>	4,07 <b>Ab</b>	4,07 <b>Ab</b>

SEH = Sem Estresse Hídrico, CEH = Com Estresse Hídrico.

Letra maiúscula comparando médias nas linhas para tratamentos hídricos (teste 'F',  $p < 0,05$ ), e minúscula nas colunas para genótipos dentro do mesmo tratamento hídrico (Scott-Knott,  $p < 0,05$ ).

Comparando os genótipos entre si, o G5 (CNPA 2009-6) foi o único genótipo a obter maiores médias para as três variáveis ALT, DC e NF, dentro dos dois tratamentos. No entanto, um dia de restrição não foi suficiente para perceber diferenças significativas em nenhuma das três variáveis entre os dois tratamentos hídricos.

Um dia de estresse hídrico não foi tempo suficiente para reduzir nenhuma das variáveis, possivelmente porque o solo ainda permanecia úmido, pois o estresse hídrico está diretamente ligado com a quantidade de água existente no solo (FARIAS, 2005).



Na tabela 4, com 7 DEH, é visto que em todos os genótipos tiveram uma redução significativa dos valores de ALT, DC e NF. Analisando as plantas dentro do tratamento SEH apenas os G3 (CNPA 2009-50), G4 (BRS SAFIRA) e G6 (BRS TOPÁZIO) tiveram médias significativamente inferiores em DC. Quando analisamos CEH, as variáveis ALT e DC foram semelhantes encontrando diferença significativa apenas para o NF no genótipo G3 (CNPA 2009-50) e G5 (CNPA 2009-6).

Ao contrário da primeira avaliação com 1 DEH, aos 7 DEH já foi possível observar danos para ALT, NF e DC, evidenciando a necessidade hídrica para o desenvolvimento.

A redução de altura, em função do estresse hídrico, ocorre porque a deficiência hídrica diminui o volume celular, sendo o primeiro e mais sensível efeito a diminuição da turgescência e associado a esse evento, ocorre a diminuição de extensão da planta Larcher (2006).

A redução no diâmetro caulinar observada pode ser entendida ao se embasar nas funções básicas do caule que são, sustentação da planta e transporte de nutrientes (GONÇALVES e LORENZI, 2007). Uma explicação simplificada dessa contenção de crescimento pode ser feita a partir da relação caule/parte aérea. Como o estresse hídrico causa a diminuição da área foliar e do peso da copa, o diâmetro caulinar da planta é contido ou diminuído, pois o peso da parte aérea esta sendo diminuído, ou seja, a planta está se adaptando às novas condições, além do mais, nesse momento a outra função básica do caule, transporte de nutrientes, está em menor atividade, não havendo necessidade de expansão, também devido ao menor fluxo de assimilados e de íons absorvidos (KERBAUY, 2004).

Sousa (2008), em experimento com algodão, observou danos de DC após ter aplicado uma lamina de 25% da capacidade de campo durante 10 dias, também observou danos significativos em NF e ALT após os 17 dias nessas condições.

A redução do número de folhas é uma das linhas de defesa da planta ao estresse hídrico. Lim et al. (2007) explicam que o processo de senescência foliar é um processo muito bem coordenado na folha inteira, iniciando geralmente nas margens seguindo em direção à base, com uma série de eventos, onde macromoléculas são quebradas e assim como aminoácidos açúcares e sais minerais são resgatados das folhas senescentes e reutilizados em outras partes da planta (SRIVASTAVA, 2002). Dangl et al., (2000) explicam que as células são responsáveis por mudanças na estrutura das folhas senescentes, ocorrendo mudanças bioquímicas, como degradação de clorofila e proteína, seguida da diminuição da taxa fotossintética e aumento do índice de respiração, finalizando com a morte da célula e queda foliar.

**Tabela 4.** Altura de Plantas (ALT), Diâmetro de Caule (DC) e Número de Folhas (NF) com sete de estresse hídrico e sem estresse hídrico para genótipos.

Genótipo	Altura de planta		Diâmetro de caule		Número de folhas	
	(ALT)		(DC)		(NF)	
	SEH	CEH	SEH	CEH	SEH	CEH
<b>G1 CNPA 2009-11</b>	24,43 <b>Aa</b>	19,94 <b>Ba</b>	3,58 <b>Aa</b>	2,59 <b>Ba</b>	5,70 <b>Aa</b>	4,41 <b>Bb</b>
<b>G2 CNPA 2009-13</b>	23,89 <b>Aa</b>	18,13 <b>Ba</b>	3,56 <b>Aa</b>	2,73 <b>Ba</b>	6,00 <b>Aa</b>	4,56 <b>Bb</b>
<b>G3 CNPA 2009-50</b>	23,04 <b>Aa</b>	17,96 <b>Ba</b>	3,42 <b>Ab</b>	2,51 <b>Ba</b>	5,78 <b>Aa</b>	4,85 <b>Ba</b>
<b>G4 BRS SAFIRA</b>	23,96 <b>Aa</b>	19,37 <b>Ba</b>	3,31 <b>Ab</b>	2,40 <b>Ba</b>	5,74 <b>Aa</b>	4,59 <b>Bb</b>
<b>G5 CNPA 2009-6</b>	25,07 <b>Aa</b>	18,80 <b>Ba</b>	3,52 <b>Aa</b>	2,58 <b>Ba</b>	5,93 <b>Aa</b>	4,96 <b>Ba</b>
<b>G6 BRS TOPÁZIO</b>	23,85 <b>Aa</b>	19,67 <b>Ba</b>	3,24 <b>Ab</b>	2,56 <b>Ba</b>	5,48 <b>Aa</b>	4,37 <b>Bb</b>

SEH = Sem Estresse Hídrico, CEH = Com Estresse Hídrico.

Letra maiúscula comparando médias nas linhas para tratamentos hídricos (teste 'F',  $p < 0,05$ ), e minúscula nas colunas para genótipos dentro do mesmo tratamento hídrico (Scott-Knott,  $p < 0,05$ ).

Na recuperação (Tabela 5), assim como na avaliação com 7 DEH, houve redução significativa da AL, DC e do NF para todos os genótipos. Pode-se observar também que SEH os genótipos foram iguais para ALT e diferiu no DC com maiores valores para G1 (CNPA 2009-11), G2 (CNPA 2009-13) e G5 (CNPA 2009-6) e no NF, apenas G1 (CNPA 2009-11) e G6 (BRS TOPÁZIO) diferiram com valores inferiores aos demais. Analisando CEH, apenas no DC os genótipos foram semelhantes, diferindo em maior ALT nos genótipos G3 (CNPA 2009-50) e G4 (BRS SAFIRA) e com NF superior no G5 (CNPA 2009-6).

A avaliação de recuperação foi suficiente para que os genótipos dessem indícios da capacidade de reestabelecimento para as variáveis em estudo, no entanto os dias de reidratação foram insuficientes para que essas plantas diminuíssem diferenças significativas em comparação às plantas que não foram submetidas ao estresse hídrico.

**Tabela 5.** Altura de Plantas (ALT), Diâmetro de Caule (DC) e Número de Folhas (NF) no período de recuperação estresse hídrico e sem estresse hídrico para genótipos.

Genótipo	Altura de planta (ALT)		Diâmetro de caule (DC)		Número de folhas (NF)	
	SEH	CEH	SEH	CEH	SEH	CEH
	<b>G1 CNPA 2009-11</b>	33,17 <b>Aa</b>	24,10 <b>Ba</b>	4,11 <b>Aa</b>	2,91 <b>Ba</b>	6,40 <b>Ab</b>
<b>G2 CNPA 2009-13</b>	32,50 <b>Aa</b>	19,33 <b>Bb</b>	4,24 <b>Aa</b>	3,00 <b>Ba</b>	7,07 <b>Aa</b>	3,42 <b>Bb</b>
<b>G3 CNPA 2009-50</b>	30,90 <b>Aa</b>	24,20 <b>Ba</b>	3,85 <b>Ab</b>	3,03 <b>Ba</b>	6,87 <b>Aa</b>	3,47 <b>Bb</b>
<b>G4 BRS SAFIRA</b>	34,20 <b>Aa</b>	23,60 <b>Ba</b>	3,83 <b>Ab</b>	2,80 <b>Ba</b>	6,93 <b>Aa</b>	3,69 <b>Bb</b>
<b>G5 CNPA 2009-6</b>	29,40 <b>Aa</b>	21,07 <b>Bb</b>	4,00 <b>Aa</b>	3,27 <b>Ba</b>	6,58 <b>Aa</b>	4,47 <b>Ba</b>
<b>G6 BRS TOPÁZIO</b>	31,93 <b>Aa</b>	18,90 <b>Bb</b>	3,59 <b>Ab</b>	2,85 <b>Ba</b>	5,93 <b>Ab</b>	3,62 <b>Bb</b>

SEH = Sem Estresse Hídrico, CEH = Com Estresse Hídrico.

Letra maiúscula comparando médias nas linhas para tratamentos hídricos (teste 'F',  $p < 0,05$ ), e minúscula nas colunas para genótipos dentro do mesmo tratamento hídrico (Scott-Knott,  $p < 0,05$ ).

## **5.2. Área foliar e fitomassas para tratamentos com 5 dias de estresse hídrico (DEH), final do estresse e recuperação.**

Na 1ª avaliação, com 5 DEH (Tabela 6), os genótipos de algodoeiro diferiram estatisticamente entre si, em relação à AF ( $p < 0,01$ ), bem como, em função dos tratamentos de manejo hídrico ( $p < 0,01$ ). Porém, nesta avaliação, não houve significância na interação entre genótipos e manejos hídricos, indicando independência dos fatores. Tanto na 2ª (ao final do estresse hídrico), como na 3ª avaliação (na recuperação após o estresse), a AF foi afetada de maneira significativa entre os genótipos e pelas formas de manejo hídrico, todas em nível de  $p < 0,01$ . Na 2ª avaliação, foi constatado efeito significativo da interação G x T, em nível de  $p < 0,05$ , e, na 3ª avaliação houve efeito da interação entre os fatores, em nível de  $p < 0,01$ , para a variável em questão.

**Tabela 6.** Resumos das análises de variância para variáveis área foliar (AF), fitomassa da folha (FSF), fitomassa do caule (DC), fitomassa da raiz (FSR) e relação raiz/parte aérea (R/PA), sob dois manejos hídricos (Tratamentos), Campina Grande, 2013.

Avaliações	Fontes de Variação	GL	Quadrado médio				
			AF	FSF	FSC	FSR	R/PA
1ª avaliação, cinco dias após iniciado estresse hídrico	Genótipos	5	1416,63**	0,0127**	0,0017*	0,0015**	0,0038**
	Tratamento	1	13519,85**	0,0549**	0,0001 <sup>ns</sup>	0,0012*	0,0016 <sup>ns</sup>
	Interação G x T	5	212,01 <sup>ns</sup>	0,0012 <sup>ns</sup>	0,0011 <sup>ns</sup>	0,0002 <sup>ns</sup>	0,0004 <sup>ns</sup>
	Bloco	2	1245,87*	0,0012 <sup>ns</sup>	0,0040**	0,0007*	0,0023 <sup>ns</sup>
	Resíduo	22	234,38	0,0017	0,0005	0,0001	0,0009
	Total	35	29311,42	0,1670	0,0349	0,0162	0,0478
CV (%)			10,87	10,43	12,80	9,66	12,33
Avaliações	Fontes de Variação	GL	Quadrado médio				
			AF	FSF	FSC	FSR	R/PA
2ª avaliação, ao final do estresse hídrico	Genótipos	5	2985,94**	0,0380 <sup>ns</sup>	0,0051 <sup>ns</sup>	0,0020**	0,0048 <sup>ns</sup>
	Tratamento	1	257214,59**	2,0428**	1,1463**	0,1176**	0,0600**
	Interação G x T	5	597,33*	0,0069 <sup>ns</sup>	0,0142**	0,0009 <sup>ns</sup>	0,0025 <sup>ns</sup>
	Bloco	2	229,93 <sup>ns</sup>	0,0121 <sup>ns</sup>	0,0087 <sup>ns</sup>	0,0063**	0,0086 <sup>ns</sup>
	Resíduo	22	228,62	0,0218	0,0024	0,0004	0,0025
	Total	35	280620,62	2,7725	1,3140	0,1562	0,1714
CV (%)			9,57	25,16	12,02	10,05	20,92
Avaliações	Fontes de Variação	GL	Quadrado médio				
			AF	FSF	FSC	FSR	R/PA
3ª avaliação, recuperação após estresse hídrico	Genótipos	5	11385,43**	0,0785 <sup>ns</sup>	0,0195 <sup>ns</sup>	0,0078**	0,0029*
	Tratamento	1	194259,46**	2,9680**	5,0111**	0,5243**	0,0164**
	Interação G x T	5	319245,10**	0,1358*	0,0266*	0,0107**	0,0011 <sup>ns</sup>
	Bloco	2	2098,48 <sup>ns</sup>	0,0138 <sup>ns</sup>	0,0228 <sup>ns</sup>	0,0061*	0,0052*
	Resíduo	22	672,85	0,0369	0,0091	0,0015	0,0010
	Total	35	9811,73	4,8800	5,4892	0,6648	0,0708
CV (%)			12,47	24,40	15,36	13,00	14,19

<sup>ns</sup> - não significativo; \*\*, \* - significativo a 1% e 5% de probabilidade de erro, pelo teste F

Ainda na Tabela 6, constata-se que, na 1ª avaliação, ocorreram diferenças estatísticas nas variáveis AF ( $p < 0,01$ ), FSF ( $p < 0,01$ ), FSC ( $p < 0,05$ ), FSR ( $p < 0,01$ ) e R/PA ( $p < 0,01$ ) entre os genótipos estudados. Por outro lado, os tratamentos com e sem estresse hídrico afetaram significativamente apenas as variáveis AF ( $p < 0,01$ ), FSF ( $p < 0,01$ ) e FSR ( $p < 0,05$ ). Na 2ª avaliação, entre os genótipos, observaram-se diferenças significativas apenas na AF ( $p < 0,01$ ) e na FSR ( $p < 0,01$ ), já as formas de manejo hídrico influenciaram de maneira significativa todas as variáveis relacionadas à fitomassa do algodoeiro ( $p < 0,01$ ). Na 3ª avaliação, houve diferenças significativas entre os genótipos, na AF ( $p < 0,01$ ), FSR ( $p < 0,01$ ) e na R/PA ( $p < 0,05$ ), contudo, os tratamentos com e sem estresse hídrico também afetaram de forma significativa todas as variáveis de fitomassa em estudo, em nível de  $p < 0,01$ .

Houve efeito significativo na interação entre genótipos x manejos hídricos, apenas na 2ª e na 3ª avaliação (Tabela 3). Na 2ª a AF ( $p < 0,05$ ) e a FSC foram afetada de maneira significativa ( $p < 0,01$ ) pela interação entre os fatores. Na 3ª avaliação, ocorreram efeitos significativos na interação para as seguintes variáveis: AF ( $p < 0,01$ ), FSF ( $p < 0,05$ ), FSC ( $p < 0,05$ ) e FSR ( $p < 0,01$ ), apenas a R/PA não foi afetada significativamente.

Cinco dias após EH (Tabela 7), pode-se verificar que apenas no G3 (CNPA 2009-50) não houve redução significativa de AF. Para os tratamentos hídricos, os genótipos G1 (CNPA 2009-11) e G5 (CNPA 2009-6) obtiveram maiores índices de área foliar no tratamento SEH. Quando observa-se o tratamento CEH, os valores de AF são semelhantes para todos os genótipos, evidenciando a limitação do aumento de AF dos seis genótipos sob estresse hídrico.

Aos 5 DEH, cinco dos seis genótipos tem sua AF reduzida, isso pode ter ocorrido pelo fato de a redução de AF ser a mais evidente linha de defesa da planta contra a falta de água (TAIZ E ZEIGER 2009). Santos e Carlesso (1998) justificam essa reação por afirmarem que, de modo indireto, redução de AF ajuda na conservação da água no solo.

A FSF foi reduzida significativamente no G1 (CNPA 2009-11) e G4 (BRS SAFIRA) pois, como consequência da redução de expansão de área foliar, a fitomassa foliar também é afetada. Dentro do tratamento SEH os genótipos G1 (CNPA 2009-11) e G5 (CNPA 2009-6) possuem melhores resultados de FSF. Entre as plantas CEH, apenas o genótipo 5 (CNPA 2009-6) se destaca significativamente.

Quanto a FSC, aos 5 DEH o G4 (BRS SAFIRA) é o único a sofrer redução significativa pelo estresse hídrico. Entre as plantas SEH nenhuma se diferencia. Já para o tratamento CEH o G4 (BRS SAFIRA) é o único a obter a menor média de FSC.

Os genótipo 4 (BRS SAFIRA) e 5 (CNPA 2009-6) são os únicos a terem suas FSR significativamente reduzidas pelo estresse hídrico. Salamoni (2008) relata que como consequência da redução da expansão celular, o alongamento, aumento das raízes também é diminuído.

Mesmo sendo o algodoeiro uma planta tolerante à falta de água e, conseqüentemente, com menor exigência hídrica (MENESES, 2006) os resultados evidenciaram efeitos negativos causados pelo estresse hídrico, sobre as variáveis analisadas.

**Tabela 7.** Área Foliar (AF), Fitomassa Folha (FSF), Fitomassa Caule (FSC), Fitomassa Raiz (FSR) e Raiz/Parte Aérea (R/PA), com cinco dias de estresse hídrico para genótipos.

Genótipo	Área Foliar		Fitomassa Folha		Fitomassa Caule		Fitomassa Raiz		Raiz/Parte Aérea	
	(AF)		(FSF)		(FSC)		(FSR)		(R/PA)	
	SEH	CEH	SEH	CEH	SEH	CEH	SEH	CEH	SEH	CEH
<b>G1 CNPA 2009-11</b>	182,81 <b>Aa</b>	127,99 <b>Ba</b>	0,51 <b>Aa</b>	0,38 <b>Bb</b>	0,20 <b>Aa</b>	0,21 <b>Aa</b>	0,15 <b>Ab</b>	0,14 <b>Aa</b>	21,00 <b>Aa</b>	24,00 <b>Aa</b>
<b>G2 CNPA 2009-13</b>	156,72 <b>Ab</b>	124,24 <b>Ba</b>	0,42 <b>Ab</b>	0,36 <b>Ab</b>	0,16 <b>Aa</b>	0,18 <b>Aa</b>	0,14 <b>Ab</b>	0,14 <b>Aa</b>	23,67 <b>Aa</b>	26,33 <b>Aa</b>
<b>G3 CNPA 2009-50</b>	152,06 <b>Ab</b>	126,72 <b>Aa</b>	0,43 <b>Ab</b>	0,37 <b>Ab</b>	0,18 <b>Aa</b>	0,18 <b>Aa</b>	0,15 <b>Ab</b>	0,14 <b>Aa</b>	23,67 <b>Aa</b>	25,33 <b>Aa</b>
<b>G4 BRS SAFIRA</b>	143,61 <b>Ab</b>	109,07 <b>Ba</b>	0,41 <b>Ab</b>	0,31 <b>Bb</b>	0,19 <b>Aa</b>	0,13 <b>Bb</b>	0,13 <b>Ab</b>	0,10 <b>Bb</b>	22,33 <b>Aa</b>	22,00 <b>Aa</b>
<b>G5 CNPA 2009-6</b>	187,42 <b>Aa</b>	135,24 <b>Ba</b>	0,51 <b>Aa</b>	0,44 <b>Aa</b>	0,20 <b>Aa</b>	0,19 <b>Aa</b>	0,17 <b>Aa</b>	0,15 <b>Ba</b>	24,67 <b>Aa</b>	23,33 <b>Aa</b>
<b>G6 BRS TOPÁZIO</b>	139,10 <b>Ab</b>	105,91 <b>Ba</b>	0,39 <b>Ab</b>	0,33 <b>Ab</b>	0,18 <b>Aa</b>	0,19 <b>Aa</b>	0,16 <b>Aa</b>	0,16 <b>Aa</b>	28,00 <b>Aa</b>	30,33 <b>Aa</b>

SEH = Sem Estresse Hídrico, CEH = Com Estresse Hídrico.

Letra maúiscula comparando médias nas linhas para tratamentos hídricos (teste 'F',  $p < 0,05$ ), e minúiscula nas colunas para genótipos dentro do mesmo tratamento hídrico (Scott-Knott,  $p < 0,05$ ).

Ao final do estresse hídrico (Tabela 8), os seis genótipos sofreram reduções significativas de AF, FSF, FSC e FSR e apenas os genótipos G1 (CNPA 2009-11) e o G6 (BRS TOPÁZIO) das plantas SEH tiveram R/PA diminuídas.

Dentro do tratamento SEH, a AF dos genótipos G1 (CNPA 2009-11) e G2 (CNPA 2009-13) obtiveram os melhores valores. Para FSF, os seis genótipos foram estatisticamente similares. Para FSC os genótipos G1 (CNPA 2009-11), G2 (CNPA 2009-13) e G3 (CNPA 2009-50) se sobressaem com maiores valores. Para FSR os genótipos G2 (CNPA 2009-13) e G3 (CNPA 2009-50) se diferem estatisticamente, já R/PA, são estatisticamente similares.

Nas variáveis analisadas apenas para AF que os genótipos G2 (CNPA 2009-13) e G5 (CNPA 2009-6) se destacam com maiores valores significativos, nas demais variáveis percebe-se o comportamento significativamente semelhante entre os genótipos, isso ocorre porque, em ambientes estressantes, as plantas não produzem o máximo que podem, ao contrário, elas encontram um equilíbrio entre rendimento e sobrevivência.

Dessa maneira, sob condições hídricas limitantes, para aumentar seu tempo de sobrevivência, a planta limita seu crescimento, o que acaba economizando a água do solo.

Ludlow e Muchow (1990) explicam que o aumento da quantidade de raiz durante a seca ajuda a planta a obter água a níveis mais profundos no perfil do solo, assim como ajuda a evitar déficits hídricos nas camadas mais superficiais do solo. Isso parece ser uma característica do algodoeiro, quando numa situação adversa de deficiência hídrica, priorizar maior alocação de fotoassimilados para as raízes, favorecendo a busca por umidade e menor perda de água por transpiração, caso investisse no aumento da parte aérea.

Rosolem (2001) também sustenta essa habilidade do algodoeiro, ao relatar que uma planta de algodoeiro, ao ser submetido à seca, a relação entre a raiz e a parte aérea aumenta, havendo mais crescimento radicular do que da parte aérea. Sousa (2008) também constatou tal fato em três variedades de algodoeiro submetidas a baixo nível de disponibilidade hídrica. É importante ressaltar que essa adaptabilidade de tolerância ao estresse é característica de algumas espécies vegetais e não todas, pois Scalon (2011) verificou em *Guazuma ulmifolia Lam* que a massa seca de raiz diminuiu com a menor disponibilidade de água.

**Tabela 8.** Área Foliar (AF), Fitomassa Folha (FSF), Fitomassa Caule (FSC), Fitomassa Raiz (FSR) e Raiz/Parte Aérea (R/PA), no final do estresse hídrico para genótipos.

Genótipo	Área Foliar		Fitomassa Folha		Fitomassa Caule		Fitomassa Raiz		Raiz/Parte Aérea	
	(AF)		(FSF)		(FSC)		(FSR)		(R/PA)	
	SEH	CEH	SEH	CEH	SEH	CEH	SEH	CEH	SEH	CEH
<b>G1 CNPA 2009-11</b>	270,70 <b>Aa</b>	73,53 <b>Bb</b>	0,93 <b>Aa</b>	0,37 <b>Ba</b>	0,63 <b>Aa</b>	0,19 <b>Ba</b>	0,27 <b>Ab</b>	0,17 <b>Ba</b>	17,67 <b>Ba</b>	33,00 <b>Aa</b>
<b>G2 CNPA 2009-13</b>	274,30 <b>Aa</b>	100,20 <b>Ba</b>	0,78 <b>Aa</b>	0,33 <b>Ba</b>	0,68 <b>Aa</b>	0,21 <b>Ba</b>	0,31 <b>Aa</b>	0,16 <b>Ba</b>	24,67 <b>Aa</b>	29,33 <b>Aa</b>
<b>G3 CNPA 2009-50</b>	241,75 <b>Ab</b>	62,79 <b>Bb</b>	0,98 <b>Aa</b>	0,42 <b>Ba</b>	0,63 <b>Aa</b>	0,24 <b>Ba</b>	0,30 <b>Aa</b>	0,17 <b>Ba</b>	19,00 <b>Aa</b>	26,00 <b>Aa</b>
<b>G4 BRS SAFIRA</b>	214,95 <b>Ac</b>	58,50 <b>Bb</b>	0,74 <b>Aa</b>	0,30 <b>Ba</b>	0,55 <b>Ab</b>	0,22 <b>Ba</b>	0,27 <b>Ab</b>	0,14 <b>Ba</b>	20,33 <b>Aa</b>	26,67 <b>Aa</b>
<b>G5 CNPA 2009-6</b>	254,60 <b>Ab</b>	85,71 <b>Ba</b>	0,81 <b>Aa</b>	0,39 <b>Ba</b>	0,48 <b>Ab</b>	0,27 <b>Ba</b>	0,23 <b>Ac</b>	0,15 <b>Ba</b>	17,67 <b>Aa</b>	22,67 <b>Aa</b>
<b>G6 BRS TOPÁZIO</b>	199,09 <b>Ac</b>	60,34 <b>Bb</b>	0,70 <b>Aa</b>	0,28 <b>Ba</b>	0,54 <b>Ab</b>	0,24 <b>Ba</b>	0,27 <b>Ab</b>	0,17 <b>Ba</b>	22,33 <b>Ba</b>	33,00 <b>Aa</b>

SEH = Sem Estresse Hídrico, CEH = Com Estresse Hídrico.

Letra maiúscula comparando médias nas linhas para tratamentos hídricos (teste 'F',  $p < 0,05$ ), e minúscula nas colunas para genótipos dentro do mesmo tratamento hídrico (Scott-Knott,  $p < 0,05$ ).



Na recuperação (tabela 9), as diferenças entre plantas dos dois tratamentos hídricos ainda eram significativas para todos os genótipos em AF, FSC e FSR, no entanto no G5 (CNPA 2009-6) a FSF dos dois tratamentos hídrico era estatisticamente semelhante.

No tratamento SEH, o G1 (CNPA 2009-11), G2 (CNPA 2009-13) e o G3(CNPA 2009-50), possuem maiores AF, FSF, FSC, porém o G2 (CNPA 2009-13) e G3(CNPA 2009-50), além dessas variáveis, se destacam em FSR, já o G5 (CNPA 2009-6) se destaca apenas para AF.

Ao comparar as plantas dentro do tratamento CEH, nota-se melhor desenvolvimento de parte aérea no G5 (CNPA 2009-6) com maior AF e FSF. Enquanto que no genótipo G2 (CNPA 2009-13) diferenciou-se melhores resultados em FSR e FSC, o G3 (CNPA 2009-13) com maior FSR e FSC e também com maior R/PA. O G6 com maior FSC e R/PA.

O fato de o G5 (CNPA 2009-6) ter se destacado tanto, ao ponto de igualar sua FSF ao da planta sem estresse, pode ter ocorrido devido a menor exposição ao EH (10 dias). Dessa forma, pode-se deduzir que, apesar desse genótipo ser o mais sensível ao estresse hídrico, é o de melhor resposta à reidratação. Dessa maneira, a redução de área foliar, além de uma evidente linha de defesa da planta contra o estresse hídrico, foi também a principal manifestação de recuperação, após o estresse hídrico.

Na recuperação é percebido que enquanto o G5 (CNPA 2009-6) aumenta a área foliar, o G2 (CNPA 2009-13) e o G3(CNPA 2009-50) aumentam a FSC e FSR. Possivelmente essas características fenotípicas contribuíram para o G5 (CNPA 2009-6) ter sido o primeiro a externar sinais de debilidade causados pelo estresse hídrico e o G2 (CNPA 2009-13) e G3 (CNPA 2009-50) os últimos.

A característica de maior desenvolvimento de raiz do G2 (CNPA 2009-13) e do G3 (CNPA 2009-50) também pode ser vista entre as plantas SEH nas tabelas 7 e 8. A prioridade de desenvolvimento radicular, além de habilitar a planta a explorar melhor a água a níveis mais profundos do solo, proporciona menor perda de água por transpiração, caso investisse na parte aérea.

**Tabela 9.** Área Foliar (AF), Fitomassa Folha (FSF), Fitomassa Caule (FSC), Fitomassa Raiz (FSR) e Raiz/Parte Aérea (R/PA), na recuperação para genótipos.

Genótipo	Área Foliar		Fitomassa Folha		Fitomassa Caule		Fitomassa Raiz		Raiz/Parte Aérea	
	(AF)		(FSF)		(FSC)		(FSR)		(R/PA)	
	SEH	CEH	SEH	CEH	SEH	CEH	SEH	CEH	SEH	CEH
<b>G1 CNPA 2009-11</b>	317,59 <b>Aa</b>	134,18 <b>Bb</b>	1,40 <b>Aa</b>	0,45 <b>Bb</b>	1,12 <b>Aa</b>	0,25 <b>Ba</b>	0,44 <b>Ab</b>	0,18 <b>Bb</b>	17,67 <b>Aa</b>	22,00 <b>Ab</b>
<b>G2 CNPA 2009-13</b>	322,11 <b>Aa</b>	62,75 <b>Bc</b>	1,23 <b>Aa</b>	0,43 <b>Bb</b>	1,10 <b>Aa</b>	0,22 <b>Ba</b>	0,50 <b>Aa</b>	0,25 <b>Ba</b>	21,67 <b>Aa</b>	23,67 <b>Ab</b>
<b>G3 CNPA 2009-50</b>	288,22 <b>Aa</b>	89,45 <b>Bc</b>	1,13 <b>Aa</b>	0,43 <b>Bb</b>	1,08 <b>Aa</b>	0,24 <b>Ba</b>	0,51 <b>Aa</b>	0,20 <b>Ba</b>	23,33 <b>Ba</b>	29,33 <b>Aa</b>
<b>G4 BRS SAFIRA</b>	257,18 <b>Ab</b>	136,85 <b>Bb</b>	0,90 <b>Ab</b>	0,46 <b>Bb</b>	0,96 <b>Ab</b>	0,24 <b>Ba</b>	0,35 <b>Ac</b>	0,15 <b>Bc</b>	19,33 <b>Ba</b>	26,00 <b>Aa</b>
<b>G5 CNPA 2009-6</b>	310,70 <b>Aa</b>	259,81 <b>Ba</b>	0,95 <b>Ab</b>	0,82 <b>Aa</b>	0,90 <b>Ab</b>	0,29 <b>Ba</b>	0,41 <b>Ab</b>	0,18 <b>Bb</b>	22,33 <b>Aa</b>	22,33 <b>Ab</b>
<b>G6 BRS TOPÁZIO</b>	192,68 <b>Ac</b>	123,93 <b>Bb</b>	0,85 <b>Ab</b>	0,42 <b>Bb</b>	0,82 <b>Ab</b>	0,25 <b>Ba</b>	0,35 <b>Ac</b>	0,15 <b>Bc</b>	21,33 <b>Ba</b>	28,00 <b>Aa</b>

SEH = Sem Estresse Hídrico, CEH = Com Estresse Hídrico.

Letra maiúscula comparando médias nas linhas para tratamentos hídricos (teste 'F',  $p < 0,05$ ), e minúscula nas colunas para genótipos dentro do mesmo tratamento hídrico (Scott-Knott,  $p < 0,05$ ).

### 5.3. Umidade do solo

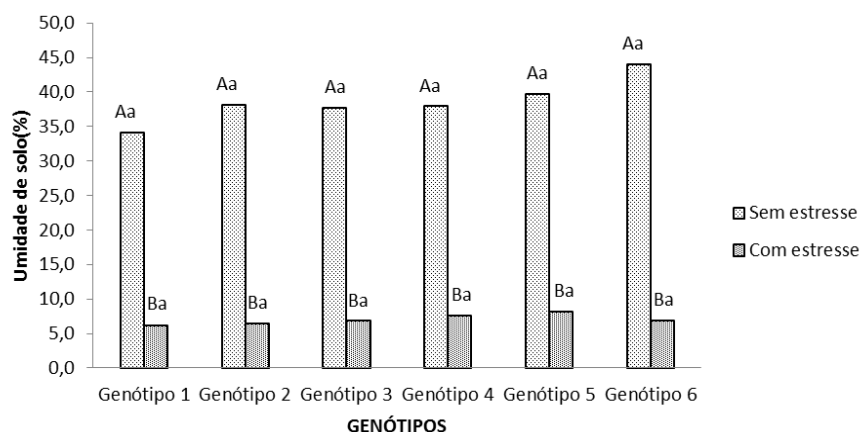
Na Tabela 10, estão contidos os dados de umidade do solo, analisados ao final do estresse hídrico. Observou-se que o manejo hídrico afetou significativamente a umidade do solo ( $p < 0,01$ ), no entanto não houve significância entre os genótipos e nem na interação entre os fatores.

**Tabela 10.** Resumo da análise de variância para umidade de solo ao final da exposição ao estresse hídrico de cada genótipo, Campina Grande, 2013.

Avaliação	Fontes de Variação		Quadrado médio	
		GL	US	
Final do estresse hídrico	Genótipos	5	19,345491 <sup>ns</sup>	
	Tratamento	1	8986,408011 <sup>**</sup>	
	Interação G x T	5	13,377824 <sup>ns</sup>	
	Bloco	2	9,581453 <sup>ns</sup>	
	Resíduo	22	10,081638	
	Total	35	9390,983522	
CV (%)			13,93	

<sup>ns</sup> - não significativo; \*\*, \* - significativo a 1% e 5% de probabilidade de erro, pelo teste F

De acordo com a Figura 2, observa-se que os percentuais de umidade de solo, ao final do estresse hídrico, foram semelhantes entre os seis genótipos, dessa maneira o G5 (CNPA 2009-6) pode ser considerado o mais sensível, por ter passado apenas 10 DEH, o G1 (CNPA 2009-11), G4 (BSF SAFIRA) e G6 (BRS TOPÁZIO) moderadamente sensíveis, por terem tolerado 13 DEH, e os genótipos G2 (CNPA 2009-13) e G3 (CNPA 2009-50) menos sensíveis, por terem tolerado 15 DEH.



**Figura 2.** Umidade de solo.

Genótipo 1 = CNPA 2009-11, Genótipo 2 = CNPA 2009-13, Genótipo 3 = CNPA 2009-50  
Genótipo 4 = BRS SAFIRA, Genótipo 5 = CNPA 2009-6, Genótipo 6 = BRS TOPÁZIO

Letra maiúscula para genótipo entre tratamentos hídricos (teste 'F',  $p < 0,05$ ), e minúscula para genótipos dentro do mesmo tratamento hídrico (Scott-Knott,  $p < 0,05$ ).

#### 5.4. Reidratação foliar

Observa-se, na Tabela 11, que na reidratação houve diferenças significativas em termos de absorção de água entre os dois tratamentos hídricos ( $p < 0,01$ ), nos genótipos ( $p < 0,01$ ), e na interação ( $p < 0,01$ ).

**Tabela 11.** Resumo da análise de variância para reidratação foliar ao final da exposição ao estresse hídrico de cada genótipo, Campina Grande, 2013.

Avaliação	Fontes de Variação		Quadrado médio
		GL	Absorção de água
Final do estresse hídrico	Genótipos	5	9536,1777 <sup>**</sup>
	Tratamento	1	199213,4444 <sup>**</sup>
	Interação G x T	5	9648,7221 <sup>**</sup>
	Bloco	2	1778,3063 <sup>ns</sup>
	Resíduo	22	595,5680
	Total	35	311797,0532
	CV (%)		30,63

<sup>ns</sup> - não significativo; <sup>\*\*</sup> - significativo a 1% de probabilidade de erro, pelo teste F

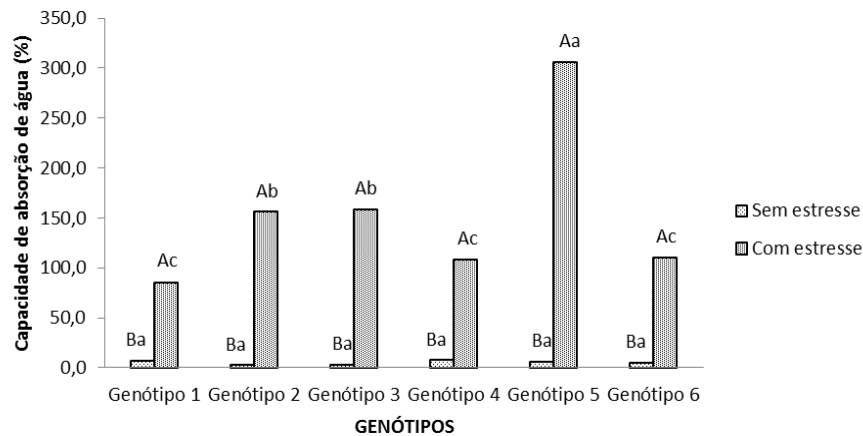
Ao se analisar a Figura 3, que representa a capacidade de reidratação foliar das plantas, é perceptível diferenças, não só entre os dois tratamentos hídricos, como entre os genótipos dentro do tratamento com estresse hídrico (CEH). Essas diferenças se dão em consequência da desidratação, causada pelo tempo de exposição ao estresse hídrico.

Com relação às plantas do tratamento sem estresse hídrico, percebe-se que não existe diferença significativa entre elas, percebe-se também uma baixa absorção de água, quando comparadas ao tratamento com estresse. Essa similaridade e a pouca absorção de água podem ser atribuídas ao fato de essas plantas estarem muito próximas do ótimo balanço hídrico entre o solo, com boa disponibilidade hídrica. Supostamente as células dessas plantas estavam perto do potencial de água total, visto que a absorção média de água dessas folhas, quando submersas por 8 horas em água, ter sido 5,28% do seu peso. Considerando que as partes verdes da maioria das plantas tem um teor de água entre 80 e 90% de água (GUIMARÃES, 2008).

Analisando-se a capacidade foliar de reidratação dentro do tratamento com estresse hídrico, observa-se que os genótipos diferenciam entre si. Os genótipos G1 (CNPA 2009-11), G4 (BRS SAFIRA) e o G5 (BRS TOPÁZIO) são os que possuem menor capacidade, os genótipos G2 (CNPA 2009-13) e G3 (CNPA 2009-50) possuem maior capacidade que os três citados e o G5 (CNPA 2009-6) é o que possui maior capacidade de reidratação foliar.

A menor exposição ao estresse hídrico do G5 (CNPA 2009-6), possivelmente, permitiu à planta manter a capacidade de resistência à tensão negativa do solo, devido às condições de baixa umidade (Figura 3).

Taiz e Zeiger (2009) afirmam que, em uma situação de seca, o conteúdo de água celular é diminuído, havendo relaxamento de suas paredes, limitando as dimensões das folhas, conseqüentemente, murchando. Ao serem submersas, a água penetra espontaneamente nos espaços celulares até que o potencial total de água seja o máximo abrigado pela célula, mantendo o potencial de turgor na célula vegetal, expandindo, dessa forma, a área foliar.



**Figura 3.** Teste de média para capacidade foliar de absorção de água de cada genótipo, ao final da exposição do estresse hídrico.

Genótipo 1 = CNPA 2009-11, Genótipo 2 = CNPA 2009-13, Genótipo 3 = CNPA 2009-50  
Genótipo 4 = BRS SAFIRA, Genótipo 5 = CNPA 2009-6, Genótipo 6 = BRS TOPÁZIO

Letra maiúscula para genótipo entre tratamentos hídricos (teste 'F',  $p < 0,05$ ), e minúscula para genótipos dentro do mesmo tratamento hídrico (Scott-Knott,  $p < 0,05$ ).

### 5.5 Trocas gasosas

Na 1ª avaliação, com 1 DEH (Tabela 12), houve diferenças significativas entre os genótipos apenas na transpiração ( $p < 0,05$ ). Os tratamentos de manejo hídrico influenciaram de forma significativa as variáveis  $C_i$  ( $p < 0,01$ ),  $A$  ( $p < 0,05$ ),  $A/C_i$  ( $p < 0,05$ ) e  $T$  ( $p < 0,01$ ). Na 2ª avaliação com 3 DEH, não houve diferença significativa entre os genótipos, mas o manejo hídrico afetou, significativamente, a  $E$  ( $p < 0,01$ ), a  $g_s$  ( $p < 0,01$ ) e a  $T$  ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 12.** Resumo da análise de variância para carbono interno ( $C_i$ ) ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ), transpiração ( $E$ ) ( $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ) ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), fotossíntese ( $A$ ) ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), eficiência instantânea do uso da água ( $EUA - A/E$ ), eficiência instantânea da carboxilação ( $E/C_i$ ).

Fase/etapa	Fontes Variáveis		Quadrado médio						
			$C_i$	$E$	$g_s$	$A$	$A/E$	$A/C_i$	$T$
1 dia	Genótipos	5	234,240 <sup>ns</sup>	0,0646*	0,001 <sup>ns</sup>	4,304 <sup>ns</sup>	0,306 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>ns</sup>	0,045 <sup>ns</sup>
após	Tratamento	1	1196,006**	0,001 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>ns</sup>	8,536*	1,026 <sup>ns</sup>	0,000*	0,855**
iniciado o	Interação G x T	5	117,140 <sup>ns</sup>	0,015 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>ns</sup>	1,721 <sup>ns</sup>	0,265 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>ns</sup>	0,043 <sup>ns</sup>
estresse	Bloco	2	5800,465**	0,009 <sup>ns</sup>	0,010**	15,251*	2,770*	0,000**	7,092**
hídrico	Resíduo	22	149,578	0,020	0,000	1,684	0,297	0,000	0,029
	Total	35	17844,576	0,868	0,043	106,229	15,972	0,003	16,144
	CV(%)		4,61	5,68	10,54	12,68	13,33	16,97	0,57
Fase/etapa	Fontes Variáveis		Quadrado médio						
			$C_i$	$E$	$g_s$	$A$	$A/E$	$A/C_i$	$T$
3 dias	Genótipos	5	1114,806 <sup>ns</sup>	0,034 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>ns</sup>	10,566 <sup>ns</sup>	1,777 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>ns</sup>	0,021 <sup>ns</sup>
após	Tratamento	1	18,062 <sup>ns</sup>	0,702**	0,025**	20,445 <sup>ns</sup>	0,072 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>ns</sup>	0,455*
iniciado o	Interação G x T	5	498,929 <sup>ns</sup>	0,056 <sup>ns</sup>	0,001 <sup>ns</sup>	4,0586 <sup>ns</sup>	0,726 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>ns</sup>	0,021 <sup>ns</sup>
estresse	Bloco	2	2054,527 <sup>ns</sup>	0,058 <sup>ns</sup>	0,003 <sup>ns</sup>	10,155 <sup>ns</sup>	2,002 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>ns</sup>	3,732**
hídrico	Resíduo	22	659,194	0,061	0,001	8,104	1,040	0,000	0,065
	Total	35	26698,076	2,633	0,083	292,178	39,486	0,008	9,580
	CV(%)		9,85	10,67	18,91	28,10	23,52	39,30	0,86
Fase/etapa	Fontes Variáveis		Quadrado médio						
			$C_i$	$E$	$g_s$	$A$	$A/E$	$A/C_i$	$T$
4 dias	Genótipos	5	315,550 <sup>ns</sup>	0,043 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>ns</sup>	2,545 <sup>ns</sup>	0,211 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>ns</sup>	0,054 <sup>ns</sup>
após	Tratamento	1	19228,444**	15,880**	0,268**	191,315**	6,258*	0,001**	2,890*
iniciado o	Interação G x T	5	443,127 <sup>ns</sup>	0,060 <sup>ns</sup>	0,001 <sup>ns</sup>	1,883 <sup>ns</sup>	0,276 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>ns</sup>	0,085 <sup>ns</sup>
estresse	Bloco	2	5020,750**	2,178**	0,011*	16,432 <sup>ns</sup>	3,705*	0,000*	20,275**
hídrico	Resíduo	22	732,166	0,060	0,002	2,951	0,482	0,000	0,402
	Total	35	49171,000	22,088	0,358	311,257	26,720	0,008	53,004
	CV(%)		12,27	10,63	27,25	16,40	26,72	15,13	2,04

Continuidade Tabela 12.

Fase/etapa	Fontes Variáveis		Quadrado médio						
			<i>Ci</i>	<i>E</i>	<i>gs</i>	<i>A</i>	<i>A/E</i>	<i>A/Ci</i>	<i>T</i>
6 dias após iniciado o estresse hídrico	Genótipos	5	1459,029 <sup>*</sup>	0,093 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>ns</sup>	1,016 <sup>ns</sup>	0,765 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>ns</sup>	0,238 <sup>ns</sup>
	Tratamento	1	33154,340 <sup>**</sup>	21,421 <sup>**</sup>	0,165 <sup>**</sup>	364,428 <sup>**</sup>	10,573 <sup>**</sup>	0,003 <sup>**</sup>	6,125 <sup>**</sup>
	Interação G x T	5	1615,273 <sup>**</sup>	0,059 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>ns</sup>	0,577 <sup>ns</sup>	0,887 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>ns</sup>	0,349 <sup>ns</sup>
	Bloco	2	2566,187 <sup>**</sup>	1,319 <sup>**</sup>	0,000 <sup>ns</sup>	9,487 <sup>ns</sup>	4,927 <sup>**</sup>	0,000 <sup>ns</sup>	22,844 <sup>**</sup>
	Resíduo	22	378,543	0,150	0,000	5,231	0,413	0,000	0,317
	Total	35	61986,187	28,142	0,192	506,464	37,787	0,011	61,739
	CV(%)			10,25	22,85	26,01	26,41	11,88	35,60
Fase/etapa	Fontes Variáveis		Quadrado médio						
			<i>Ci</i>	<i>E</i>	<i>gs</i>	<i>A</i>	<i>A/E</i>	<i>A/Ci</i>	<i>T</i>
Recuperação	Genótipos	5	1090,76 <sup>*</sup>	0,665 <sup>**</sup>	0,009 <sup>**</sup>	13,168 <sup>**</sup>	0,826 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>ns</sup>	0,263 <sup>**</sup>
	Tratamento	1	1034,69 <sup>ns</sup>	0,020 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>ns</sup>	2,491 <sup>ns</sup>	1,899 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>ns</sup>	0,587 <sup>**</sup>
	Interação G x T	5	411,37 <sup>ns</sup>	0,185 <sup>**</sup>	0,002 <sup>**</sup>	3,578 <sup>*</sup>	0,424 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>ns</sup>	0,018 <sup>ns</sup>
	Bloco	2	112,02 <sup>ns</sup>	0,299 <sup>**</sup>	0,001 <sup>*</sup>	4,611 <sup>*</sup>	0,292 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>ns</sup>	3,050 <sup>**</sup>
	Resíduo	22	321,14	0,039	0,000	1,238	0,481	0,000	0,036
	Total	35	15834,75	5,732	0,076	122,706	19,327	0,002	8,895
	CV(%)			7,41	13,26	18,80	15,27	13,90	23,75

<sup>ns</sup> - não significativo; <sup>\*\*</sup> - significativo a 1% de probabilidade de erro, pelo teste F

Na 3ª avaliação com 4 DEH também não houve diferença entre os genótipos, porém, o manejo hídrico afetou as variáveis Ci ( $p < 0,01$ ), E ( $p < 0,01$ ), gs ( $p < 0,01$ ), A, A/E ( $p < 0,05$ ), A/Ci ( $p < 0,01$ ) e T ( $p < 0,05$ ); na 4ª avaliação com 6 DEH, só houve diferenças significativas entre os genótipos, em Ci ( $p < 0,05$ ), contudo, os tratamentos com e sem estresse hídrico afetaram de maneira significativa todas as variáveis em estudo ( $p < 0,01$ ); e na 5ª avaliação (após a recuperação das plantas estressadas), ocorreram diferenças significativas, entre os genótipos, nas variáveis Ci ( $p < 0,05$ ), E ( $p < 0,01$ ), gs ( $p < 0,01$ ), A ( $p < 0,01$ ) e T ( $p < 0,01$ ).

Com relação à interação entre os fatores, só foram observados efeitos significativos na 4ª e 5ª avaliações, o que pode indicar independência dos fatores nas avaliações 1, 2 e 3. Na 4ª avaliação, a variável afetada foi somente Ci ( $p < 0,01$ ) e na 5ª avaliação, apenas E ( $p < 0,01$ ), gs ( $p < 0,01$ ) e A ( $p < 0,05$ ) foram afetadas de maneira significativa (Tabela 12).

#### **5.5.1. Condutância estomática (gs)**

Com 1 dia após iniciado o EH, a gs não foi afetada pelos tratamentos hídricos, possivelmente, em função da alta umidade ainda existente no solo, continuando as plantas com a condutância estomática elevada, como pode ser observado pelos valores de gs (Figura 4A).

Já com 3 DEH, o G1 (CNPA 2009-11) diminuiu significativamente sua gs, externando, dessa maneira, maior capacidade de percepção da diminuição da umidade do solo. Para os demais genótipos, também ocorreu diminuição na condutância, porém sem diferenças significativas (Figura 4B).

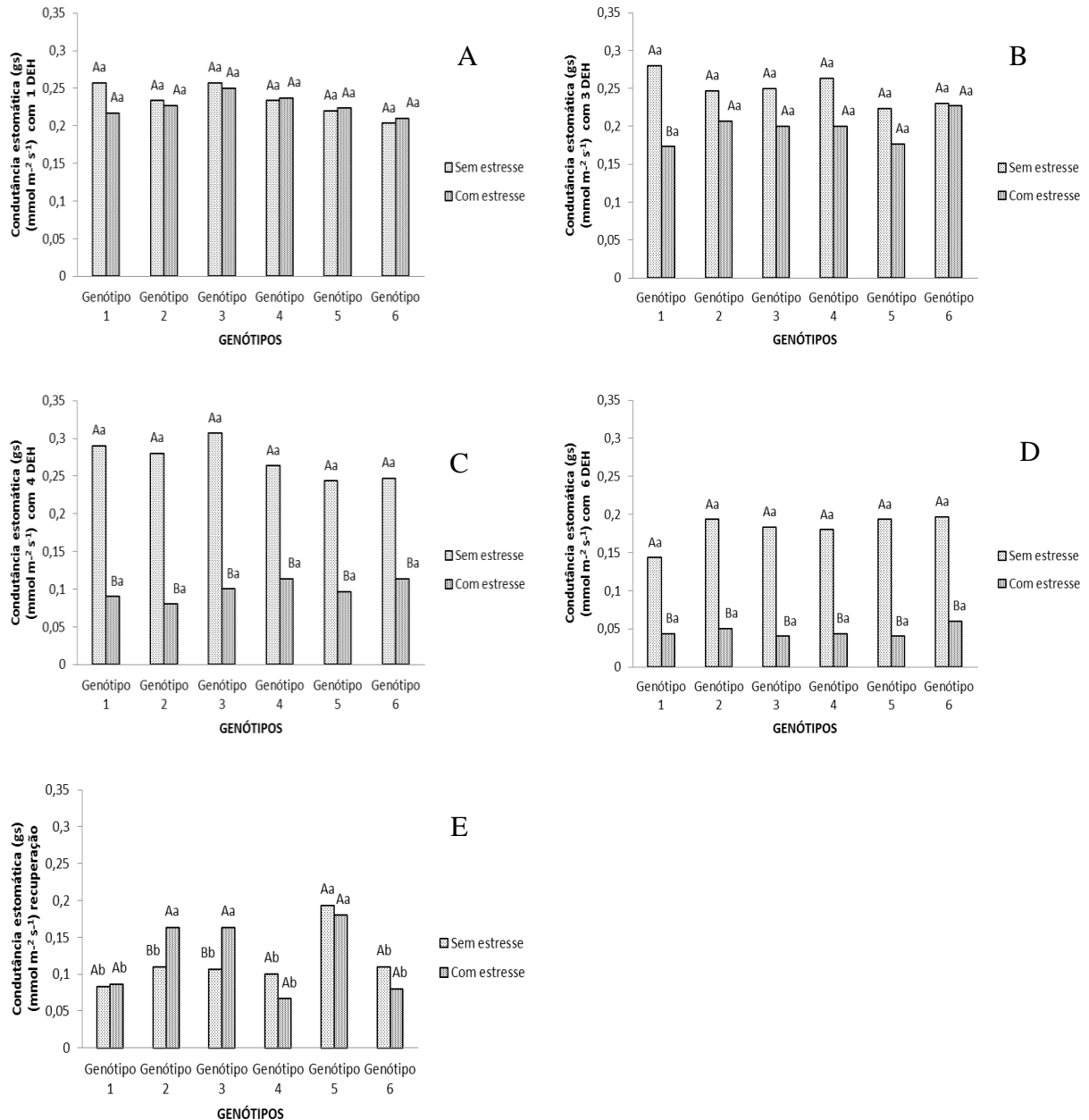
Com 4 DEH (Figura 4C), em todos os genótipos ocorreu redução significativa da gs, um sinal de ter a planta detectado a restrição hídrica, optando pelo maior fechamento estomático e, conseqüentemente, economizado água do solo, o que aumenta a probabilidade de sobrevivência à seca.

No sexto dia depois de iniciado o estresse hídrico, novamente, foi percebida a similaridade de resposta dos seis genótipos, pois, quanto mais se estendem os dias de estresse, menor ainda vai sendo a condutância estomática de todos os genótipos, como pode ser observado na Figura 4D.

Com relação à fase de reidratação (Figura 4E), após as plantas terem passado por um período de exposição ao EH e serem reidratadas, aumenta a turgescência das células e as folhas readquirem a forma normal, voltando a reabrir seus estômatos, buscando retomar o processo de crescimento. Esse fato é importante e fortalece a ideia de que, quanto menor for a umidade do solo, menor também será a gs. Todavia, Ennahli e Earl (2005) ao cultivarem algodoeiros em



solos com teores relativos de umidade de 75%, 25%, 15% e 5%, registraram  $g_s$  semelhantes nos algodoeiros cultivados nos solos com 75% e 25% de umidade, assim como registraram similaridades estatísticas nos algodoeiros cultivados nos solos com faixa de umidade de 15% e 5%, um indicativo da tolerância da espécie ao estresse hídrico.



**Figura 4.** Condutância estomática ( $g_s$ ).

Genótipo 1 = CNPA 2009-11, Genótipo 2 = CNPA 2009-13, Genótipo 3 = CNPA 2009-50  
Genótipo 4 = BRS SAFIRA, Genótipo 5 = CNPA 2009-6, Genótipo 6 = BRS TOPÁZIO

Letra maiúscula para genótipo entre tratamentos hídricos (teste 'F',  $p < 0,05$ ), e minúscula para genótipos dentro do mesmo tratamento hídrico (Scott-Knott,  $p < 0,05$ ).

O fechamento estomático também é considerado o maior limitante da fotossíntese, pois limita a entrada de  $\text{CO}_2$ , podendo reduzir os valores de  $C_i$ , limitando a eficiência de carboxilação da Rubisco (Chapin et al. 1987; Lawlor, 1995).

Ko e Pccinni (2009) também fazem menção à relação entre umidade do solo e condutância estomática ao caracterizarem trocas gasosas em plantas de algodoeiro sob limitadas condições de irrigação. Os autores citam que o estado fisiológico das plantas hidricamente estressadas pode ser verificado, não só através de medidas de umidade do solo, mas também, por intermédio de das trocas gasosas.

### 5.5.2. Fotossíntese (A)

A radiação eletromagnética emitida pelo sol é a principal fonte de energia para os processos biológicos e é por intermédio da fotossíntese que essa energia radiante é transformada em ATP, a moeda energética dos sistemas biológicos (PIMENTEL, 2004), sendo importante se conhecer como o estresse hídrico pode afetar essa máquina catalisadora e transformadora de energia, essencial à vida não só vegetal, como do sistema terrestre por completo.

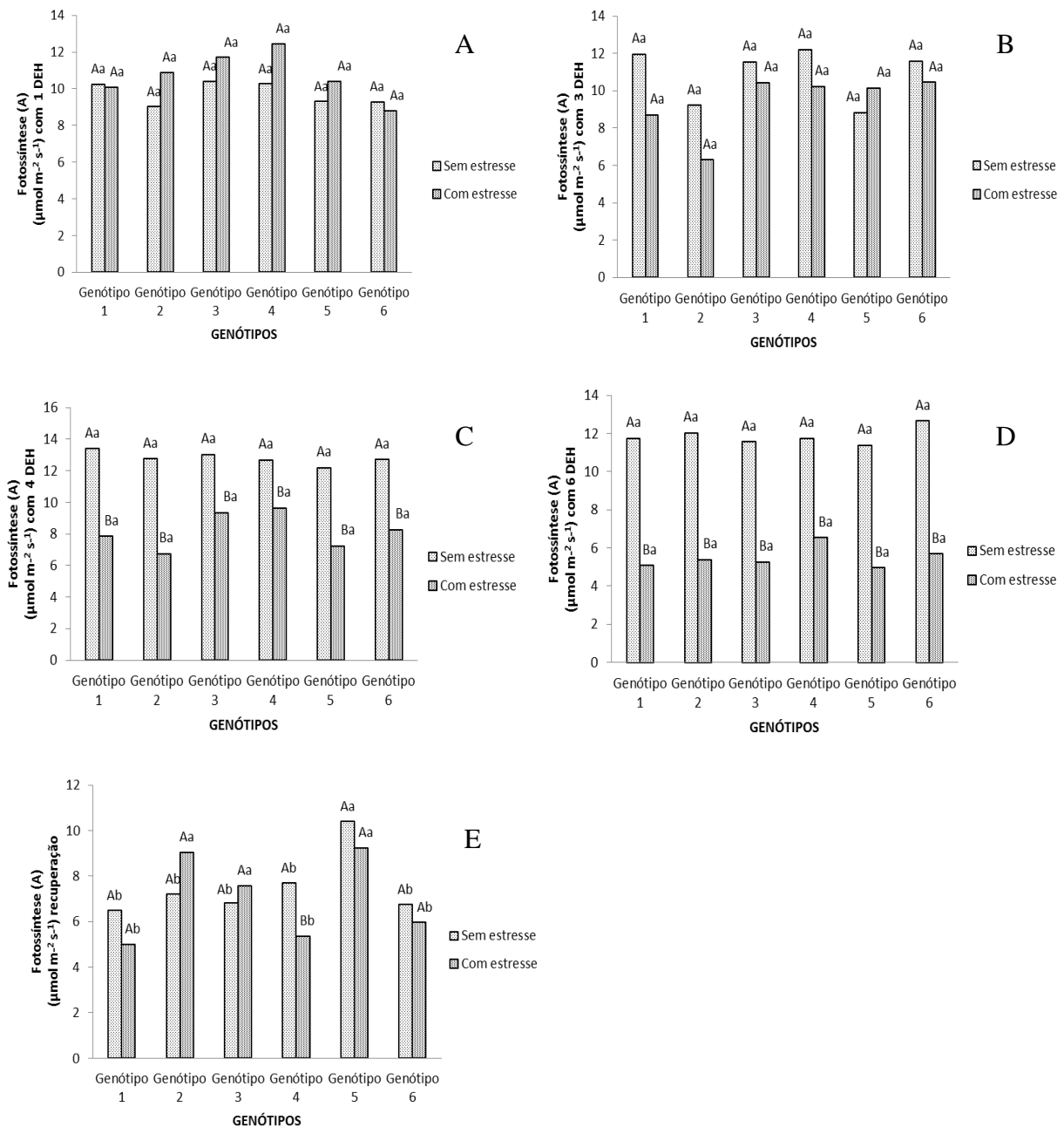
Sabe-se que o estresse hídrico severo é um dos causadores da diminuição da fotossíntese (LAUER E BOYER, 1992), no entanto, um dia de estresse hídrico não foi suficiente para reduzir a taxa fotossintética (Figura 5A). Mesmo com o prolongamento do estresse hídrico para três dias, continua a não haver diferença significativa entre os dois tratamentos (Figura 5 B).

Aos quatro (Figura 5C) e aos seis dias (Figura 5D) após iniciado o EH, todos os genótipos reduziram significativamente a fotossíntese líquida, pois o estresse hídrico severo causa redução da fotossíntese, tanto de forma direta, por desidratar o protoplasto, causando danos à estrutura do cloroplasto (ENNAHLI E EARL, 2005), como de forma indireta, causada pelo o fechamento dos estômatos, limitando a entrada de  $\text{CO}_2$ , podendo reduzir os valores de  $C_i$ , limitando a eficiência da carboxilação da rubisco (CARMO-SILVA et al., 2012).

Ao se analisar a Figura 5E, percebe-se que apenas a planta reidratada do G4 (BRS SAFIRA) continua com fotossíntese inferior a da planta que não sofreu estresse hídrico. Ao analisar as plantas dentro do tratamento CEH, é visto que a fotossíntese líquida do G2 (CNPA 200-13), G3 (CNPA 2009-50) e do G5 (CNPA 2009-6) é estatisticamente superior a dos demais.

Um dos possíveis motivos do G4 (BRS SAFIRA) não ter recuperado a capacidade fotossintética, pode ter sido devido à danificação do aparato, pois Ennahli e Earl (2005), em experimento com algodoeiro, baixaram gradativamente a umidade do solo de 75 para 5% em oito dias e, em seguida, elevaram a umidade do mesmo solo para 75%, por dois dias, verificando

perdas na eficiência quântica do fotossistema II, atribuindo o fato, à perda da função fotossintética dos cloroplastos.



**Figura 5.** Fotossíntese (A).

Genótipo 1 = CNPA 2009-11, Genótipo 2 = CNPA 2009-13, Genótipo 3 = CNPA 2009-50

Genótipo 4 = BRS SAFIRA, Genótipo 5 = CNPA 2009-6, Genótipo 6 = BRS TOPÁZIO

Letra maiúscula para genótipo entre tratamentos hídricos (teste 'F',  $p < 0,05$ ), e minúscula para genótipos dentro do mesmo tratamento hídrico (Scott-Knott,  $p < 0,05$ ).

### 5.5.3. Concentração interna de CO<sub>2</sub> (Ci)

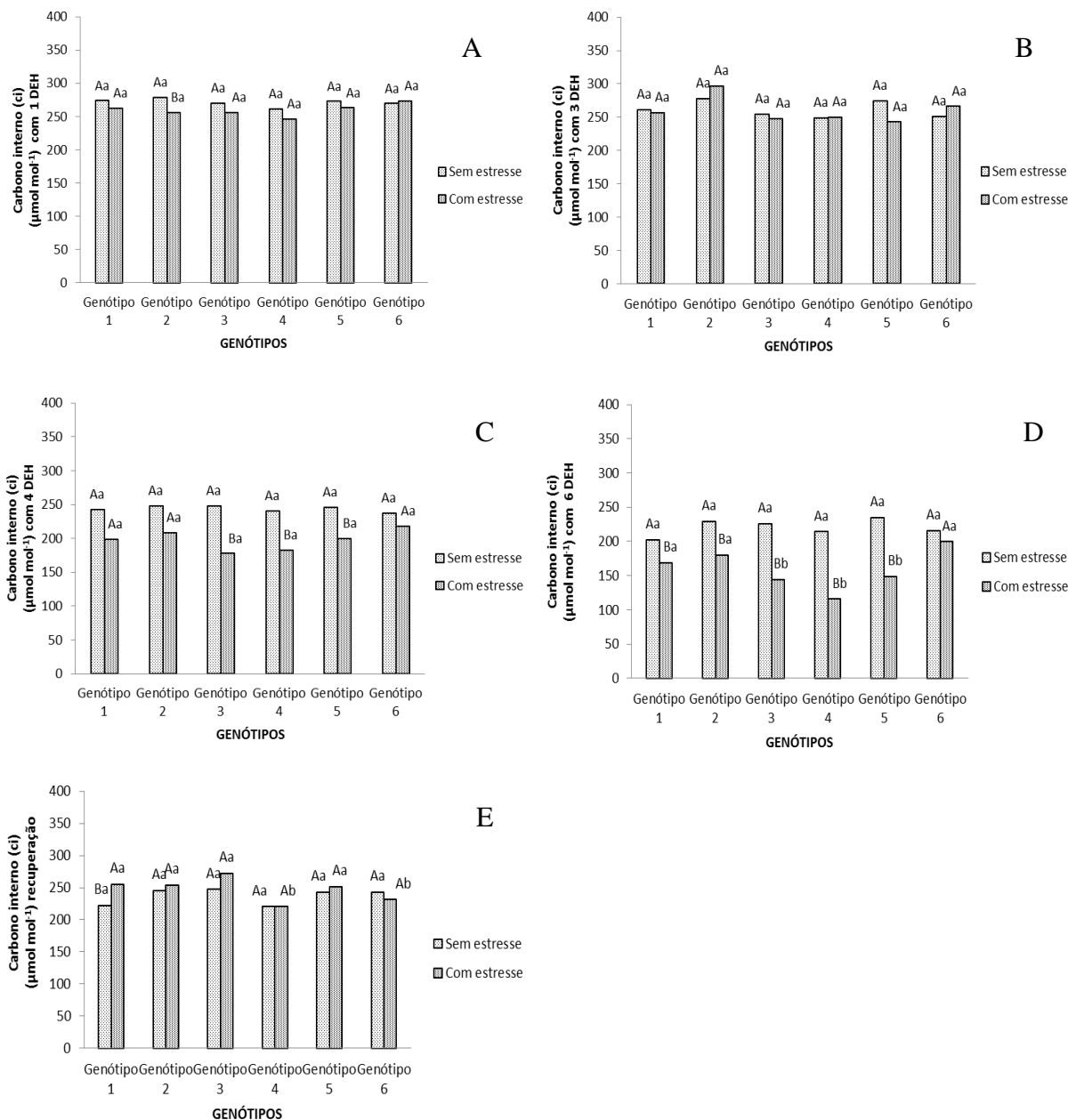
Na Figura 6A, pode-se observar que, com 1 DEH, houve leve redução em Ci nas plantas estressadas em comparação com as não estressadas, sendo significativo apenas no G2 (CNPA 2009-13).

Conforme pode ser visto na Figura 6B, com 3 DEH, não se constata nenhuma diferença significativa em função de nenhum dos fatores analisados, no entanto, aos quatro dias de estresse (Figura 6C), houve redução significativa na concentração interna do G3 (CNPA 2009-50), G4 (BRS SAFIRA) e G5 (CNPA 2009-6). Na Figura 6D, verifica-se que houve redução significativa na concentração de Ci nos genótipos G1 (CNPA 2009-11), G2 (CNPA 2009-13), G3 (CNPA 2009 50), G4 (BRS SAFIRA) e G5 (CNPA 2009-6), causada em consequência dos 6 dias de EH.

A redução da atividade fotossintética das plantas estressadas (Figura 5B) pode ter feito com que as plantas economizassem o Ci, entretanto, como o estresse hídrico reduziu a condutância estomática (Figura 4B), mesmo a planta reduzindo sua fotossíntese (Figuras 5C e D), ao longo dos dias, com a condutância estomática decrescida (Figuras 4C e D), houve também redução na Ci (Figuras 6C e D) por consumirem mais CO<sub>2</sub> do que estocarem.

Na Figura 6D, percebe-se que os genótipos G1(CNPA 2009-11), G2 (CNPA 2009-13) e G6 (BRS TOPÁZIO), dentro do tratamento com estresse hídrico, destacaram-se em relação aos demais. Isso pode ter ocorrido pelo fato de que baixos valores de Ci também estimulam a abertura estomática para permitir a entrada de CO<sub>2</sub>, resultando em maior equilíbrio entre entrada e saída desse gás (MACHADO et al., 2009).

Na Figura 6E, é observado que, ao serem reidratadas, as plantas recuperam a capacidade estomática (Figura 4E), aumentando sua capacidade fotossintética novamente (Figura 5E), cada genótipo de acordo com sua capacidade, permitindo a entrada e estocagem de CO<sub>2</sub>.



**Figura 6.** Concentração interna foliar de CO<sub>2</sub> (Ci).

Genótipo 1 = CNPA 2009-11, Genótipo 2 = CNPA 2009-13, Genótipo 3 = CNPA 2009-50

Genótipo 4 = BRS SAFIRA, Genótipo 5 = CNPA 2009-6, Genótipo 6 = BRS TOPÁZIO

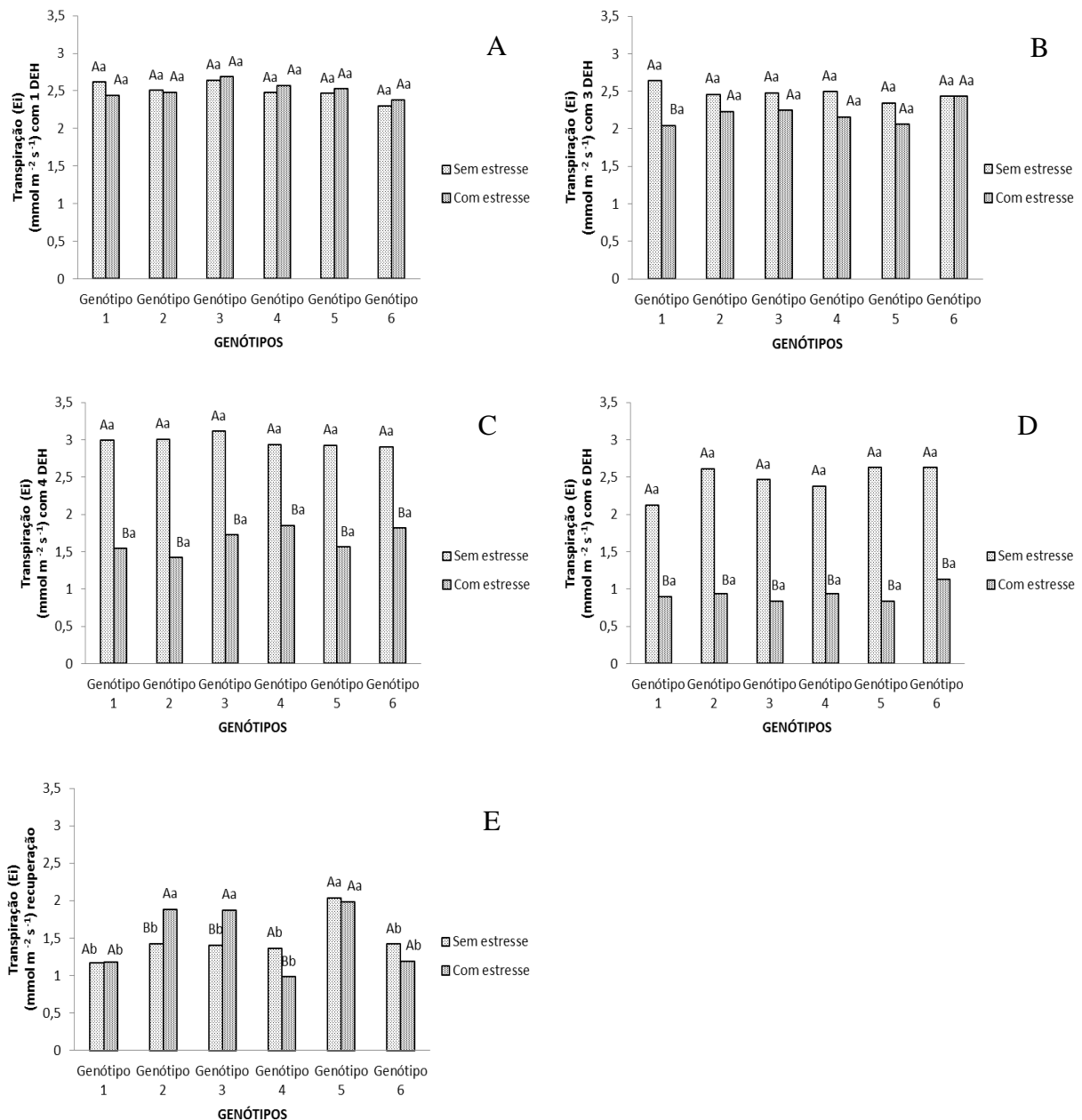
Letra maiúscula para genótipo entre tratamentos hídricos (teste 'F',  $p < 0,05$ ), e minúscula para genótipos dentro do mesmo tratamento hídrico (Scott-Knott,  $p < 0,05$ ).

### 5.5.4. Transpiração (E)

Com 1 DEH, não houve redução de transpiração entre os tratamentos hídricos nem variação entre os genótipos (Figura 7A). Ao se analisar cada genótipo isoladamente, na Figura 7B, observa-se que, com três dias de estresse hídrico, cinco dos seis genótipos mantiveram suas

transpirações estatisticamente similares, havendo redução da variável apenas no genótipo G1 (CNPA 2009-11).

Aos quatro dias de estresse (Figura 7C), todos os genótipos tiveram redução em sua transpiração, continuando dessa maneira até seis dias de estresse hídrico (Figura 7D). Ao serem reidratados, os genótipos G2 (CNPA 2009-13), G3 (CNPA 2009-50) e G5 (CNPA 2009-6) se sobressaem perante os demais (Figura 7E).



**Figura 7.** Transpiração (E).

Genótipo 1 = CNPA 2009-11, Genótipo 2 = CNPA 2009-13, Genótipo 3 = CNPA 2009-50  
Genótipo 4 = BRS SAFIRA, Genótipo 5 = CNPA 2009-6, Genótipo 6 = BRS TOPÁZIO

Letra maiúscula para genótipo entre tratamentos hídricos (teste 'F',  $p < 0,05$ ), e minúscula para genótipos dentro do mesmo tratamento hídrico (Scott-Knott,  $p < 0,05$ ).

Sob EH, a planta diminui sua transpiração visando manter uma maior quantidade interna de água, fazendo perdurar por um tempo maior a água do solo. Setin (2007) explica que as plantas mais bem hidratadas transpiram mais e têm maior crescimento.

Observou-se alta similaridade entre os dados de transpiração (Figura 7) e de condutância estomática (Figura 4), o que corrobora com Larcher (2006), ao explicar que, à medida que é diminuída a disponibilidade hídrica do solo, o fechamento estomático induz um decréscimo na taxa de transpiração.

#### **5.5.5. Eficiência instantânea do uso da água (A/E)**

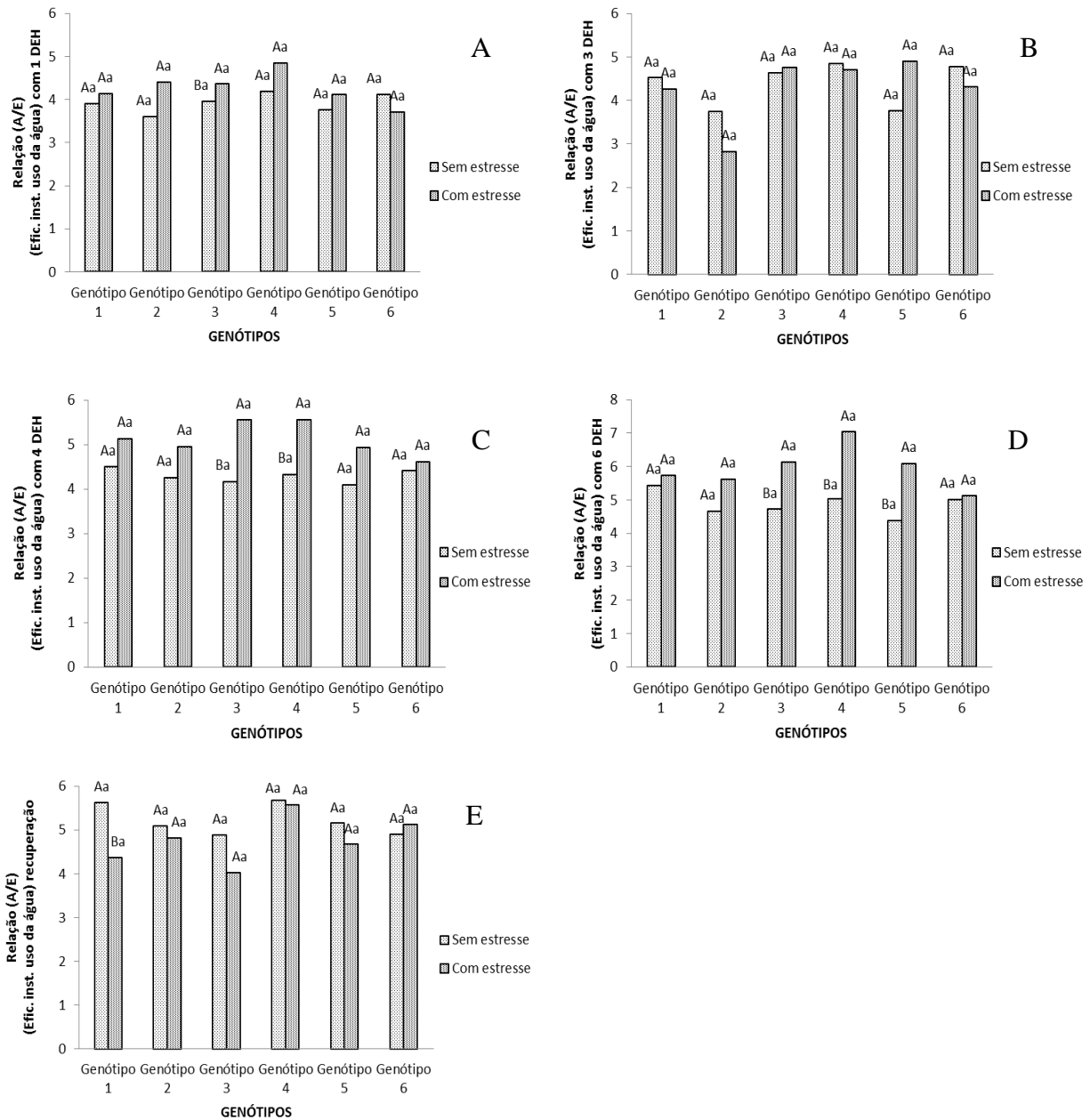
A EUA é tratada como a quantidade de carbono que a planta fixa por cada unidade de água que perde (JAIMEZ et al., 2005; SUASSUNA, 2011). Com 1 DEH, cinco dos seis genótipos submetidos ao estresse aumentaram levemente a EUA, como observado na Figura 8A, uma evidência do constante monitoramento do solo realizado pelo sistema radicular, pois, diante de uma leve diminuição da umidade do solo, a planta aumenta sua EUA, administrando melhor a saída de água em função do carbono que entra.

Com 3 DEH (Figura 8B), apenas dois dos seis genótipos estressados continuam a manter sua EUA levemente mais elevada que as plantas sem estresse. Tal fato pode ser explicado pela taxa fotossintética, pois, à medida que a planta reduz sua fotossíntese (Figuras 5B, C e D), ocorre aumento na EUA (Figuras 8B, C e D).

Com 4 DEH apenas os genótipos G3 (CNPA 2009 50) e G4 (BRS SAFIRA) aumentaram significativamente a EUA, todavia, os demais genótipos aumentaram a EUA, mas sem significância estatística. Dğadelen (2009) documentou que, à medida que o suprimento hídrico do solo é diminuído, o algodoeiro aumenta sua EUA, pois, com fornecimento hídrico de 100%, 75%, 50% e 25%, de acordo com a necessidade da cultura, foram obtidas EUAs de 0,765, 0,805, 0,885 e 0,960, respectivamente. Porém, as maiores produtividades foram alcançadas quando houve fornecimento hídrico mais próximo do demandado pela cultura, obtendo-se valores de 5.760, 4.775, 3.800 e 2.250 kg ha<sup>-1</sup>, de acordo com os respectivos fornecimentos hídricos supracitados.

Com a continuidade do estresse hídrico 6 dias (Figura 8D), constata-se que o G5 (CNPA 2009-6) junta-se ao grupo dos genótipos que aumentaram significativamente sua EUA. Da mesma maneira que a EUA é relacionada com a taxa fotossintética, pode ser também inversamente relacionada com a concentração interna de CO<sub>2</sub>, pois para absorver o CO<sub>2</sub> a planta perde água e à medida que a planta diminui a absorção de CO<sub>2</sub>, ocorre aumento na EUA.

As plantas que estavam sob estresse, ao serem reidratadas (Figura 8E), em busca de uma retomada urgente de crescimento, chegam a ter sua EUA inferior às plantas sem estresse hídrico.



**Figura 8.** Eficiência instantânea do uso da água (EUA).

Genótipo 1 = CNPA 2009-11, Genótipo 2 = CNPA 2009-13, Genótipo 3 = CNPA 2009-50  
Genótipo 4 = BRS SAFIRA, Genótipo 5 = CNPA 2009-6, Genótipo 6 = BRS TOPÁZIO

Letra maiúscula para genótipo entre tratamentos hídricos (teste 'F',  $p < 0,05$ ), e minúscula para genótipos dentro do mesmo tratamento hídrico (Scott-Knott,  $p < 0,05$ ).



Ao se comparar os genótipos entre si, nenhuma diferença significativa é observada entre as plantas testemunhas e as reidratadas, apesar disso, ao se comparar os manejos hídricos, é observado que o G1(CNPA 2009-11), ao ser reidratado, chega a ter sua média de EUA estatisticamente inferior ao das plantas sem estresse hídrico.

A diminuição da disponibilidade hídrica para uso na produção de algodão, obriga os pesquisadores a focar no aumento da eficiência do uso da água pelas plantas (EUA), desenvolvendo novas variedades tolerantes à seca e com melhor gestão de água (DĞADELEN et al., 2009).

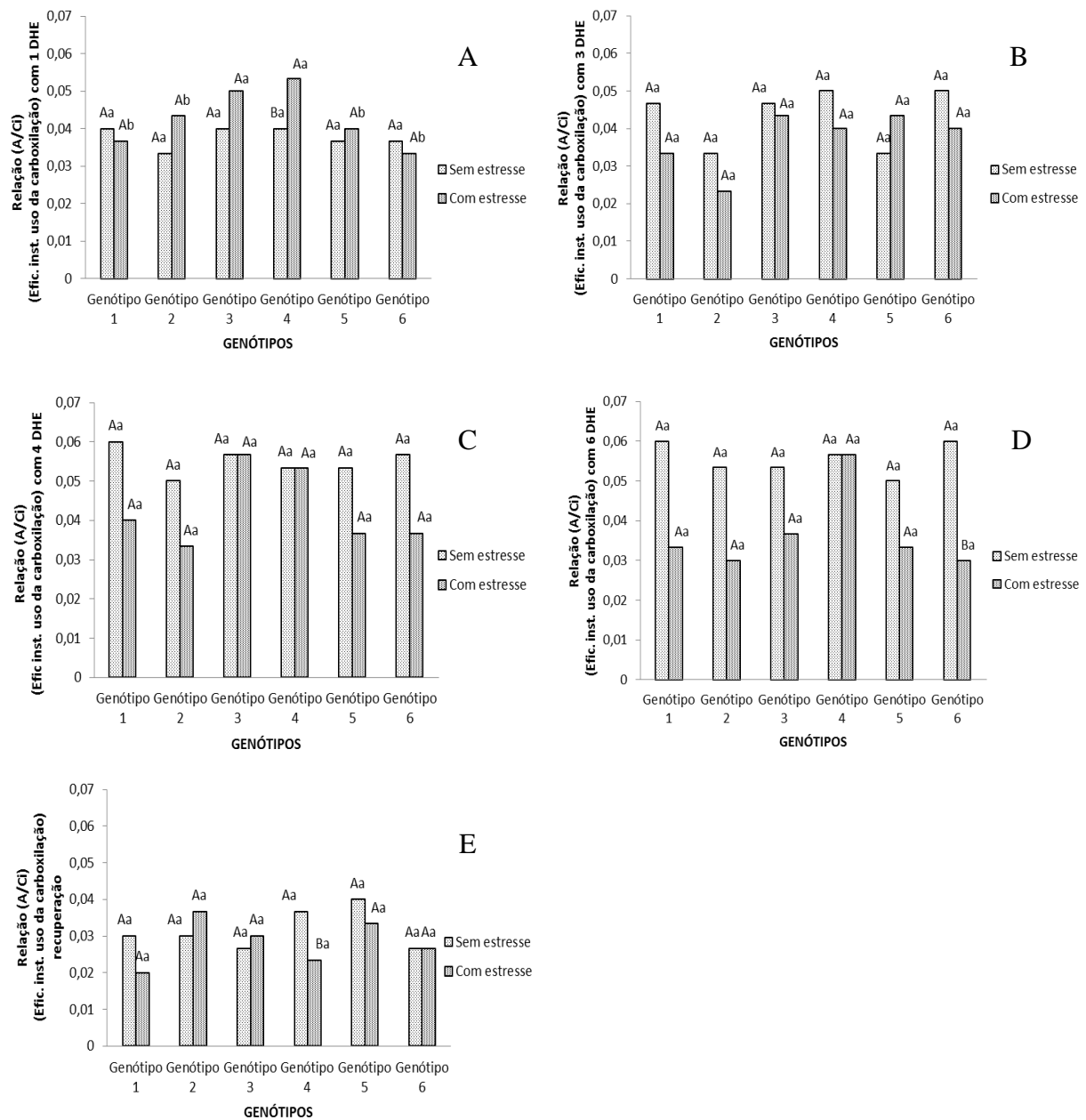
#### **5.5.6. Eficiência instantânea da carboxilação (EiC)**

A eficiência instantânea da carboxilação é calculada pela relação entre a taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> e a concentração de CO<sub>2</sub> intracelular (A/Ci) (KONRAD et al., 2005).

Não há diferença significativa entre os genótipos, nem dentro do tratamento CEH nem dentro de tratamento SEH, em nenhuma das avaliações (Figura 9). Há diferença significativa apenas para os tratamentos, no G4 (BRS SAFIRA), com 1 DEH (Figura 9A) e na recuperação (Figura 9 E), e para o G6 (RBRS TOPÁZIO) aos 6 DEH (Figura 9D). De tal forma, percebe-se que a EiC foi pouco afetada entre os genótipos e entre os tratamentos hídricos.

Um fato que pode ter contribuído para essa diferença entre os tratamentos hídricos pode ter sido a diferença de temperatura, pois no presente trabalho o estresse hídrico elevou significativamente a temperatura das plantas estressadas (TABELA 12).

Em trabalho com algodoeiro, Carmo-Silva et al., (2012) detectaram uma menor Eic nas plantas com estresse hídrico, e justificam tal fato às altas temperaturas. Outro fator que também pode ter contribuído para a diminuição da EiC nas plantas estressadas, foi a menor assimilação de CO<sub>2</sub>.



**Figura 9.** Eficiência instantânea da carboxilação (EiC).

Genótipo 1 = CNPA 2009-11, Genótipo 2 = CNPA 2009-13, Genótipo 3 = CNPA 2009-50  
 Genótipo 4 = BRS SAFIRA, Genótipo 5 = CNPA 2009-6, Genótipo 6 = BRS TOPÁZIO

Letra maiúscula para genótipo entre tratamentos hídricos (teste 'F',  $p < 0,05$ ), e minúscula para genótipos dentro do mesmo tratamento hídrico (Scott-Knott,  $p < 0,05$ ).

## 5.6. Expressão gênica

### 5.6.1. NCED (9-cis-epoxicarotenoide dioxigenase)

Nas análises de expressão de NCED por meio de RT-PCR semiquantitativa (Figura 10), constatou-se expressão diferencial a partir do 4º dia de estresse hídrico (DEH) no G4 (BRS Safira) e, aos 6 DEH, em todos os genótipos analisados, com uma expressão relativa maior no G1 (CNPA 2009-11), seguido do G2 (CNPA 2009-13), G4 (BRS Safira) e G5 (CNPA 2009-6).

A expressão de NCED no G4 (BRS Safira) no 4º DEH, quando houve redução da condutância estomática de 75% para 43%, sugere que os genótipos podem possuir tempos diferentes de ativação do ABA frente ao estresse hídrico, pois nessa mesma fase, no 4º DEH observou-se, também, que os genótipos G1(CNPA 2009-11) e G2 (CNPA 2009-13) não expressaram o gene NCED, não obstante, foi observada redução na gs de 61% para 31%, e de 83% para 28%, respectivamente.

O gene NCED atua quase no final da cascata biosintética do ABA e os resultados obtidos com esse estudo podem explicar alguns pontos da resposta desses genótipos ao estresse hídrico (EH). Comparando-se os resultados da expressão gênica com as análises de condutância estomática, pode-se inferir que a ausência de expressão do NCED, em alguns genótipos e em algumas fases do estresse, pode se dar pela falta de atuação do ABA na indução do fechamento estomático. Pois, apesar da estreita relação entre o aumento da concentração de ABA e da condutância estomática, em plantas hidricamente estressadas, o envolvimento de outros fatores agindo na planta devem ser considerados (GOMES, 1997). Outros pesquisadores também não detectaram a presença de ABA nos primeiros momentos do estresse hídrico, e atribuem o fechamento estomático a outros fatores, a exemplo de Plumbe e Willmer (1986) que relatam a existência de compostos fenólicos capazes de causarem o fechamento estomático, quase tão eficazes quanto o ABA. O maior exemplo desses compostos fenólicos é o ácido acetilsalicílico, presente na planta não só em condições de estresse hídrico, como também em estresse salino, em temperaturas altas ou baixas ou na defesa frente ao ataque de pragas ou patógenos (CARVALHO et al., 2007, FREITAS et al., 2009).

Burschka et al. (1983), em experimento de estresse hídrico com *Arbutus unedo*, não encontraram nenhuma correlação entre o conteúdo de ABA e a condutância estomática, apesar de grande diferença de potencial hídrico e de fechamento dos estômatos. Park (2012), em trabalho de identificação genômica em plantas de algodoeiro hidricamente estressadas,

identificou 519 genes relacionados ao estresse hídrico, contudo, nenhum deles estava relacionado à biossíntese ou a mecanismos de ação do ABA, nem à regulação dos estômatos.

Por outro lado, analisando-se a expressão de NCED nos quatro genótipos, aos seis DEH, e tomando como base os resultados da condutância estomática (Figura 4D), tem-se a expressão em todos os genótipos e uma baixa condutância estomática. De acordo com Shamim (2013) e Clément (2011), isso pode ser explicado porque a presença de ABA está relacionada ao fechamento estomático, explicando o aumento da expressão do gene NCED.

A despeito disso, diversos pesquisadores têm registrado a atuação do ABA no fechamento estomático de plantas hidricamente estressadas, conferindo-lhes maior tolerância e condições para melhor crescimento nas condições limitantes do estresse hídrico (ADDICOTT E LYON, 1969), (HO E VARNER 1976), (ACKERSON, 1981), (RODRIGUEZ E DAVIES, 1982), (IWASAKI et al., 1995), (GOMES et al., 1997), (QUIN E ZEEVAART, 1999), (UNO et al., 2000), (WANG, 2003), (SHATIL et al., 2011), (SETTER et al., 2011), (WEI et al., 2012).

Já na etapa de recuperação das plantas, após o EH, apenas o genótipo G2 (CNPA 2009-13) continuou a expressar o gene NCED, em resposta ao fator de estresse. Isso corrobora com a hipótese de que a resposta ao EH é genótipo dependente. Contudo, a condutância estomática desse genótipo estava 32% mais alta que a da planta não estressada, o que sugere, mais uma vez, que pode não haver correlação entre a indução do fechamento estomático e a expressão de ABA.

Na literatura, muitos trabalhos correlacionam a atuação do ABA e o fechamento dos estômatos (SHATIL et al., 2011), (WEI et al., 2012). Por outro lado, existem resultados que não se consegue associar a atuação do ABA ao fechamento estomático (BURSCHKA et al., 1983; PARK et al., 2012) e sugerem a atuação de outros compostos no fechamento dos estômatos, considerando a ausência de ABA no momento das análises (Plumbe e Willmer 1986). Neste trabalho existem indícios dessas duas vertentes.

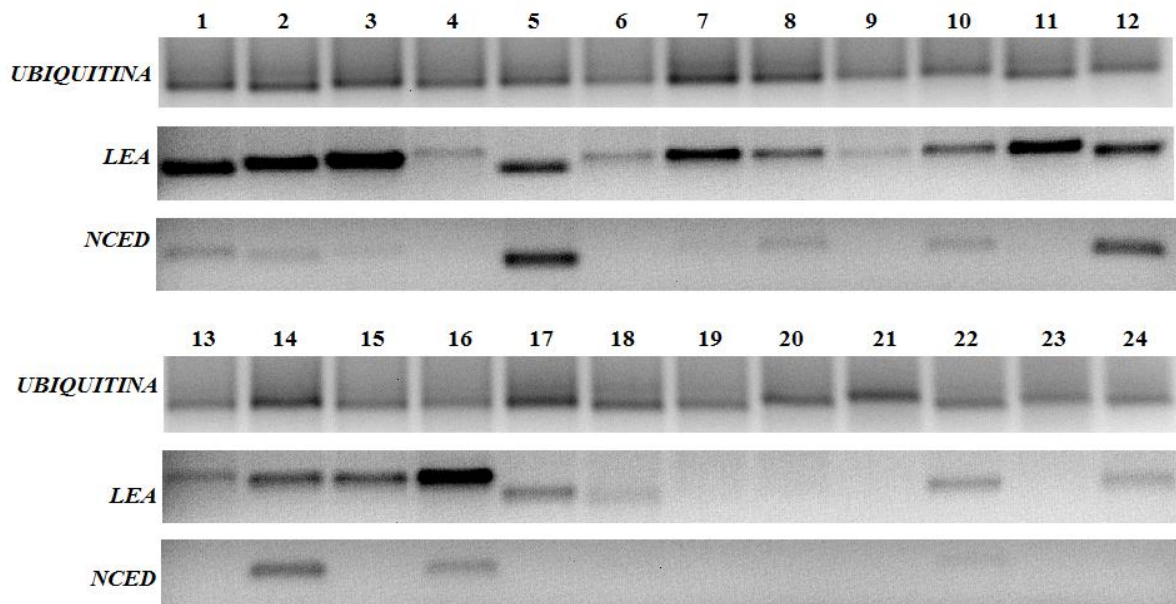
### **5.6.2. LEA (Late Embryogenesis Abundant)**

Ao se estudar o gene LEA, constatou-se expressão no G5 (CNPA 2009-6) e no G4 (BRS Safira) aos 6 DEH, e ainda, no G2 (2009-13) e no G4 (BRS Safira) na fase de recuperação do estresse, sugerindo que o LEA pode atuar durante e após o EH em alguns genótipos (Figura 10).

A expressão de LEA durante o EH pode ser explicada, pois durante a desidratação celular as proteínas LEA fazem com que reservatórios de água sejam formados por meio de cristais de açúcar (HAND et al., 2011), desenvolvidos no citoplasma celular, proporcionando dessa maneira maior proteção contra a desnaturação intracelular de moléculas grandes e estabilizando a

membrana plasmática (BURKE, 1986; SHINH, et al., 2008). Além disso, as proteínas LEA também possuem papel na estabilização de outras proteínas citoplasmáticas e membranares (HOEKSTRA et al., 2001).

As proteínas LEA foram descritas em algodoeiro por se acumularem durante os últimos estádios de desenvolvimento das sementes antes da dessecação (DURE, GALAU, 1981) e em tecidos vegetativos de plantas sob estresses ambientais. Porém, apesar de serem amplamente divulgadas por desempenharem um papel crucial na desidratação celular, suas funções fisiológicas e bioquímicas são em grande parte desconhecidas (HUNDERTMARK e HINCHA, 2008).



**Figura 10.** Eletroforese em gel de Agarose 0,8% (p/v) da RT-PCR semi-quantitativa com o oligonucleotídeo constitutivo Ubiquitina e os específicos NCED e LEA.

Poços: 1 e 2 – Genótipo CNPA 2009-6 SEH e CEH; 3 e 4 - Genótipo CNPA 2009-11 SEH e CEH; 5 e 6 - Genótipo CNPA 2009-13 SEH e CEH; 7 e 8 - Genótipo BRS SAFIRA SEH e CEH (plantas com quatro DEH); 9 e 10 – Genótipo CNPA 2009-6 SEH e CEH; 11 e 12 - Genótipo CNPA 2009-11 SEH e CEH; 13 e 14 - Genótipo CNPA 2009-13 SEH e CEH; 15 e 16 - Genótipo BRS SAFIRA SEH e CEH (plantas com seis DEH); 17 e 18 – Genótipo CNPA 2009-6 SEH e CEH; 19 e 20 - Genótipo CNPA 2009-11 SEH e CEH; 21 e 22 - Genótipo CNPA 2009-13 SEH e CEH; 23 e 24 - Genótipo BRS SAFIRA SEH e CEH (plantas se recuperando do EH).

Outros autores sugerem que algumas proteínas LEA podem ser desencadeadas por ABA (GALAU et al., 1986; MORRIS et al., 1990, HUGHES, GALAU 1991, ESPELUND et al., 1992;

MAO 1995; HUNDERTMARK e HINCHA, 2008), o que sugere, neste trabalho, que a presença de LEA no G5 (CNPA 2009-6) e no G4 (BRS Safira), nos quais observou-se também a expressão do NCED, gene envolvido na cascata do ABA, pode ter sido induzida pelo ABA.

No estágio de recuperação, os genótipos G2 (CNPA 2009-13) e G4 (BRS Safira) tiveram expressões do gene LEA (Figura 10), sugerindo ser reflexo do estresse hídrico, pois é sabido que após a dessecação, as proteínas LEA podem aumentar a resistência dos cristais de açúcar, formados por proteínas, e atuar como substituto de água para estabilizar os componentes celulares (SHINH E HSING, 2008).

Através desse trabalho, percebe-se que a falta de água pode causar mudanças fisiológicas nas plantas, e isto apresenta bases moleculares e genéticas, além do mais, pode ocorrer expressão diferencial de genes, numa mesma espécie, dependendo do nível (tempo) de estresse imposto, dessa forma, toda expressão fenotípica está relacionada à expressão gênica e a sua interação como ambiente.

## 6. CONCLUSÕES

O genótipo CNPA 2009-6 se recupera mais rápido com a reidratação após o estresse hídrico;

Baseado no tempo de exposição ao estresse hídrico, os genótipos CNPA 2009-13 e CNPA 2009-50 são mais tolerantes ao estresse hídrico;

A condutância estomática é um bom indicativo de percepção da deficiência de umidade do solo pelo algodoeiro;

O gene NCED (sintetizador do ABA) atuou nos genótipos CNPA 2009-6 e no BRS SAFIRA na indução do fechamento estomático, o que ocorreu no quarto dia de estresse hídrico, porém, não foi identificado nos genótipos CNPA 2009-11 e CNPA 2009-13 nessa mesma fase;

O gene NCED atuou nos quatro genótipos, CNPA 2009-6, BRS SAFIRA, CNPA 2009-11 e no CNPA 2009-13, aos seis dias de estresse hídrico;

Há presença de proteínas LEA nos genótipos CNPA 2009-6 e BRS Safira aos seis dias de estresse hídrico e nos genótipos CNPA 2009-13 e BRS Safira na fase de recuperação do estresse.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAPA, **Associação Brasileira dos Produtores de Algodão**. Disponível em <http://www.abrapa.com.br/estatisticas/Paginas/Algodao-no-Mundo.aspx>, acesso em: 27/02/2014.

ACKERSON, R.C: Synthesis and movement of abscisic Acid in water-stressed cotton leaves. **Plant Physiology**. v. 69, n. 3, p. 609 – 613,1981.

ADDICOTT F T & LYON J L. Physiology of abscisic acid and related substances. **Annu. Rev. Plant Physiology**. v.20, p.139-164, 1969.

AGEVAP, **Relatório de Conjuntura dos Recursos Hídricos balanço da situação e da gestão das águas no Brasil**, 2013. Disponível em: <http://www.agevap.org.br/agevap/news.php?id=160>. Acesso 1/01/2014.

ANGELOCCI, L. R. Água na planta e trocas gasosas/energéticas com a atmosfera. Introdução ao tratamento biofísico. **Editado pelo autor**, Pirtacicaba, 2002.

BATISTA, C. H.; AQUINO L. A.; SILVA T. R.; SILVA, H. R. F. CRESCIMENTO E PRODUTIVIDADE DA CULTURA DO ALGODÃO EM RESPOSTA A APLICAÇÃO DE FÓSFORO E MÉTODOS DE IRRIGAÇÃO, **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, v.4, n.4, p.197–206, 2010.

BELTRÃO, N. E. M; AZEVEDO, D. M., O agronegócio do algodão no Brasil. 2 ed. **Revista e ampliada**. Brasília-DF: Embrapa informação tecnológica, p. 12 – 17, 2008.

BELTRÃO, Napoleão Esberard de Macêdo; ALMEIDA, F. A. C.; Cardoso, G.D. (Discente-Autor /Mest.Acadêmico): Influência da precipitação pluvial na qualidade intrínseca da fibra do



algodão, cultivar BRS 201 no momento da colheita. In: IV CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 4; 2003, Goiânia, GO. **Anais...** 2003, CD-ROM.

BELTRÃO, N. E. de M.; SOUZA, J. G. O gênero, *Gossypium* e suas espécies cultivadas e silvestres. In: BELTRÃO, N. E. **O agronegócio do algodão no Brasil**. Brasília/DF: EMBRAPA-CNPA, v.1, p.1.234 – 248, 1999.

BELTRÃO, N. E. de M.; OLIVEIRA, M. I. P. Oleaginosas e seus óleos: vantagens e desvantagens para produção de biodiesel. Campina Grande: **Embrapa Algodão** (Documento 201), 2008.

BLANCO, F. F.; RIBEIRO, V. Q.; RIBEIRO J. L.; NOGUEIRA, C. C. P.; VELOSO, M. E. C. Crescimento e produção de cultivares de algodão sob irrigação com déficit. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 8.; COTTON, 1., 2011, São Paulo. Evolução da cadeia para construção de um setor forte: **anais**. Campina Grande, PB: Embrapa Algodão, 2011.

BRAY, E. A.; MOSES, M. S.; IMAI, R.; COHEN, A.; PLANT, A. L. Regulation of gene expression by endogenous abscisic acid during drought stress. In “Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress”. **American Society of Plant Physiologists Series**. p.167-176, 1993.

BURKE, M. J. The glassy state and survival of anhydrous biological system. **Membranes, Metabolism and Dry Organisms** (A. C. Leopold, ed.), p. 358–363, 1986.

BURSCHKA, C.; TENHUNEN, J.D. & HARTUNG, W. Diurnal variations in abscisic acid content and stomatal response to applied abscisic acid in leaves of irrigated and non-irrigated *Arbutus unedo* plants under naturally fluctuating environmental conditions. **Oecologia**, v.58, p.128-131, 1983.

CIA E.; FREIRE E. C.; SANTOS W. J. S. Melhoramento genético do algodão. In: **cultura do algodoeiro**. Associação brasileira para pesquisa da potassa e fosfato, Piracicaba –SP, 1999.

CAMINHA, I. O. **Conservação de sementes de algodão herbáceo** (*Gossypium hirsutum* L. r. *latifolium* Hutch) **colhidas em diferentes horários**. Areia, 2000. Trabalho de Graduação (Graduação em Agronomia). Universidade Federal da Paraíba.

CARVALHO, P. R.; MACHADO NETO, N. B.; CUSTÓDIO C. C.; ÁCIDO SALICÍLICO EM SEMENTES DE CALÊNDULA (*Calendula officinalis* L.) SOB DIFERENTES ESTRESSES. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n.1, p. 114-124, 2007.

CARMO-SILVA, A. E. C.; GORE, M. A.; ANDRARE-SANCHES, P.; FRENCH, A. N.; HUNSAKER, D. J.; SALVUCCI, M. E.; Decreased CO<sub>2</sub> availability and inactivation of Rubisco limit photosynthesis in cotton plants under heat and drought stress in the field. **Environmental and Experimental Botany**, v.8, p. 1– 11, 2012.

CAVALCANTE, I. H. L.; OLIVEIRA, F. A; CAVALCANTE L. F; BECKMANN, M. Z; CAMPOS, M. C.C; GONDIM, S. C; Crescimento e produção de duas cultivares de algodão irrigadas com águas salinizadas. **Rev. Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.9, p.108-111, 2005.

CHAVES, M. M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA, J. S. Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, n. 30, p. 239-264, 2003.

CHAPIN, III F.S.; BLOOM, A. J.; FIELD, C.B; WARING, R.H. Plant responses to multiple environmental factors. **BioScience**, v.37, p.49-57, 1987.

CLÉMENT M, LEONHARDT N, DROILLARD MJ, REITER I, MONTILLET JL, GENTY B, LAURIERE C, NUSSAUME L, NOEL, L.D. The Cytosolic/Nuclear HSC70 and HSP90 Molecular Chaperones Are Important for Stomatal Closure and Modulate Abscisic Acid-Dependent Physiological Responses in Arabidopsis. **Plant Physiology**, n.156, v.3,p.1481–1492, 2011.

CPTEC/INPE, **CLIMATOLOGIA DE PRECIPITAÇÃO E TEMPERATURA**. Disponível em: <http://clima1.cptec.inpe.br/> , acessado em 01/02/2014.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, **Acompanhamento da safra Brasileira Grãos**: Acessado em 02/01/2014 Disponível em: [http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/12\\_levantamento\\_set2006.pdf](http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/12_levantamento_set2006.pdf).

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, **Acompanhamento da safra Brasileira Grãos**: Acessado em 02/01/2014 Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_11\\_08\\_09\\_29\\_24\\_boletim\\_graos\\_novembro\\_2013.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_11_08_09_29_24_boletim_graos_novembro_2013.pdf).

CRUZ, R. F. D; INDUÇÃO E RECUPERAÇÃO DO STRESSE HÍDRICO EM VARIEDADES PORTUGUESAS DE MILHO, **Dissertação de mestrado**, 2006.

CUSHMAN, J.C.; BOHNERT, H.J. Genomic approaches to plant stress tolerance. *Current Opinion in Plant Biology*, v.3, p. 117-124, 2000.

CUSTÓDIO, R. J. M.; SOUSA, E B.; SANTOS, R. C. dos; MELO FILHO, P. de A.; OLIVEIRA FILHO, E. C. de; BELTRÃO, N. E. de M. Análise de crescimento e trocas gasosas em duas cultivares de algodão submetidas a estresse hídrico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 6. **Resumos...** Uberlândia, 2007. p. 69 1 CD-ROM, 2007.

DANGL, J. L.; DIETRICH, R. A.; THOMAS, H. Senescence and Programmed Cell Death. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologist. Cap. 20, p. 1044 – 1100. 2000.

DĞADELEN, N.; BAŞAL, H.; YILMAZ, E.; GÜRBÜZ, T.; AkÇAY, S. Different drip irrigation regimes affect cotton yield, water use efficiency and fiber quality in western Turkey. **agricultural water management**. v. 9 6. P.1 1 1 – 1 2 0, 2009.

DUNCAN, R. R & BALIGAR, V. C. Genetics, breeding, and physiological mechanisms of nutrient uptake and use efficiency: an overview. In: **Crops as enhancers of nutrient use**. Duncan, R. R & Baligar, V. C. (Ed.). Academic Press, San Diego, p. 3-36, 1992.

DURE, L. III; GREENWAY, S.C; GALAU, G.A. Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by in vitro and in vivo protein synthesis. **Biochemistry**. v.20, p.4162-4168, 1981.

ENNAHLI, S.; EARL, H. J. Physiological Limitations to Photosynthetic Carbon Assimilation in Cotton under Water Stress. **Crop Science**. v.45, n.6, p. 2374-2382, 2005.

ESPELUND, M.; SAEBAE-LARSSSEN, S.; HUGHES, D. W.; GALAU, G. A.; LAERSEN, F.; JAKOBSEN, K. S.; Late embryogenesis-abundant genes encoding proteins with different numbers of hydrophilic repeats are regulated difeferentially by abscisic acid and osmotic stress. **The plant Journal**, n.2, v.2, p.241-252, 1992.

FARIAS, José Renato Bouças. Dinâmica da água no sistema solo-água-atmosfera: déficit hídrico em culturas. **ITEM**. n. 68, p. 32-37, 4º trimestre, 2005.

FERNANDES, P. D. Metabolismo do algodoeiro em ambientes adversos In: **V CONGRESSE BRASILEIRO DE ALGODÃO**, Salvador, 2005.

FERRAZ, R. L. S; MELO, A. S; FERREIRA, R. S. F; DUTRA, A. F; FIGUEREDO, L. F. Aspectos morfofisiológicos, rendimento e eficiência no uso da água do meloeiro 'Gália' em ambiente protegido. **Revista Ciência Agronômica, Fortaleza**, v. 42, n. 4, p. 957-964, 2011.

FERREIRA, D. F. **SISVAR 5.3** - software de análises estatísticas. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2010. 1 CD-ROM.

FRANKS, P.J., FARQUHAR, G.D. The effect of exogenous abscisic acid on stomatal development, stomatal mechanics, and leaf gas exchange in *Tradescantia virginiana*. **Plant Physiology**. v. 125, p. 935-942, 2001.

FREITAS, F. C.; VIEIRA JÚNIOR, J. R.; SILVA, D. S. G.; REIS, N. D.; ANTUNES JÚNIOR, H; Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos, **Embrapa Documentos133**, 2009.

FRENSCH, J. Primary responses of root and leaf elongation to water deficits in the atmosphere and soil solution. **J. Exp. Botany**. v.4, p.8985-999, 1997.

**INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA**. <http://www.inmet.gov.br/portal/>  
Acessado em: 01/02/2014.

GALAU, G. A., HUGH, D. W. AND DURE, L. Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis abundant (lea) mRNAs. **Plant Molecular Biology** v.7, 155–170. 1986.

GENTY, B., J.M. BRIANTAIS, AND J.B. Vieira Da Silva. Effects on drought on primary photosynthetic processes of cotton leaves. **Plant Physiology**. v.83, p.360–364. 1987.

GOMES, M. M. A.; LAGÔA, A. M. M. A.; MACHADO, E. C.; FURLANI, P. R. TROCAS GASOSAS E QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO ABCSÍCO EM DUAS CULTIVARES DE ARROZ DE SEQUEIRO SUBMETIDAS À DEFICIÊNCIA HÍDRICA. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, n.9, v.3,p.177-183, 1997.

GONÇALVES, E.G. & LORENZI, H. **Morfologia vegetal: Organografia e dicionário ilustrado de morfologia das plantas vasculares**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, Nova Odessa. 2007.

GUIMARÃES, C. M.; STONE, L. F.; Métodos de Avaliação das Condições hídricas das Plantas. **Comunicado Técnico, Embrapa Arroz e Feijão – GO**, 2008

HAND, S.; MENZE M.; TONER, M.; BOSWELL L.; MOORE, D.; LEA proteins during water stress: not just for plants anymore. **Annu Rev Physiology**. v.73, p 115-134, 2011.

HARTUNG, W.; SAUTER A. & HOSE E. Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where it go to? **J. Exp. Botany**. v.53, p. 27- 32, 2002.

HUGHES, D.W. AND GALAU, G.A. Developmental and environmental induction of Lea and LeaA mRNAs and the postabscission program during embryo culture. **Plant Cell**. v.3, p.605-618, 1991.

HUNDERTMARK, M.; HINCHA, D.; LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Genomics**, v.9, p.118-130, 2008.

HO, D.T.-H., AND VARNER, J.E. Response of barley aleurone layers to abscisic acid. **Plant Physiology**. v.57, p.175-178, 1976.

HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A. & BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation. **Trends Plant Science**. v.6, p.431- 438. 2001.

HONG-BO, SHAO.; ZONG-SUO, L.; LEA proteins in higher plants: Structure, function, gene expression and regulation. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v.45, p. 131-135, 2005.

IWASAKI, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Identification of a cis-regulatory region of a gene in *Arabidopsis thaliana* whose induction by dehydration is mediated by abscisic acid and requires protein synthesis. **Molecular and General Genetics**, v.247, p. 391-398, 1995.

JAIMEZ, R. E; RADA, F; GARCÍA-NÚÑEZ, C; AZÓCAR, A. Seasonal variations in leaf gas exchange of platain cv. ‘Hartón’ (*Musa* AAB) under different soil water conditions in a humid tropical region. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.104, n.1, p.79-89, 2005.

KASUGA, M.; MIURA, S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. A combination of the Arabidopsis DREB1A gene and stress-inducible rd29A promoter improved drought and low temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. **Plant Cell Physiology**, v. 45, n. 3, p.346-350, 2004.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. São Paulo: Guanabara Koogan, c2004. 452 p.

KO, J.; PICCINNI, G. Characterizing leaf gas exchange responses of cotton to full and limited irrigation conditions. **Field Crops Research**. v.112, p.77-89, 2009.

KONRAD, M. L. F.; SILVA, J. A. B.; FURLANI, P. R.; MACHADO, E. C. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em seis cultivares de cafeeiro sob estresse de alumínio. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 3, p. 339-347, 2005.

KRAMER, P. J. & BOYER, J. S.. **Water relations of plants and soils**. Academic Press, New York, 1995.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos : Rima, 2006.

LAUER, M. J. & BOYER, J. S. Internal CO<sub>2</sub> measured directly in leaves. Abscisic acid and low leaf water potential cause opposing effects. **Plant Physiology**. v.98, p.1310-1316, 1992.

LAWLOR, D.W. The effects of water deficit on photosynthesis. In: Smirnoff, N. (ed). **Environmental and plant metabolism-flexibility and acclimation**. Bios Scientific Publisher, Oxford. p. 129-160, 1995.

LECHINOSKI, Alessandro *et al.* Influência do estresse hídrico nos teores de proteínas e aminoácidos solúveis totais em folhas de Teca (*Tectona grandis* L. f.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre. v.5, p.927-929, 2007.

LIM, P. O.; KIM, H. J.; NAN, H. G. leaf senescence. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 58, n. 1, p. 115-136, 2007.

LOKA, D. D.; OOSTERHUIS D. M.; RITCHIE G. L. W. Water-Deficit Stress in Cotton. In:**STRESS PHYSIOLOGY IN COTTON**. OOSTERHUIS, M D., Cordova,,Tennessee, U.S.A. . p.37 – 73. 2011.

LUDLOW, M.M., AND R.C. MUCHOW. A critical evaluation of traits for improving crop yields in water-limited environments. **Adv. Agronomy**. v.43, p.107–153, 1990.

MACHADO, R. S.; RIBEIRO, R. V.; MARCHIORI, P. E. R.; MACHADO, D. F. S. P.; Eduardo Caruso MACHADO, E. C.; e LANDELL, M. G. A. Respostas biométricas e fisiológicas ao deficit hídrico em cana-de-açúcar em diferentes fases fenológicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n.12, p.1575-1582, 2009.

MAGALHÃES FILHO, J. R.; AMARAL, L. R.; MACHADO, D. F. S. P.; MEDINA, C. L.; MACHADO, E. C. Deficiência hídrica, trocas gasosas e crescimento de raízes em laranja 'valência' sobre dois tipos de porta-enxerto. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 1, p. 75-82, 2008.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, **Brasil projeções do agronegócio 2010/2011 a 2020/2021**, 2011.

MARSHALL, J.G., DUMBROFF, E.B. Turgor regulation via cell wall adjustment in white spruce. **Plant Physiology**, v. 119, p. 313-319, 1999.

MARIANATO, R.; LIMA, C.A.S. Irrigação do algodoeiro. **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, v.8, n. 92, p. 75-81, 1982.

MASSACCI, A.; NABIEV, S. M.; PIETROSANTI, L.; NEMATOV, S. K.; CHEMIKOVA, T. N. THOR, K.; LEIPNER, J.; Response of the photosynthetic apparatus of cotton (*Gossypium hirsutum*) to the onset of drought stress under field conditions studied by gas-exchange analysis and chlorophyll fluorescence imaging. **Plant Physiology and Biochemistry**. v.46, p.189e195, 2008.

MAO, Z.; PAIVA, R.; KRIZ, A.; JUVIK, J. Dehydrin gene expression in normal and viviparous embryos of *Zea mays* during seed development and germination. **Plant Physiology and biochemistry**. v.33, p.649–653, 1995.

MARTINS, E. A. C., FILHO P.R. M. MECANISMOS DE EXPRESSÃO GÊNICA EM EUCARIOTOS: **Revista da biologia**, v.4, P. 1-5, 2010.

MEDEIROS, J. C.; AMORIM NETO, M. S.; BELTRÃO, N. E. M.; FREIRE, E. C.; NOVAES FILHO, M. B.; GOMES, D. C. **Zoneamento para a cultura do algodão no Nordeste. II. Algodão herbáceo**. Campina Grande: (EMBRAPA-CNPA. Boletim de Pesquisa, 35). 1996.

MENESES, C. H. S. G.; LIMA, L. H. G. M.; LIMA, M. M. A.; Vidal M. S. ASPECTOS GENÉTICOS E MOLECULARES DE PLANTAS SUBMETIDAS AO DÉFICIT HÍDRICO. **Rev. bras. ol. Fibras**, v.10, p.1039-1072, 2006.

McMICHAEL B. L.; OOSTERHUIS D. M.; ZAK J. C., Stress Response in Cotton Root Systems. In:**STRESS PHYSIOLOGY IN COTTON**. Cordova,,Tennessee,, p. 97 – 112, 2011.

MOONS, A., BAUW, G., PRINSEN, E., VAN MONTAGU, M. AND VAN DER, S. D. Molecular and physiological responses to abscisic acid and salts in roots of salt sensitive and salt-tolerant Indica rice varieties. **Plant Physiology**. v.107, p.177–186, 1995.

MORRIS, P.C., KUMAR, A., BOWLES, D.J. AND CUMING, A.C. Osmotic stress and abscisic acid induce expression of the wheat em genes. **Eur. J. Biochem**. v.190, p.625-630, 1990.

NEPOMUCENO, A.L., D.M. Oosterhuis, and J.M. Stewart. Physio logical response of cotton leaves and roots to water deficit induced by polyethylene glycol. **Environ. Exp. Bot**. v.40, p.29–41, 1998.

NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER N.; FARIAS J. R. B.; OYA T. Tolerância à seca em plantas: Mecanismos fisiológicos e moleculares. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** – n. 23, p. 12 – 18, 2001.

OSMOND, C. B., WINTER, K. & ZIEGLER, H. Functional significance of different pathways of CO<sub>2</sub> fixation in photosynthesis. **Physiological plant ecology II**. v.12, p479-547, 1982.

PARK, W.; SCHEFFLER, B. E.; BAUER, CAMPBELL,P. J.: Genome-wide identification of differentially expressed genes under water deficit stress in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **BMC Plant Biology**. v.12, p 90, 2012.

PAYTON, P.; KOTTAPALLI, K. R.; KEBEDE, H.; MAHAN, J. R.; WRIGHT, R. R.; ALLEN, R. D.; Examining the drought stress transcriptome in cotton leaf and root tissue. **Biotechnol Lett**. v.33, p.821-828, 2011.

PETTIGREW, W.T. Moisture deficit effects on cotton lint yield, yield components, and boll distribution. **Agronomy Journal**. v.96, p.377-383, 2004.

PIMENTEL, C. A relação da planta com a água. **Seropédica**, RJ: Edur. 191p, 2004.



PLUMBE, A.M. & WILLMER, C.M. Phytoalexins, water-stress and stomata. III. The effects of some phenolic, fatty acids and some other compounds on stomatal responses. **New Phytology**, v.103, p.156-162, 1986.

QUIN, X.; ZESSVAART, J. A. D. The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. **PLANT BIOLOGY**.v.96, p. 15354 – 15361, n.26, 1999.

RIERA, M. et al The genetics of adaptative responses to drought stress: abscisic aciddependent and abscisic acid-independent signalling components. **Physiologia Plantarum**, v. 123, n. 2, p.111 – 119, 2005.

RODRIGUEZ, J.L. & DAVIES, W.J. The effects of temperature and ABA on stomata of *Zea mays* L. **Journal of Experimental Botany**, v.33, p.977-987, 1982.

ROSOLEM, C.A. Ecofisiologia emanejo cultural do algodoeiro. **ENCARTE TÉCNICO**, n. 95, p. 1 – 9, 2001.

SALAMONI, Adriana Tourinho. **Apostila de aulas teóricas de Fisiologia Vegetal**. Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria. sem.2, 2008.

SANTOS, R. F. E CARLESSO R. DÉFICIT HÍDRICO E OS PROCESSOS MORFOLÓGICO E FISIOLÓGICO DAS PLANTAS. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.2, n.3, p.287-294, 1998.

SCALON, S. de P. Q.; MUSSURY R. M.; EUZÉBIO V. L. de MELLO; KODAMA F. M.; MISSMANN C. ESTRESSE HÍDRICO NO METABOLISMO E CRESCIMENTO INICIAL DE MUDAS DE MUTAMBO (*Guazuma ulmifolia* Lam.), **Revista Ciência Florestal**, v.21, n.4,p. 655-662, 2011.

SEO, M.; KOSHILBA, T. Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. **TRENDS in plant Science**. v.7, n.1, 2002.

SETIN, D. W. **Porta-enxertos múltiplos de limoeiro ‘cravo’ e citrumeleiro ‘swingle’ em laranjeira ‘valência’**. Campinas, 2007. 62f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agrônômico de Capinas, Campinas, 2007.

SETTER TL, YAN J, WARBURTON M, RIBAUT JM, XU Y, SAWKINS M, BUCKLER ES, ZHANG Z, GORE MA: Genetic association mapping identifies single nucleotide polymorphisms in genes that affect abscisic acid levels in maize floral tissues during drought. **J Exp Bot** v.62, n.2, p.701–716, 2011.

SHAMIM, A.; RASHID, B; RAHMAN, S; HUSNAIN. EXPRESSION OF DROUGHT TOLERANCE IN TRANSGENIC COTTON. **Science Asia**. V.39, p.1–11, 2013.

SHATIL-COHEN A, ATTIA Z, MOSHELION M: Bundle-sheath cell regulation of xylem-mesophyll water transport via aquaporins under drought stress: a target of xylem-borne ABA? **Plant** , n.67, v.1, p.72–80, 2011.

SHIH, M-D.; HOEKSTRA, F. A.; HSING, Y-I. **Late Embryogenesis Abundant Proteins**, Advances in botanical Research, v.48, P.212-255, 2008.

SOUSA, E.B. M.; **Indicadores Fisiológicos para Seleção de Plantas de Algodão Herbáceo Tolerante à seca**. Mestrado em botânica, Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco, 90.f, 2008.

SRIVASTAVA, L. M; Vegetative storage protein, tuberization, senescence and abscission. In: **Planta growth and development: hormones and environment**. Oxford: Academic Press, Capítulo 20, p. 473 – 520, 2002.

STOLF, R. **IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS COM TOLERÂNCIA À SECA EM SOJA ATRAVÉS DE MICROARRANJOS DE DNA E PCR EM TEMPO REAL**. JABOTICABAL. 121f. Tese para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”, 2007.

SUASSUNA, J. F. **TOLERÂNCIA DE GENÓTIPOS DE CITROS AO ESTRESSE HÍDRICO NA FASE DE FORMAÇÃO DE PORTA-ENXERTO**. Campina Grande. 2011. p.96, Dissertação de mestrado. Programa de pós-graduação em engenharia agrícola, área de concentração irrigação e drenagem, UNVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 4ª ed, Porto Alegre: ArtMed, 2009. 828p.

TORRES F. O novo algodão do semiárido. **Revista inovação em pauta**, n.7, p. 45–49, 2009.

TYREE, M. T. The cohesion-tension theory of sap ascent: current controversies. **J. Exp. Bot.**, v.48, p.1753-1765, 1997.

UNO, Y.; FURIHATA, T.; ABE, H.; YOSHIDA, R.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, p. 11632–11637, 2000.

WANG, W.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A.; Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**. v. 218, p. 1-14, 2003.