



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

LUANA CAMILLA CORDEIRO BRAZ

**EXPRESSÃO DE VARIANTES DE AQUAPORINAS EM ALGODÃO
SUBMETIDO A ESTRESSE SALINO**

**CAMPINA GRANDE-PB
2019**

LUANA CAMILLA CORDEIRO BRAZ

**EXPRESSÃO DE VARIANTES DE AQUAPORINAS EM ALGODÃO SUBMETIDO A
ESTRESSE SALINO**

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: Agrobioenergia e Agricultura Familiar

Orientadora: Prof^a Dr^a Roseane Cavalcanti dos Santos

**CAMPINA GRANDE-PB
2019**

É expressamente proibido 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 do trabalho.

B827e Braz, Luana Camilla Cordeiro.
Expressão de variantes de aquaporinas em algodão submetido a estresse salino [manuscrito] / Luana Camilla Cordeiro Braz. - 2019.
48 p. : il. colorido.
Digitado.
Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2019.
"Orientação : Profa. Dra. Roseane Cavalcanti dos Santos, Embrapa Algodão."
1. Gossypium hirsutum L.. 2. Cotonicultura. 3. Salinidade.
4. Aquaporinas vegetais. I. Título

21. ed. CDD 633.51

LUANA CAMILLA CORDEIRO BRAZ

**EXPRESSÃO DE VARIANTES DE AQUAPORINAS EM ALGODÃO
SUBMETIDO A ESTRESSE SALINO**


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: Agrobioenergia e Agricultura Familiar

Aprovada em 28 de fevereiro de 2019


BANCA EXAMINADORA:



**Prof.ª Liziane Maria de Lima
Dra. Biologia Molecular- Embrapa Algodão**



**Prof. Igor Luiz Vieira de Lima Santos
Dr. Biotecnologia - UFCG**



**Prof.ª Roseane Cavalcanti dos Santos
Dra. Biologia Molecular - Embrapa Algodão
(Orientadora)**

A meus avós,
Alzira (*in memoriam*), João Cordeiro (*in memoriam*),
Carmelita e José Henrique.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e por guiar meus passos possibilitando concluir mais essa etapa;

A meus pais, Francisco e Socorro, e meus irmãos, Liliane e Lucas, por todo amor, carinho e cuidado todos os anos de minha vida; por terem me compreendido, apoiado e aconselhado principalmente nas etapas mais difíceis dessa jornada;

A toda a minha família, pelo incentivo, em especial minha madrinha e segunda mãe, Judite, e minha tia Helena e a meu namorado, Fabio Barbosa, por todo o carinho, apoio e compreensão nos momentos que estive distante;

À Prof^a Dr^a Roseane Cavalcanti dos Santos, pela orientação na condução desta pesquisa; por todos os conselhos que levarei para a vida e por instigar o raciocínio científico e a busca do conhecimento, contribuindo enormemente na minha formação acadêmica e pessoal;

À Prof^a. Dr^a. Liziane Maria de Lima e ao Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos, membros da banca examinadora, pelas importantes contribuições no aprimoramento deste trabalho;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias (UEPB/Embrapa Algodão), pelas contribuições de cada um para minha formação profissional, acadêmica e pessoal;

Aos Profs. Dr. Carlos H. S. G. Meneses (UEPB) e Dr. Pedro Dantas Fernandes (UFCG), pelo suporte no uso dos equipamentos necessários para execução da pesquisa;

À equipe e funcionários do laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão, pela ajuda na execução dos experimentos e pelo acolhimento, apoio, companheirismo e amizade, em especial: Terezinha, Fábiana, Carliane, Daniela, Aline, Allef, Wellisson, Jean, Vandré, Bárbara, Sabrina, Marília e Fátima;

Aos demais membros da equipe de Biotecnologia da Embrapa Algodão, que contribuíram direta ou indiretamente para realização desse trabalho;

A equipe gestora do IFPB – Campus Esperança, nas pessoas de Vanyr, Arlindo e Bruno, pelo apoio na realização dessa etapa, permitindo ajustes de horários para integralização das disciplinas e realização desta pesquisa;

Aos demais colegas do IFPB – Campus Esperança pela amizade, apoio e boas conversas durante esse período, em especial: Suely, Geniele, Izak, Hozana, Genard, Ivã, Alan, Fábio, André e Ramon;

Aos colegas da turma 2017 do PPGCA que caminharam em conjunto durante essa jornada, cada um conquistou seu lugar especial: Bárbara, Kathiane, Josivaldo, Itallo, Joelma, Lidiane, Renato, Ruan e Fabrícia;

Aos amigos mais recentes, Karla, Nádson e Aninha, e às de mais longa data, Izabela, Rosilândia e Gersia, pela amizade, momentos compartilhados e apoio contínuo, ainda que a distância, durante mais essa etapa da minha vida;

Por fim, agradeço às instituições UEPB e Embrapa Algodão pela oportunidade e pelo custeio da pesquisa.

“ I went looking for my dreams outside myself and discovered: it’s not
what the world holds for you, it’s what you bring to it. ”

(Lucy Maud Montgomery)

RESUMO

A salinização provoca sérios danos a várias regiões agrícolas no mundo, principalmente as de clima semiárido, prejudicando a produtividade das culturas. O algodão (*Gossypium hirsutum* L.) é uma Malvaceae com grande variabilidade genética na resposta ao estresse salino. A identificação de genótipos tolerantes a salinidade é um alvo dinâmico nos trabalhos de melhoramento e a seleção é frequentemente baseada no fenótipo das plantas. Marcadores moleculares se constituem em ferramentas confiáveis para auxiliar nesses processos de seleção. Sabe-se que as aquaporinas (AQPs) são proteínas-canal com papel fundamental nas relações hídricas e na tolerância a estresses ambientais. As plantas apresentam fina regulação do transporte de água por meio da atividade das AQPs. Neste trabalho adotou-se três variantes de AQPs com objetivo de avaliar a tolerância ao estresse salino, baseando-se na expressão de transcritos por qPCR. Adicionalmente, descritores fisiológicos foram adotados para validar os achados moleculares. Sete genótipos de algodão foram submetidos a estresse salino (NaCl 190 mM), iniciado no estágio V3 (21 dias após emergência), por 72 h. Ao final do estresse, tecidos radiculares foram coletados para extração de RNA total, seguido de síntese de cDNA e análises de qPCR. Paralelamente, foram usadas folhas completamente expandidas para registro das trocas gasosas, com uso do IRGA (Analisador de gás por infravermelho) e mensuração do conteúdo relativo de água. A massa seca da parte aérea também foi avaliada. Três conjuntos de *primers* específicos foram usados, desenhados a partir de sequências depositadas no NCBI de *GhPIP1;1*, *GhTIP2;1* e *GhSIP1;3*. O gene *GhPP2A* foi usado como referência. A partir do padrão de expressão dos transcritos de AQPs, foi verificado que os genótipos adaptados ao semiárido (BRS Seridó, 7MH, CNPA MT 2009 152 e BRS 416) revelaram repressão das AQPs, especialmente de *GhPIP1;1* e *GhTIP2;1*, cuja ação é caracterizada como tolerância a salinidade. Os resultados de trocas gasosas, conteúdo relativo de água e massa seca consubstanciaram os resultados moleculares, o que fornece suporte para atestar que as variantes *GhPIP1;1*, *GhTIP2;1*, localizadas na membrana plasmática e vacúolos, respectivamente, podem ser adotadas como marcadores confiáveis para a identificação de genótipos de algodão tolerantes ao estresse salino.

Palavras-chave: *Gossypium hirsutum* L., Salinidade, Trocas gasosas, MIPs.

ABSTRACT

Salinization leads to several damages to agricultural regions at worldwide, especially in semiarid climate, reducing the crop yields. Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) is a Malvaceae with wide genetic variability to salt stress. The identification of salinity tolerant genotypes in a breeding program is a dynamic target, due to selection is often based on plant phenotypes. Molecular markers are reliable tools to aid in these selection processes. It is known that aquaporins (AQPs) are channel proteins with a fundamental role in water relations and tolerance to environmental stresses. The plants have fine regulation of water transport through the activity of AQPs. In this work three AQP subtypes were adopted in order to evaluate the tolerance to saline stress, based on the expression of transcripts by qPCR. Additionally, physiological descriptors were adopted to validate the molecular findings. Seven cotton genotypes were subjected to saline stress (190 mM NaCl), initiated at V3 stage (21 days after emergence), during 72 h. At the end of stress, root tissues were collected for total RNA extraction, followed by cDNA synthesis and qPCR analyzes. At the same time, full expanded leaves were used to record the gas exchange, using IRGA, and measuring the relative water content. The dry matter of the shoots was also evaluated. Three sets of specific primers were used, drawn from NCBI sequences of *GhPIP1;1*, *GhTIP2;1* and *GhSIP1;3*. The *GhPP2A* gene was used as a reference. From the expression pattern of the AQPs transcripts, we found that the genotypes adapted to semiarid (BRS Seridó, 7MH, CNPA MT 2009 152 and BRS 416) revealed down regulation of AQP subtypes, mainly *GhPIP1;1* and *GhTIP2;1* whose action are characterized as tolerance to salinity. The results of gas exchanges, relative water content and dry matter were consistent with the molecular ones, which are supported to confirm that *GhPIP1;1* and *GhTIP2;1* located at plasma membrane and vacuoles, respectively, could be adopted as markers for identification of cotton genotypes with tolerance to salinity.

Keywords: *Gossypium hirsutum* L., Salt stress, Gas exchanges, MIPs.

LISTA DE ABREVIATURAS

A – Assimilação de CO₂

gs – Condutância estomática

C_i – Carbono interno

E – Transpiração

E_{iUA} – Eficiência instantânea do uso da água

E_{iC} – Eficiência instantânea de carboxilação

IRGA – Analisador de gás por infra-vermelho

MUSCLE – Algoritmo de alinhamento múltiplo de sequências

UPGMA – Método de agrupamento de pares usando médias aritméticas não ponderado

RT-qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa com transcrição reversa

MIP – *Major Intrinsic Proteins*

PIP – *Plasma membrane intrinsic proteins*

TIP – *Tonoplast intrinsic proteins*

NIP – *Nodulin-26 like intrinsic proteins*

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

SIP – *Small basic intrinsic proteins*

XIP – *Uncharacterized-intrinsic proteins*

EROs – Espécies reativas de oxigênio

RE – Retículo endoplasmático

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. <i>Primers</i> de variantes de aquaporinas usados para algodão | 24 |
| Tabela 2. Síntese das características agronômicas dos genótipos usados | 25 |
| Tabela 3. Relação das espécies usadas para prospecção de variantes de AQPs e o respectivo acesso das sequências obtidas no NCBI | 31 |
| Tabela 4. Resumo da análise de variância das variáveis de trocas gasosas registradas nos genótipos de algodão submetidos a 72 h de estresse salino (NaCl 190 mM) | 33 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Série histórica da área plantada (A), produção (B) e produtividade (C) do algodão no Brasil, nos eixos Norte/Nordeste e Centro/Sul (Safras 1976/77 a 2018/19) | 17 |
| Figura 2. Representação da estrutura tridimensional das aquaporinas. A: Representação das seis porções transmembrana (1-6) e das cinco regiões de <i>loop</i> (A-E) destacando os dois motivos NPA (Asparagina-Prolina-Alanina) que formam um filtro no centro do poro; B: AQP funcional representada em sua localização na membrana | 20 |
| Figura 3. Distância genética entre sequências de variantes de AQPs em plantas herbáceas, pelo método UPGMA. Os comprimentos dos ramos representam unidades das distâncias evolutivas. A: <i>PIP1s</i> , B: <i>TIP2s</i> , C: <i>SIPs</i> | 30 |
| Figura 4. Alinhamento das sequências das variantes de AQPs, em plantas herbáceas. Setas flanqueando as sequências de <i>Gossypium</i> indicam as regiões usadas para desenho dos <i>primers</i> . A: <i>PIP1s</i> , B: <i>TIP2s</i> , C: <i>SIPs</i> | 31 |
| Figura 5. Aspecto das plantas após 72 h de estresse salino. G1: BRS Seridó; G2: CNPA 7MH; G3: BRS Acácia; G4: FMT 701; G5: CNPA MT 2009 152; G6: BRS 416; G7: DP 555 BGRR; C: controle; S: estresse salino | 32 |
| Figura 6. Dados de temperatura e umidade relativa do ar registradas em casa de vegetação durante a execução do experimento de estresse salino | 32 |
| Figura 7. Média das trocas gasosas registrada nas cultivares de algodão submetidas a salinidade por 72h. A: Fotossíntese (<i>A</i>) – $\mu\text{mol de CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, B: Transpiração (<i>E</i>) – $\text{mmol de H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$; C: Carbono interno (<i>C_i</i>) – $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$; D: Condutância estomática (<i>g_s</i>) – $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, E: Eficiência instantânea de carboxilação (<i>E_{iC}</i>) – $[(\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}) (\mu\text{mol mol}^{-1})^{-1}]$; F: Eficiência instantânea do uso da água (<i>E_{iUA}</i>) – $[(\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1})(\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1})^{-1}]$. Marcados com (*) diferem estatisticamente do tratamento controle pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) | 34 |
| Figura 8. Massa seca de parte aérea (MSPA) (A) e conteúdo relativo de água nas folhas (CRA) (B), após 72 h de estresse salino. *- difere estatisticamente do controle (Tukey, $p < 0,05$) | 35 |

Figura 9. Expressão relativa dos transcritos de *GhPIP1;1*, *GhTIP2;1* e *GhSIP1;3* em genótipos de algodoeiro submetidos a salinidade por 72 h durante a fase inicial de crescimento

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1. Objetivo geral | 16 |
| 1.2. Objetivos específicos | 16 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 17 |
| 2.1. Aspectos gerais da cotonicultura no Brasil | 17 |
| 2.2. Aquaporinas vegetais | 20 |
| 2.2.1. <i>Estrutura e função</i> | 20 |
| 2.2.2. <i>Regulação</i> | 23 |
| 2.3. Respostas fisiológicas a salinidade | 25 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 26 |
| 3.1. Análise <i>in silico</i> das variantes de AQP_s em plantas herbáceas para confecç de primers | 26 |
| 3.2. Recursos genéticos e condução dos experimentos | 27 |
| 3.3. Variáveis fisiológicas | 27 |
| 3.4. Expressão de transcritos de AQP_s | 28 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 30 |
| 4.1. Homologia das variantes de AQP_s em plantas herbáceas | 30 |
| 4.2. Trocas gasosas das plantas de algodão sob estresse salino | 34 |
| 4.3. Transcritos de aquaporinas em plantas sob estresse salino | 38 |
| 5. CONCLUSÃO | 42 |
| REFERÊNCIAS | 43 |

1. INTRODUÇÃO

Estresses abióticos são ameaças sérias para agricultura em várias partes do mundo. A salinidade, em especial, ocorre em várias regiões em função das mudanças climáticas e do manejo inadequado. De acordo com Wang et al. (2003), a salinização dos solos pode se alastrar em mais de 50% de todas as terras aráveis até o ano de 2050.

Em nível fisiológico, o estresse desencadeia uma ampla gama de respostas nas plantas, desde alterações na expressão gênica e metabolismo celular até mudanças na taxa de crescimento e produtividade das culturas podendo causar perdas de 65–87% dependendo da cultura (BUCHANAN et al., 2015). A salinidade se manifesta inicialmente como estresse osmótico, resultando na ruptura da homeostase na distribuição de íons na célula, seguido de estresse oxidativo, com a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) que podem provocar danos às moléculas (WANG et al., 2003).

As plantas promovem mecanismos para mitigar o estresse osmótico e oxidativo, reduzindo a perda de água e buscando maximizar a absorção, a partir de variações na condutância estomática, síntese de osmorreguladores e incremento na atividade de enzimas antioxidativas (RODRIGUES et al., 2016; DUTRA et al., 2018). No caso da salinidade, as plantas minimizam os efeitos nocivos do sódio (Na^+) pela sua exclusão dos tecidos foliares e pela compartimentalização nos vacúolos (DEINLEIN et al., 2014; PENG et al., 2016).

De acordo com Wang et al. (2003), a elucidação dos mecanismos da tolerância ao estresse abiótico baseia-se na expressão de genes específicos relacionados ao estresse, que incluem três categorias principais: (i) os que estão envolvidos em cascatas de sinalização e no controle transcricional, tais como MAPKs, fosfolipases e fatores de transcrição como MYC/MYB, HSF e DREB; (ii) os que funcionam diretamente na proteção de membranas e proteínas, tais como chaperonas, proteínas de choque térmico (HSPs), proteínas abundantes na embriogênese tardia (LEA), síntese de osmoprotetores e sequestradores de radicais livres e (iii) os que estão envolvidos na captação e transporte de água e íons, tais como aquaporinas e transportadores de íons.

As plantas apresentam uma grande necessidade de regulação precisa do transporte de água para se adaptar às flutuações ambientais. Isso se deve principalmente à sua natureza sedentária e ao grande número de compartimentos intracelulares. Essa pode ser a razão do grande número de genes de aquaporinas encontrados em espécies vegetais (AFZAL et al., 2016).

O algodão (*Gossypium hirsutum* L.) é uma *Malvaceae* de grande importância socioeconômica que movimenta anualmente cerca de 12 bilhões de dólares no mercado mundial.

O Brasil figura entre os maiores produtores e exportadores (ICAC, 2017), beneficiado pelas cultivares melhoradas que garantem elevada produtividade e padrão de fibras aceitáveis pelos vários segmentos da indústria têxtil. Apesar disso, o melhoramento do algodoeiro enfrenta grandes desafios diante das dinâmicas mudanças ambientais, que exigem cada vez mais procedimentos técnicos de modo a identificar tipos que se adaptem às diferentes ecografias do país. Atualmente, mais de 80% do manejo de algodão no Brasil ocorre na região dos cerrados, adotando-se cultivares robustas, com múltipla tolerância a doenças, algumas das quais já piramidadas com genes exógenos que conferem resistência a herbicida e a lepidópteros (FREIRE et al., 2015).

Embora se detenha informações dos danos da salinidade na produtividade da cultura, há ainda carência de informação a respeito da performance desses materiais diante de estresses ambientais, como a salinidade, apesar das várias características agronômicas (SOARES et al., 2018).

Várias ferramentas bioquímicas e moleculares se encontram disponíveis na literatura para auxiliar o melhorista na identificação de tolerância a estresses abióticos (GUO et al., 2015; LIAN et al., 2016; PENG et al., 2016; DUTRA et al., 2018). O papel dos metabólitos e de seus precursores em plantas sob estresse celular tem facilitado o entendimento da tolerância e auxiliado nos procedimentos de seleção das plantas, ainda em estado jovem, abreviando as respostas necessárias nos trabalhos de melhoramento e minimizando posteriores custos no manejo das atividades experimentais.

Esse trabalho focalizou na análise de transcritos de aquaporinas em plantas de algodão submetidas a 72 h de estresse salino. Adicionalmente, análise das trocas gasosas e da massa seca foram realizadas para consubstanciar os achados moleculares.

1.1. Objetivo geral

Esse trabalho teve como objetivo avaliar a expressão de transcritos de três variantes de aquaporinas em algodão e validar o uso como marcador molecular que auxilie os programas de melhoramento na identificação de genótipos tolerantes a estresse salino.

1.2. Objetivos específicos

- Realizar análise de homologia entre variantes de aquaporinas de plantas herbáceas para desenho de *primers*;

- Avaliar a resposta fisiológica de genótipos de algodão submetidos a salinidade na fase inicial de crescimento, por meio da análise de trocas gasosas, conteúdo relativo de água e crescimento;
- Analisar a expressão de três variantes de aquaporinas em genótipos de algodão submetidos a salinidade por meio de RT-qPCR;
- Indicar genótipos promissores que detenham tolerância a estresse salino.

2. REVISÃO DE LITERATURA

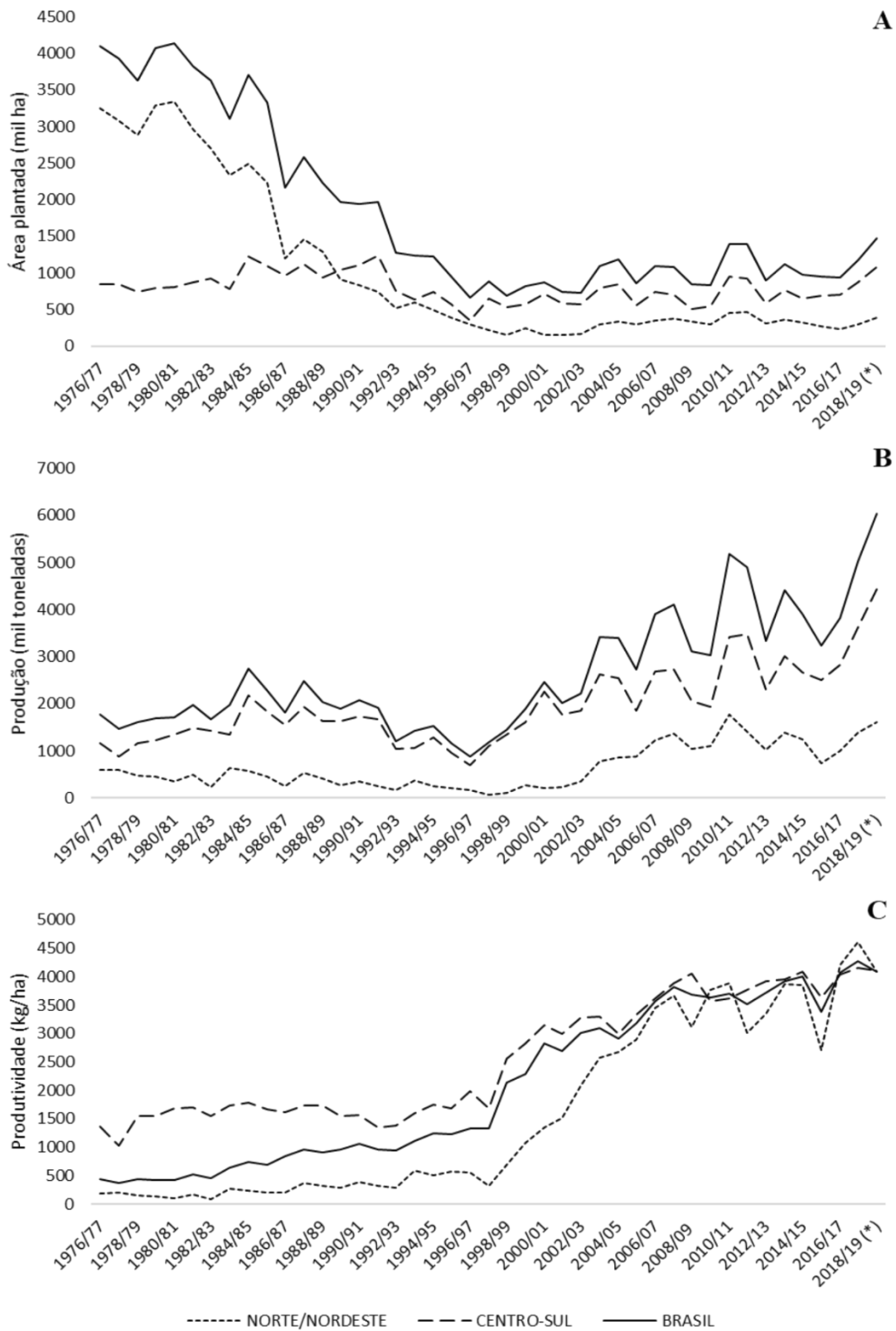
2.1. Aspectos gerais da cotonicultura no Brasil

O algodoeiro pertence ao gênero *Gossypium*, que contém mais de 50 espécies identificadas. As espécies mais conhecidas são *G. hirsutum* L., *G. barbadense* L., *G. arboreum* L. e *G. herbaceum* L., sendo a primeira de maior valor comercial e uma das principais *commodities* internacionais, representando mais de 90% do algodão cultivado em todo o mundo (LI et al., 2017). Além de ser destinada a indústria têxtil, *G. hirsutum* tem aproveitamento completo; o caroço é utilizado para produção de óleos, que são matéria-prima para a indústria oleoquímica, e os resíduos da extração – torta de algodão – alimentam as indústrias de farelo e ração (NEVES; PINTO, 2012).

O comércio mundial do algodão movimentava anualmente cerca de US\$ 12 bilhões e envolve mais de 350 milhões de pessoas em sua produção, desde as fazendas até a logística, descaroçamento, processamento e embalagem (ABRAPA, 2017). Em 2018, o Brasil alcançou a posição de quarto maior produtor mundial de algodão, atrás apenas da China, Índia e Estados Unidos (NCC, 2019). A área plantada na safra 2018/2019 foi de 1,4 milhões de ha, com uma produção estimada em 6 milhões de toneladas (CONAB, 2019).

Atualmente, os cultivos brasileiros de algodão se localizam principalmente na região dos Cerrados do Centro-Oeste (aproximadamente 70% da área plantada) e dos estados da Bahia, Maranhão e Piauí (25% da área plantada) (CONAB, 2019), o que representa uma mudança no cenário produtivo anterior a década de 1980, no qual o algodão era cultivado principalmente nas regiões do Nordeste e Sudeste. Na Figura 1A se apresenta uma série histórica da área cultivada de algodão no Brasil, nos eixos Norte/Nordeste e Centro/Sul. Verifica-se que apesar de ter havido forte redução da área plantada, a produção não foi afetada (Figura 1B) devido ao aumento de produtividade (Figura 1C), beneficiada pelas atuais cultivares, com patamares médios de 4.1 t/ha, na safra 2018/19, contra 0,43 t/ha, na safra 1976/77.

Figura 1. Série histórica da área plantada (A), produção (B) e produtividade (C) do algodão no Brasil, nos eixos Norte/Nordeste e Centro/Sul (Safras 1976/77 a 2018/19).



Fonte: CONAB (2019)

No aspecto de manejo, a cotonicultura é conduzida na região dos cerrados, onde os produtores adotam sistemas de produção altamente tecnificados, e no semiárido, onde a lavoura é conduzida, na maioria, por médios e pequenos produtores. Estes adotam manejo mais agroecológico, cultivares precoces e de fibra colorida, possibilitando agregação de renda, especialmente nas propriedades que vivem da agricultura familiar (ARAÚJO FILHO et al., 2013).

A cotonicultura na região Nordeste teve início no Maranhão e se expandiu rapidamente pelos outros estados, tornando o Nordeste o maior produtor da fibra do país, posição que ocupou até o início da década de 1980, tornando a economia algodoeira como principal fonte de acumulação de riqueza, na região. Na ocasião, o Nordeste era responsável por 70% da área cultivada e produzia um algodão de fibra longa e de boa aceitação no mercado, com poucos defensivos agrícolas e mão de obra familiar (ARAÚJO FILHO et al., 2013; CONAB, 2019).

Após a década de 1980, esse quadro se alterou como resultado de diversos fatores conjunturais e agrícolas, incluindo a chegada do bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman; Coleoptera: *Curculionidae*), que levaram a lavoura a uma derrocada no país, com consequente dependência do produto no mercado nacional (AZAMBUJA; DEGRANDE, 2014). O soerguimento da cotonicultura se deu a partir do ano de 2000, com a transição do polo de produção para os Cerrados de Mato Grosso, Bahia, Goiás e Mato Grosso do Sul, que atualmente respondem por mais de 90% da produção brasileira, advindas principalmente das cultivares geneticamente modificadas (GM) (ISAAA, 2016; CONAB, 2019). No semiárido nordestino existem sistemas de produção alternativos, a maioria inclui a adoção de cultivares de fibras coloridas com manejo agroecológico. A adoção de cultivares GM, embora ainda em pequena escala, representa uma oportunidade para redução de custos, especialmente para controle de pragas.

Atualmente há 180 cultivares comerciais de algodão no Registro Nacional de Cultivares (www.agricultura.gov.br/guia-de-servicos/registro-nacional-de-cultivares-rnc) desenvolvidas por empresas nacionais, como Embrapa, Fundação Matogrossense (FMT) e Instituto Matogrossense do Algodão (IMAMT), e multinacionais, como Bayer, Delta Pine, Syngenta e Dow Agrosiences, entre outras. Das cultivares registradas, 81 são geneticamente modificadas, contendo genes para resistência a herbicidas (glifosato e glufosinato de amônio) e/ou insetos lepidópteros. A maioria foi desenvolvida para manejo nos cerrados do Centro Oeste e Nordeste, apresentando características de alta produtividade e qualidade de fibra de acordo com os padrões do mercado, além de resistência a doenças e nematóides.

2.2. Aquaporinas vegetais

As aquaporinas (AQPs) são proteínas-canal pertencentes à superfamília MIP (*Major Intrinsic Protein*) que desempenham um papel importante nas relações hídricas das plantas (KAPILAN et al., 2018). As MIPs formam uma superfamília altamente conservada de proteínas transmembrana presentes em quase todos os organismos vivos. Mais de 800 MIPs já foram identificadas em diversas espécies de archaeas, bactérias, protozoários, leveduras, insetos, mamíferos e plantas (AFZAL et al., 2016).

A regulação da atividade de AQPs vegetais parece estar intimamente ligada a expressões de tolerância da planta a estresses bióticos e abióticos. Essas proteínas desempenham papéis críticos no controle da transferência de água para dentro e para fora das células vegetais, o que é crucial na manutenção da viabilidade celular e no transporte de água entre os diferentes tecidos da planta. Como resultado, a atividade de AQPs influencia uma série de processos fisiológicos, incluindo absorção de água pelas raízes, saída de água do xilema, abertura estomática, trocas gasosas e carregamento no floema (SHEKOOFA; SINCLAIR, 2018).

A primeira aquaporina vegetal caracterizada é uma proteína da membrana do vacúolo em *Arabidopsis*, denominada γ -TIP (*AtTIP1;1*), cuja capacidade de transportar água foi demonstrada por expressão heteróloga em oócitos de *Xenopus* (MAUREL et al., 1993; GOMES et al., 2009). Desde então, várias outras foram identificadas em plantas, sendo 35 em *A. thaliana* (JOHANSON et al., 2001), 31 em milho (*Zea mays*) (CHAUMONT et al., 2001), 33 em arroz (*Oryza sativa*) (SAKURAI et al., 2005), 75 em soja (*Glicine max*) (FENG et al., 2019), 71 em algodão (*G. hirsutum*) (PARK et al., 2010) e 41 em sorgo (*Sorghum bicolor*) (REDDY et al., 2015).

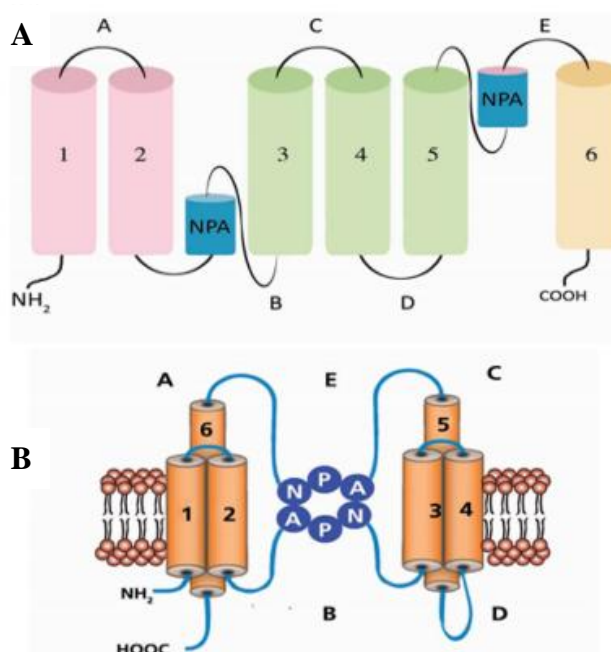
A clonagem de alguns desses genes para estudos de função demonstrou o importante papel no movimento de água através de membranas (GOMES et al., 2009), uma vez que elas facilitam o transporte passivo de água, em ambas as direções, seguindo o gradiente potencial. Além disso, algumas MIPs são capazes de transportar outras moléculas além da água, como glicerol, CO₂, ureia, amônia, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), boro, silício, arsenito, antimônio, ácido láctico e O₂ (KAPILAN et al., 2018).

2.2.1. Estrutura e função

Uma característica estrutural comum a todas as MIPs é que essas proteínas são formadas por seis porções transmembrana (α -hélices) que formam um poro e são conectadas por cinco

regiões de *loop* (A-E), com as porções N- e C-terminais voltadas para o citosol (Figura 2A). Muitas dessas proteínas são encontradas agrupadas em tetrâmeros. Os *loops* B e E são conservados e possuem natureza hidrofóbica, se estendendo para dentro do poro em ambos os lados da membrana. Além disso, esses loops contêm uma repetição de Asparagina-Prolina-Alanina, que consistem nos dois motivos NPA e formam um filtro no centro do poro (Figura 2B). Esses motivos são altamente conservados e extremamente importantes para manutenção da função das aquaporinas (KAPILAN et al., 2018). As MIPs possuem ainda um segundo filtro, formado por uma região ar/R (aromática/arginina), localizado na porção extra-citosólica, formando a região mais estreita do canal (LALOUX et al., 2018).

Figura 2. Representação da estrutura tridimensional das aquaporinas. A: Representação das seis porções transmembrana (1-6) e das cinco regiões de *loop* (A-E) destacando os dois motivos NPA (Asparagina-Prolina-Alanina) que formam um filtro no centro do poro; B: AQP funcional representada em sua localização na membrana.



. Fonte: Kapilan et al. (2018).

Além das diferentes especificidades para substrato, as MIPs possuem diferentes localizações e regulações transcricionais ou pós-traducionais. As AQPs de plantas superiores são classificadas em cinco subfamílias, baseando-se na sequência de aminoácidos e na localização na membrana, quer sejam: PIPs (*plasma membrane intrinsic proteins*), TIPs (*tonoplast intrinsic proteins*), NIPs (*nodulin-26 like intrinsic proteins*), SIPs (*small basic intrinsic proteins*) e XIPs (*uncharacterized-intrinsic proteins*) (KAPILAN et al., 2018).

No que diz respeito a localização celular, as proteínas PIPs estão presentes principalmente na membrana plasmática e as TIPs na membrana de vacúolos. As NIPs, que são homólogas próximas de *GmNOD26* abundantemente expressa em nódulos fixadores de nitrogênio, em espécies não-leguminosas podem estar localizadas tanto na membrana plasmática como em membranas intracelulares (GOMES et al., 2009). As SIPs localizam-se principalmente em membranas do retículo endoplasmático (LI et al., 2009).

As proteínas da subfamília PIP (*plasma membrane intrinsic proteins*) são geralmente mais expressas em órgãos caracterizados por altos fluxos de água (KAPILAN et al., 2018). As PIPs podem ainda ser divididas em isoformas PIP1 e PIP2, baseando-se nas sequências. Alguns estudos em oócitos de *Xenopus* têm demonstrado que as PIP2s têm maior capacidade de transporte de água, enquanto que muitas PIP1s são inativas ou tem baixa atividade isoladamente. Entretanto, a maior permeabilidade de água ocorre quando PIP1s e PIP2s são co-expressas em oócitos de *Xenopus*, o que permite a formação de tetrâmeros dessas duas isoformas aumentando a atividade de ambas (KAPILAN et al., 2018; LI et al., 2009).

As TIPs (*tonoplast intrinsic proteins*) são essenciais para o transporte intracelular de água e outras pequenas moléculas, tendo em vista que o vacúolo ocupa cerca de 90% do volume da maioria das células vegetais maduras. Além disso, TIPs são as proteínas mais abundantes na membrana dos vacúolos, auxiliam na alta permeabilidade de água que permite o ajustamento osmótico rápido. São, dessa forma, essenciais na manutenção da osmolalidade e turgor celular (GOMES et al., 2009).

As TIPs podem ser também divididas em algumas isoformas (TIP1, TIP2, TIP3, TIP4 e TIP5) que estão presentes em diferentes órgãos e tecidos e podem transportar outras moléculas além de água. Azad et al. (2016) inferiram pela análise *in silico* que as TIP1s de algodão podem transportar H₂O₂ e ureia e, além desses substratos, as TIP2s transportam também amônia.

As SIPs (*small basic intrinsic proteins*) constituem uma das mais novas subfamílias de MIPs identificadas, que ainda não estão bem caracterizadas em estrutura e função (KAPILAN et al., 2018). Essas proteínas são menores, básicas e bastante divergentes de outras MIPs. Possuem uma sequência incomum no motivo NPA do *loop* B e uma região N-terminal mais curta. Os primeiros experimentos demonstraram a localização de SIPs em membranas intracelulares, particularmente no retículo endoplasmático (RE). Dessa forma, acredita-se no papel das SIPs no movimento de água intracelular, participando na passagem de água pela membrana do RE, regulando tanto o volume do seu lúmem e a concentração de íons como a morfologia da organela (GOMES et al., 2009).

2.2.2. Regulação

Como todas as proteínas integrais de membrana, as aquaporinas tem o mRNA transcrito no núcleo, exportado pelos poros nucleares e traduzido no RE, onde as proteínas são co-traducionalmente inseridas na membrana do RE. Após a tradução, ocorre o transporte para suas respectivas membranas-alvo, nas quais a atividade das AQPs é modulada pela abertura e fechamento do canal, controlando a homeostase água/soluto nas células. Todo esse processo é sujeito a vários mecanismos regulatórios (LALOUX et al., 2018).

Numa visão geral, para o rápido controle do transporte de água através das MIPs estão envolvidas alterações pós-traducionais, que alteram a atividade, a abertura e a quantidade. Por exemplo, redução no pH pode induzir o fechamento, fosforilação ou desfosforilação alteram a abertura do canal. Realocação das proteínas, induzida por estresse ou hormônios, altera a sua quantidade, que também pode ser influenciada pelas vias de degradação da proteína (GOMES et al., 2009; LALOUX et al., 2018). Interessantemente, nas raízes de *Arabidopsis*, o peróxido de hidrogênio pode induzir a internalização de PIPs, reduzindo a condutividade hidráulica (GOMES et al., 2009).

Alterações na expressão dos transcritos de aquaporinas também estão envolvidas nas respostas adaptativas a fatores abióticos, incluindo seca, salinidade, baixas temperaturas, calor e ferimentos. A expressão AQP também é afetada por fitohormônios, incluindo ácido abscísico e giberelinas (KAPILAN et al., 2018). Muitos genes de AQPs podem ter perfil de *up* ou *down regulation*, dependendo da isoforma, da espécie e do tempo e intensidade do estresse.

Zhu et al. (2005) avaliaram os efeitos da salinidade e do ABA na expressão de MIPs de milho, durante 24 h. Transcritos de *ZmPIPs* e *ZmTIPs* foram reprimidos em 24 h após a adição de NaCl (200 mM) nas plantas cultivadas em meio hidropônico, enquanto que após 2 h no tratamento com menor concentração de sal (NaCl 100 mM) houve uma indução transiente de *ZmPIPs*. Os autores também observaram indução de *ZmPIP1;1*, *ZmPIP1;2* e *ZmPIP2;4* após 1 h da aplicação de 1 μ M de ABA. A cultivar usada no estudo foi a Helix, desenvolvida pela alemã Kleinwanzlebener Saatzucht (KWS Saat). Os autores não informam a natureza genética dela, com relação a tolerância a estresses ambientais, porém no estudo de Lohaus et al. (2000), que avaliaram a fisiologia e bioquímica dessa cultivar submetida a 100 mM de NaCl durante oito dias, a Helix se comportou como tolerante ao sal, visto que teve um impacto negativo no crescimento mas manteve a fotossíntese e não apresentou sintomas de toxicidade devido ao sal.

Diferentes respostas de AQPs ao déficit hídrico foram observadas por Lian et al. (2006) em arroz tolerante e sensível a seca quando submetidos a tratamento com PEG 20%. O nível de

proteína PIP aumentou acentuadamente em raízes de ambos os tipos após 10 h de tratamento com PEG. Porém o aumento da proteína em folhas foi observado apenas no arroz tolerante. Adicionalmente, os transcritos *OsPIP1;2*, *OsPIP1;3*, *OsPIP2;1* e *OsPIP2;5* foram induzidos nas raízes da planta tolerante e *OsPIP1;2* e *OsPIP1;3* nas folhas. No arroz sensível, os transcritos correspondentes permaneceram inalterados ou foram reprimidos.

Em *Arabidopsis*, a maioria dos transcritos de *AtPIPs* e *AtTIPs* tiveram repressão em raízes de plantas submetidas a 12 dias de supressão hídrica, quando o conteúdo de água no solo atingiu 20%. As exceções foram *AtPIP2;6* que não sofreu alteração e *AtPIP2;5* e *AtPIP1;4* que tiveram indução. Houve padrões diferentes entre os dois genes da subfamília SIP, no qual *AtSIP1;1* não teve alteração na expressão e *AtSIP2;1* foi reprimido pela seca. O germoplasma usado nesse trabalho foi a cv. Col-0, que é considerada eficiente no uso da água, em condições de estresse hídrico (ALEXANDERSSON et al., 2005). Feng et al. (2018) utilizaram dados de *microarray* para avaliar a resposta das *AtMIPs* ao estresse salino, no qual foi observado um padrão de repressão na maioria dos transcritos de aquaporinas em raízes de *Arabidopsis*, baseando-se na cv. Col-0.

Em *Jatropha curcas*, Jang et al. (2013) submeteram uma cultivar tolerante a seca a seis dias de estresse hídrico (induzida por PEG 3500) e salino (NaCl 200 mM) e verificaram que após 3 dias, *JcPIP1* foi *up* regulado em folhas e raízes nas plantas submetidas ao PEG, enquanto que *JcPIP2* foi induzido nas raízes após 3 dias de ambos os estresses. Após 6 dias de estresse salino, tanto *JcPIP1* como *JcPIP2* foram *down* regulados em folhas e raízes.

Feng et al. (2019) avaliaram a expressão em folhas e raízes de 12 *GmAQPs* em uma cultivar de soja tolerante submetida ao calor durante 12 h. Os autores observaram que *GmPIPs* e *GmTIPs* foram *up* regulados em raízes após 1,5 h do estresse térmico. Em folhas, por outro lado, os *GmPIPs* e *GmTIPs* foram *down* regulados após 12 h do estresse.

Todos esses diferentes padrões de indução ou repressão, refletem as demandas pelo transporte água intra e extracelular que diferem entre espécies, genótipos ou tecidos avaliados pelos autores, bem como variam conforme a duração da condição de estresse. A análise da expressão de diferentes transcritos de AQPs permite sua utilização como possíveis biomarcadores para identificação de genótipos tolerantes a estresses ambientais, além do isolamento de genes que podem ser usados em estratégias de modificação genética com intuito de obtenção da tolerância a estresses abióticos.

2.3. Respostas fisiológicas a salinidade

A salinidade, assim como outros estresses abióticos, provoca várias alterações na fisiologia das plantas afetando o crescimento, o comportamento estomático e a capacidade fotossintética. A salinidade frequentemente provoca desidratação e estresse osmótico, resultando no fechamento de estômatos, suprimento de carbono reduzido e alta produção de EROs. Para obtenção de cultivares melhoradas para tolerância a salinidade é fundamental a elucidação das respostas fisiológicas das cultivares tolerantes à condição salina (ZHANG et al., 2013).

O incremento de sais no solo provoca inicialmente um estresse hídrico que é rapidamente percebido pelas plantas e tem um profundo efeito na fisiologia. De acordo Oliveira et al. (2010), as alterações fisiológicas, morfológicas e/ou anatômicas que ocorrem nas plantas se refletem na redução da transpiração. A primeira resposta ao déficit de água nas folhas é o fechamento de estômatos para prevenir a dissecação e ocorre antes de qualquer mudança no potencial de água das folhas (LWP) ou do conteúdo relativo de água (CRA) (YAN et al., 2016).

A queda na produção ocasionada pela salinidade observada em diversas espécies geralmente está associada a redução da capacidade fotossintética, resultado de limitações estomáticas e não estomáticas, já que a fotossíntese pode ser afetada pelo fechamento estomático ou pelos efeitos nocivos do sal no aparato fotossintético (ZHANG et al., 2013). A maquinaria fotossintética é sensível a elevadas concentrações de sal que, como demonstrado em alguns estudos, pode resultar na inativação do centro de reação do fotossistema II (PSII) (MURATA et al., 2007) e na redução do conteúdo de clorofila (ZHANG et al., 2014).

Embora o algodão (*G. hirsutum*) seja uma espécie relativamente tolerante ao estresse salino, podem ser observadas grandes variações entre cultivares. No trabalho de Zhang et al. (2014) foram avaliadas duas cultivares de algodão contrastantes para tolerância a salinidade, submetidas a NaCl (0 mM; 80 mM; 160 mM e 240 mM) por sete dias. Os autores observaram que o conteúdo de clorofilas a e b, a taxa de fotossíntese (A), condutância estomática (g_s) e atividade de enzimas antioxidativas, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e glutathione redutase (GR) apresentaram maior variação significativa entre as cultivares. Esses são, então, bons indicadores para avaliação da capacidade dos genótipos em tolerar a salinidade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Análise *in silico* das variantes de AQPs em plantas herbáceas para confecção de *primers*

As sequências codificantes dos genes de AQPs em plantas herbáceas, incluindo *G. hirsutum*, foram usadas para análise *in silico*, focalizando nas variantes *PIP1*, *TIP2* e *SIP1*, com intuito de desenhar *primers* robustos, com regiões conservadas e livre de dímeros, capazes de serem utilizados em estudos prospectivos em demais espécies de plantas. A busca foi feita no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), com auxílio da ferramenta BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool - nucleotide*). Em seguida, foram realizados alinhamentos múltiplos e dendrograma entre as espécies adotadas, utilizando os *softwares* MUSCLE 3.8 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) e MEGA 7 (KUMAR et al., 2016).

Em função do alinhamento obtido, três conjuntos de *primers* foram confeccionados, com percentual médio de GC de 50%, livres de loops e dímeros, para posterior uso nos ensaios moleculares. As sequências e tamanhos esperados dos *primers* adotados se encontram na Tabela 1.

Tabela 1. *Primers* de variantes de aquaporinas usados para algodão

| Nome | Sequência | %GC | Tamanho (pb) |
|-----------------|-----------------------------|-----|--------------|
| <i>GhPIP1;1</i> | F: 5'CCCTATTCTGGCACCATTGC3' | 55% | 135 |
| | R: 5'AGCCCTTGTCCTTGTTGAAG3' | 50% | |
| <i>GhTIP2;1</i> | F: 5'CCATCGGCTTCATTGTTGGT3' | 50% | 137 |
| | R: 5'GGTCCCACCCAGTAGATCCA3' | 60% | |
| <i>GhSIP1;3</i> | F: 5'CATCATCGGCAACGCTCTC3' | 58% | 168 |
| | R: 5'GGAAGAACCCCAAAACTGT3' | 50% | |

3.2. Recursos genéticos e condução dos experimentos

Sete genótipos de algodão, cedidos pela equipe de melhoramento da Embrapa Algodão, foram usados neste estudo. Os detalhes dos genótipos usados se encontram na Tabela 2. O plantio foi realizado em casa de vegetação, em Campina Grande, PB (7°13'51"S, 35°52'54"W, 512 m), durante a estação seca (setembro/outubro de 2018).

Tabela 2. Síntese das características agronômicas dos genótipos usados

| Genótipo | Detentor | Ciclo (dias) | AAM |
|------------------|-----------------|-------------------------|--------------------------------|
| BRS Seridó | Embrapa | 130-140 | Semiárido/sequeiro |
| CNPA 7MH | Embrapa | 140-150 | Semiárido/sequeiro |
| BRS Acácia | Embrapa | 160-170 | Semiárido/irrigado |
| FMT 701 | FMT | 170-180 | Cerrados/irrigado |
| CNPA MT 2009 152 | Embrapa | 130-140 | Semiárido e Cerrados/ sequeiro |
| BRS 416 | Embrapa | 170-180 | Semiárido e Cerrados/ sequeiro |
| DP 555 BG/RR | Delta Pine | 160-180 | Cerrados/irrigado |

Legenda: AAM- adaptação ambiental e manejo, FMT- Fundação Mato Grosso.

As plantas foram cultivadas em vasos (sacos plásticos pretos com volume de 0,7 L), contendo 300 g de substrato (Basaplant, Base). Cada vaso conteve duas plântulas após o desbaste que ocorreu aos 10 dias após a emergência. As regas foram feitas diariamente, mantendo-se a 100% da capacidade de campo pelo método gravimétrico até o início do estresse que teve ocorrido quando as plantas estavam com 21 dias após a emergência (fase V3), com duração de 72 h. O estresse salino se constituiu da adição de NaCl (190 mM), correspondente ao volume suficiente para preencher 50% da capacidade de campo, atingindo aproximadamente 95 mM de NaCl no substrato. O lixiviado foi coletado e recirculado no solo, durante 3 dias, para manter a concentração salina no substrato e foi feita a adição de água para manter a umidade próxima a 100 % da capacidade de campo. O delineamento inteiramente casualizado (2 tratamentos x 7 genótipos), com 5 repetições.

3.3. Variáveis fisiológicas

Ao fim do estresse salino, fez-se medição de trocas gasosas, com auxílio do IRGA, modelo LCpro+ (ADC), no horário entre 8:30 h e 10:00 h, nas folhas jovens, situadas no canopy das plantas. As variáveis registradas foram: condutância estomática (g_s), taxa de assimilação de CO_2 (A), transpiração (E), concentração interna de CO_2 (C_i), eficiência instantânea de carboxilação (E_iC) – obtida pela razão A/C_i –, e eficiência do uso da água (E_iUA) – obtida pela razão A/E .

Adicionalmente, foram mensurados a massa seca de parte aérea (MSPA), a partir da secagem à 60 °C, em estufa, durante 96 h, e o conteúdo relativo de água nas folhas (CRA), onde seis discos frescos (diâmetro 1 cm) foram pesados (MF) e em seguida imersos em 10 mL de água destilada por 24 h. A seguir, mediu-se a massa turgida (MT) e posterior massa seca (MS) dos discos, secos a 60 °C durante 96 h. O CRA foi calculado pela seguinte equação.

$$\text{CRA: } (MF-MS/MT-MS)*100$$

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância, usando o *software* SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2011) e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.4. Expressão de transcritos de AQPs

Tecidos radiculares de cada planta (100 mg) foram coletados para extração do RNA total (Pure LinkTM RNA Mini Kit, Invitrogen). A coleta foi feita no início da manhã, entre 8:30 h e 9:00h, uma vez que algumas aquaporinas vegetais exibem padrão de expressão circadiano, com um pico de expressão entre 2 e 4 h após o início do período de luz (TAKASE et al., 2011). A integridade das amostras foi analisada em gel de agarose 0,8% e, posteriormente, quantificadas em espectrofotômetro (T80 UV/VIS Spectrometer, PG Instruments). A digestão (DNaseI, New England Biolabs) foi feita usando 5µg do RNA total de cada amostra. Para síntese da primeira fita, utilizou-se o kit ImProm-IITM Reverse Transcription (Promega), utilizando 2 µg do RNA digerido. A quantificação do cDNA foi feita com auxílio do Qubit 3.0 (Life Technologies).

As reações de RT-qPCR foram conduzidas no termociclador Eco Real-Time PCR (Illumina), utilizando-se as combinações de *primers* apresentadas na Tabela 1. Para controle endógeno, utilizou-se um par de *primer* do gene *GhPP2A* (F:

5'GATCCTTGTGGAGGAGTGGA3', R: 5'GCGAAACAGTTCGACGAGAT3'), que amplifica um fragmento de 100 pb.

As reações foram realizadas utilizando o kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega), 1 μ L do cDNA (2 ng), e 0,4 μ L de cada primer (10 μ M), na seguinte programação: desnaturação a 95 °C por 2 min, 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min, e curva de melt (95°C por 15 s; 60 °C por 15 s; 95°C por 15 s). Todos kits foram usados de acordo com recomendação dos fabricantes.

Para análise dos padrões de amplificação gerados foi utilizado a quantificação relativa, onde os gráficos, curva de Melt e Cqs foram gerados automaticamente pelo termociclador Eco™ Real-Time PCR System (Illumina) baseando-se no método de normalização com um gene de referência, $\Delta\Delta Cq$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Todas as análises foram realizadas com replicatas biológicas e experimentais.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Homologia das variantes de AQPs em plantas herbáceas

A análise da homologia de genes de aquaporinas em plantas herbáceas foi realizada a partir de 10 espécies herbáceas, incluindo *G. hirsutum*, focalizando nas variantes *PIP1*, *TIP2* e *SIP1* (Tabela 3). Pela análise das distâncias genéticas, mostradas nos dendogramas na Figura 3, observou-se a formação de dois clados para as três AQPs, sendo que nas *PIP1* e *TIP2*, os acessos que contiveram espécies da família Fabaceae se agruparam no mesmo clado, denotando que, pelo menos para as espécies selecionadas, essas variantes de AQPs são de elevada homologia, baseando-se nas distâncias genéticas que se situaram entre 0,03 a 0,11 substituições por sítio (Figura 3A e B). As sequências de *PIP1s* do Grupo 1 englobaram duas espécies de Euphorbiaceae (*Ricinus communis*, mamona e *Jatropha curcas*, pinhão-mansão); uma Asteraceae (*Helianthus annuus*, girassol), uma Brassicaceae (*A. thaliana*, arabidopsis); uma Solanaceae (*N. tabacum*, tabaco) e uma Malvaceae (*G. hirsutum*, algodão). Em comum entre essas espécies, ressalta-se a proximidade filogenética entre as ordens Malvales e Brassicales (CHASE et al., 2016). Para *TIP2s*, as sequências do Grupo 1 englobaram *G. hirsutum*, *J. curcas* e *R. communis*. As espécies *A. thaliana*, *N. tabacum* e *H. annuus* foram as mais divergentes.

No dendrograma de *SIP1s*, não foi percebido inter-relação filogenética entre as espécies agrupadas nos dois grupos, embora *G. max* e *P. vulgaris* permaneceram próximas, bem como *J. curcas* e *G. hirsutum*, tal como visto nas outras duas AQPs. Vale salientar que a análise das AQPs apresentada na Figura 3 é resultante da disponibilidade das variantes depositadas no banco de genes do NCBI.

As informações filogenéticas referentes a homologia gênica entre espécies são muito contributivas em estudos moleculares, especialmente naqueles focalizados na identificação de genes envolvidos em rotas de estresses bióticos e abióticos. Embora os fenótipos sejam diferenciados, em função da herança dos genótipos, a identidade entre os genes pode contribuir para auxiliar em processos de seleção assistida ou ainda na síntese de sondas robustas que podem ser usadas para um leque maior de espécies vegetais selecionadas. A literatura disponibiliza vários genes já identificados de AQPs. Em plantas tetraplóides, como algodão e soja, o número disponível é maior, resultante provavelmente do nível de ploidia que levou a duplicação de genes (PARK et al., 2010; MAUREL et al., 2015; FENG et al., 2019). De acordo com Park et al. (2010) esses genes têm papel importante na maquinaria celular porque contribuem para elevar a

eficiência no uso da água e nutrientes, quando as plantas enfrentam um determinado tipo de estresse.

Na Figura 4 se encontra uma síntese do alinhamento entre as sequências de *PIP1*, *TIP2* e *SIP1*. Verificou-se que as espécies selecionadas têm maior identidade entre as sequências de *PIP1s* e *TIP2s*, na ordem de 75% a 84%, do que as de *SIP1s*, cuja identidade entre as espécies variou entre 56% e 64%. As setas que flanqueiam as sequências em *G. hirsutum*, representam as regiões usadas pelo software Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) para desenho dos *primers*.

Tabela 3. Relação das espécies usadas para prospecção de variantes de AQPs e o respectivo acesso das sequências obtidas no NCBI.

| Espécie | PIP1 | | TIP2 | | SIP | |
|-----------------------|----------------------|--------------|----------------------|--------------|----------------------|--------------|
| | Gene | Acesso | Gene | Acesso | Gene | Acesso |
| <i>G. hirsutum</i> | <i>GhPIP1;1</i> | EF079900 | <i>GhTIP2;1</i> | U62778 | <i>GhSIP1;3</i> | BK007064 |
| <i>V. unguiculata</i> | <i>VuPIP1;1</i> | KR185758 | - | - | - | - |
| <i>A. hypogaea</i> | <i>AhPIP-7a</i> | XM_025826032 | <i>AhTIP2-1-like</i> | XM_025821637 | <i>AhSIP1-2-like</i> | XM_025831550 |
| <i>N. tabacum</i> | <i>NtPIP1;4</i> | BK008503 | <i>NtTIP2-1-like</i> | XM_016625270 | <i>NtSIP1-1-like</i> | XM_016605997 |
| <i>G. max</i> | <i>GmPIP1;7</i> | NM_001358269 | <i>GmTIP2;4</i> | NM_001255187 | <i>GmSIP1;3</i> | NM_001289293 |
| <i>P. vulgaris</i> | <i>PvPIP1;3</i> | DQ855475 | HP | XM_007150589 | HP | XM_007161709 |
| <i>A. thaliana</i> | <i>AtPIP1;5</i> | NM_118469 | <i>Atdelta-TIP</i> | AY081622 | <i>AtSIP1a</i> | NM_111280 |
| <i>H. annuus</i> | <i>HaPIP1-3-like</i> | XM_022167209 | <i>AhTIP2-1-like</i> | XM_022134384 | <i>HaSIP1-2-like</i> | XM_022144881 |
| <i>J. curcas</i> | <i>JcPIP1</i> | XM_012232406 | <i>JcTIP2-1</i> | XM_012218014 | <i>JcSIP1-1</i> | XM_012234481 |
| <i>R. communis</i> | <i>RcPIP1-1</i> | NM_001323725 | <i>RcTIP2-1</i> | XM_002515953 | <i>RcSIP1-2</i> | XM_002525425 |

Legenda: HP - *hypothetical protein*

Figura 3. Distância genética entre seqüências de variantes de AQPs em plantas herbáceas, pelo método UPGMA. Os comprimentos dos ramos representam unidades das distâncias evolutivas.

A: *PIPs*, B: *TIP2s*, C: *SIPs*

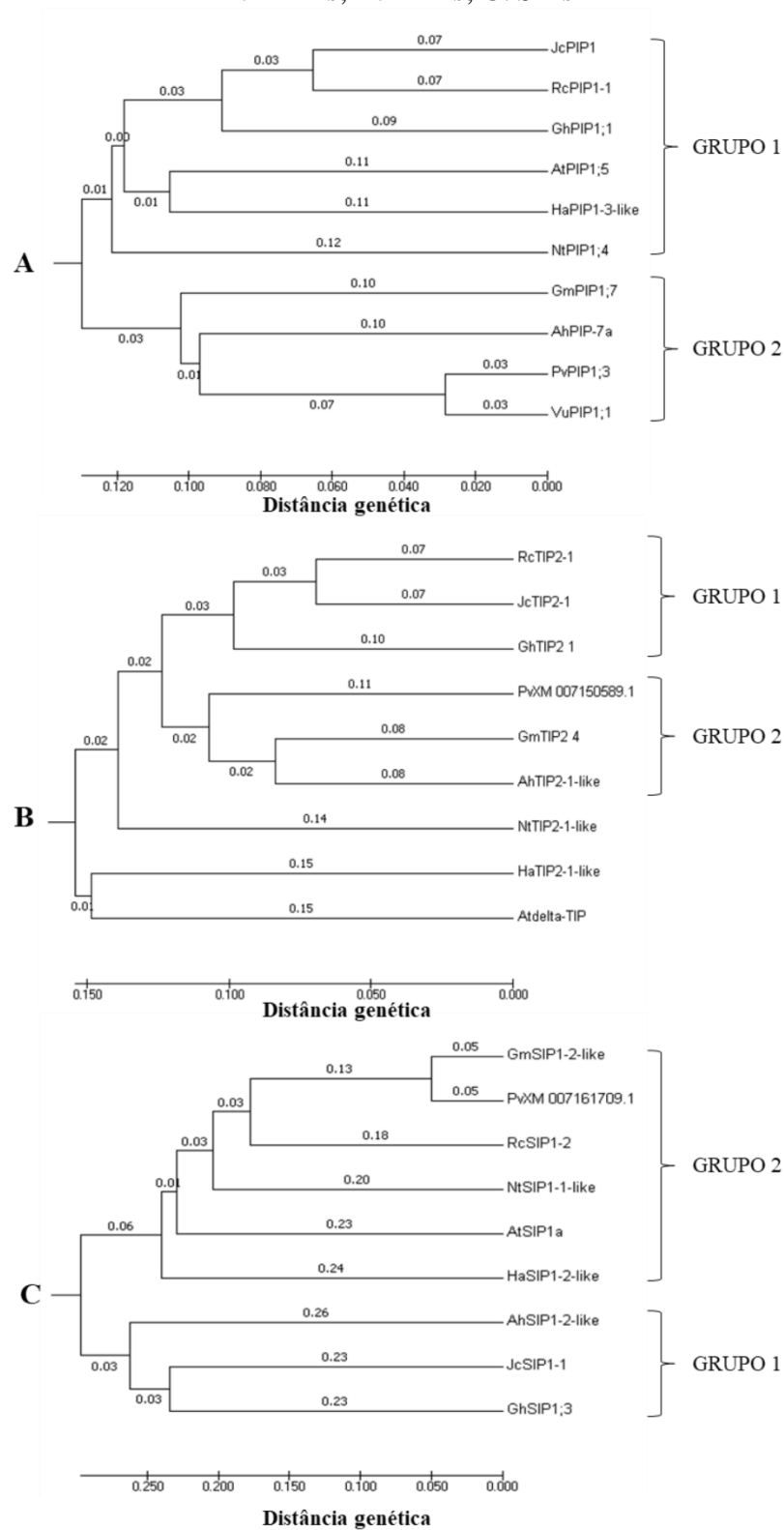
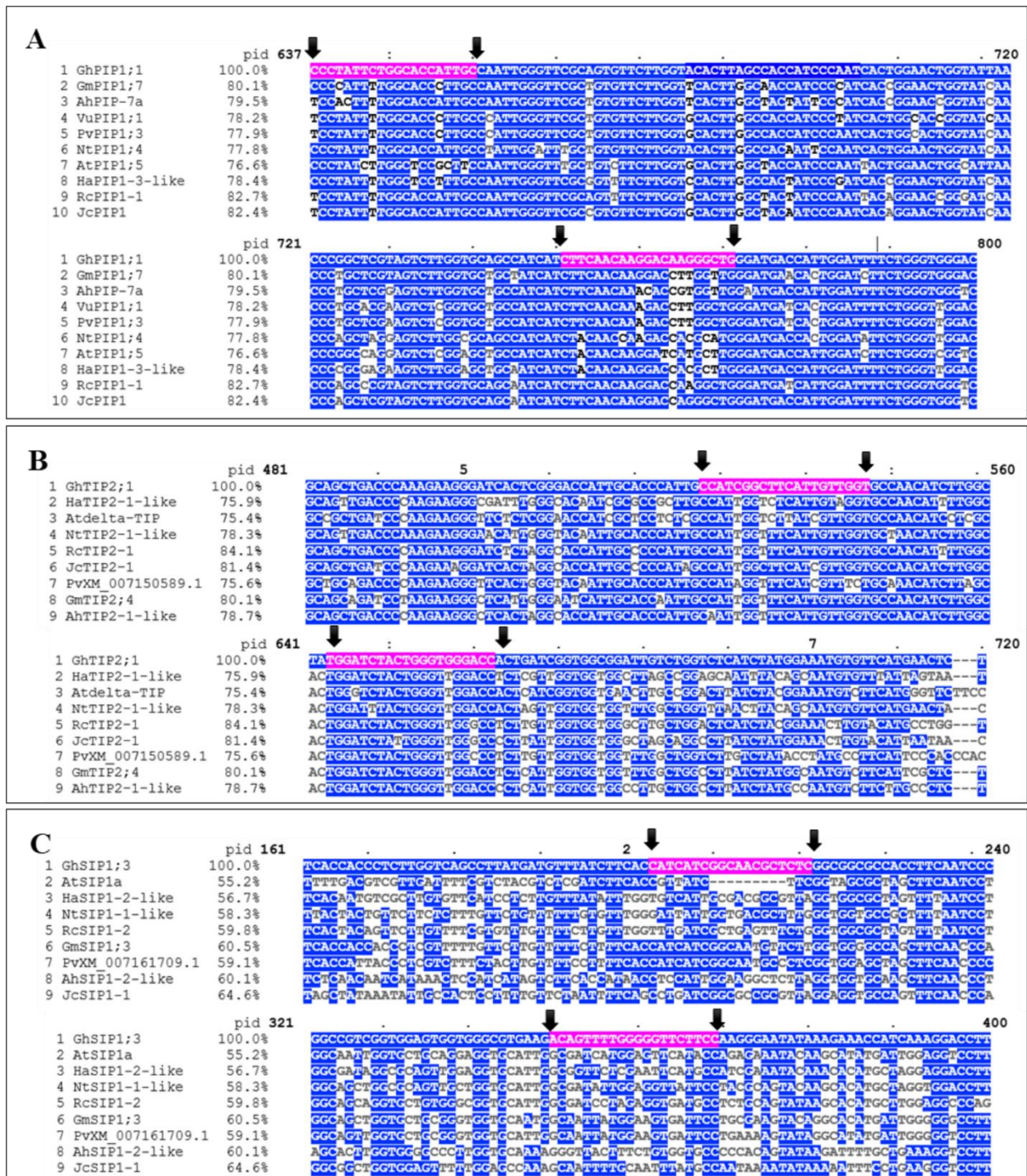


Figura 4. Alinhamento das sequências das variantes de AQPs, em plantas herbáceas. Setas flanqueando as sequências de *Gossypium* indicam as regiões usadas para desenho dos *primers*.
A: *PIP1s*, B: *TIP2s*, C: *SIPs*.



4.2. Trocas gasosas das plantas de algodão sob estresse salino

O curto período de estresse salino (72 h) não surtiu efeitos deletérios no fenótipo das plantas de algodão. As folhas permaneceram com coloração e textura normais, contudo foi observada redução no crescimento no período de estresse (Figura 5). Durante o período experimental, as temperaturas mínimas e máximas se mantiveram em 20 °C e 45 °C e a umidade relativa do ar em 20% e 85%, respectivamente (Figura 6).

Figura 5. Aspecto das plantas após 72 h de estresse salino. G1: BRS Seridó; G2: CNPA 7MH; G3: BRS Acácia; G4: FMT 701; G5: CNPA MT 2009 152; G6: BRS 416; G7: DP 555 BGRR; C: controle; S: estresse salino

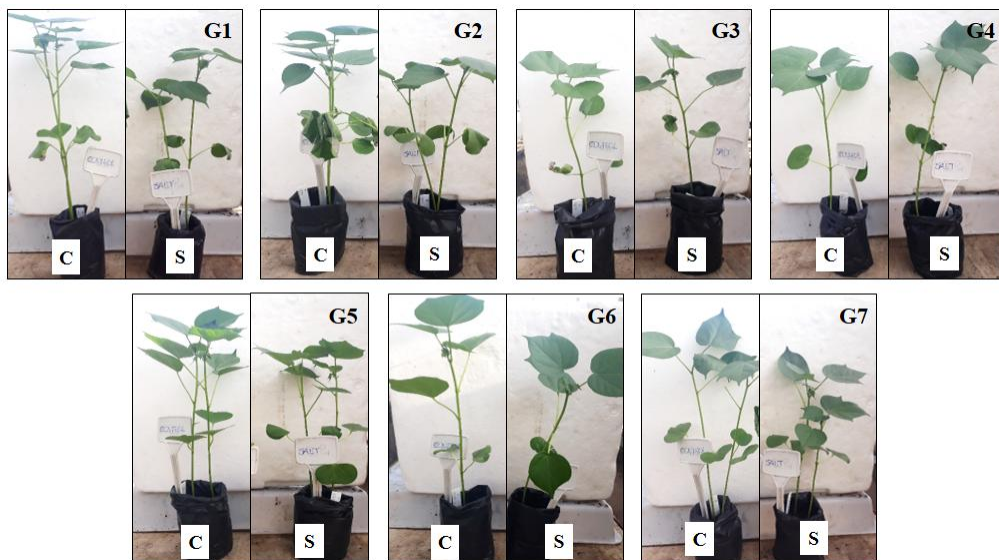
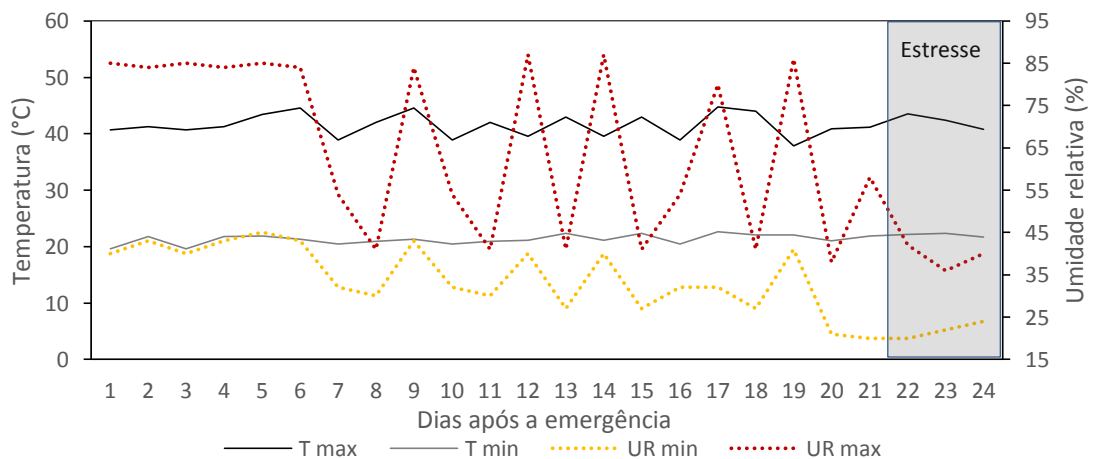


Figura 6. Dados de temperatura e umidade relativa do ar registradas em casa de vegetação durante a execução do experimento de estresse salino.



A síntese da análise de variância das variáveis fisiológicas e massa seca das plantas registradas ao final do estresse salino se encontra na Tabela 4. Diferença estatística significativa foi encontrada para todas as variáveis nos tratamentos, genótipos e interação (T x G), com exceção da eficiência instantânea do uso da água (*EiUA*), entre os tratamentos, e de conteúdo relativo de água (*CRA*) que foi significativo apenas para a interação (T x G).

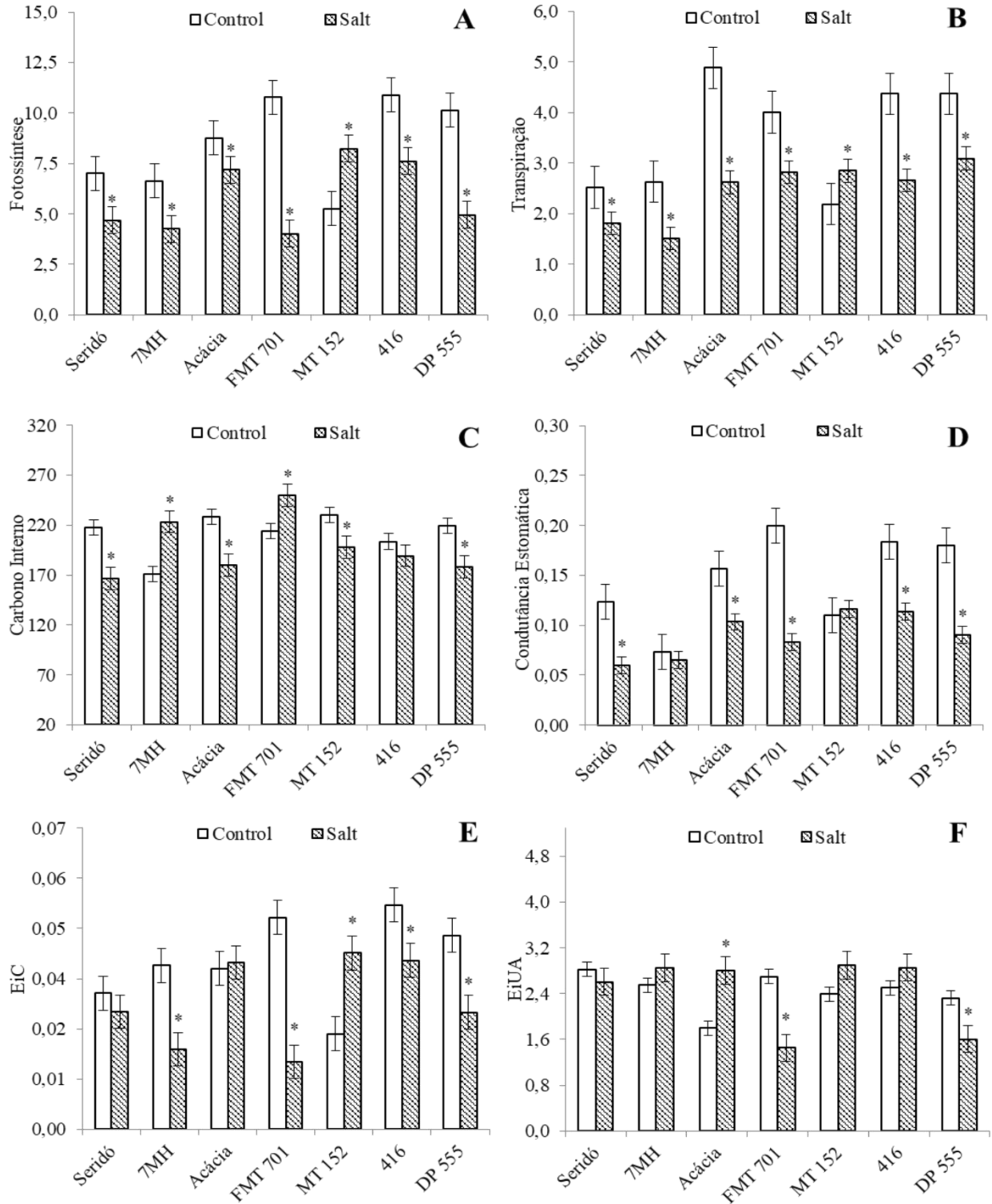
Tabela 4. Resumo da análise de variância das variáveis de trocas gasosas registradas nos genótipos de algodão submetidos a 72 h de estresse salino (NaCl 190 mM)

| FV | QM | | | | | | | | |
|----------------|----|--------|---------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|
| | GL | A | Gs | E | Ci | EiUA | EiC | MSPA | CRA |
| Genótipo (G) | 6 | 10,0** | 0,004** | 3,33** | 1143** | 0,62** | 2e-4** | 0,04** | 0,01 |
| Tratamento (T) | 1 | 73,2** | 0,03** | 12,4** | 2058** | 4e-5 | 10e-3** | 0,03* | 0,02 |
| G x T | 6 | 14,2** | 0,003** | 1,25** | 2620** | 0,89** | 4e-4** | 0,07** | 0,02** |
| Resíduo | 28 | 0,24 | 2e-4 | 0,06 | 197 | 0,1 | 2e-5 | 0,006 | 0,005 |
| Média | | 7,17 | 0,12 | 3,02 | 204 | 2,43 | 0,035 | 1,00 | 1,17 |
| CV (%) | | 6,95 | 11,2 | 8,39 | 6,87 | 12,9 | 11,2 | 7,93 | 6,42 |

Legenda: *, ** - significativo a 5 % e 1% pelo teste F, respectivamente; FV: Fonte de variação; GL: Grau de liberdade; CV: coeficiente de variação; QM: quadrado médio; A: Fotossíntese; *gs*: Condutância estomática; *E*: Transpiração; *Ci*: Carbono interno; *EiUA*: Eficiência instantânea no uso da água; *EiC*: Eficiência instantânea de carboxilação; MSPA: Massa seca de parte aérea; CRA: Conteúdo relativo de água.

Na Figura 6 se encontra as médias dos genótipos para as variáveis de trocas gasosas, medidas pelo IRGA após 72 h de estresse. A salinidade provocou redução da fotossíntese (*A*) em todos os genótipos avaliados, exceto para CNPA MT 2009 152, que teve aumento na assimilação líquida de CO₂ (Figura 7A) associada à manutenção da condutância estomática (*gs*) (Figura 7D) e aumento da eficiência instantânea de carboxilação (*EiC*) (Figura 7E). Isso indica melhor ajustamento a condição de estresse.

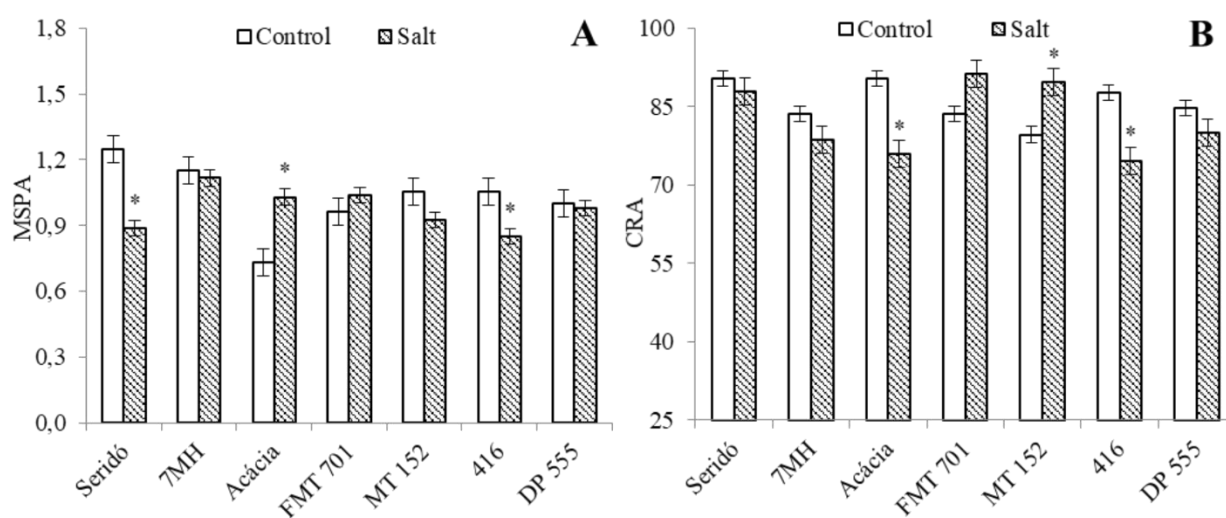
Figura 7. Média das trocas gasosas registrada nas cultivares de algodão submetidas a salinidade por 72h. A: Fotossíntese (A) – $\mu\text{mol de CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$; B: Transpiração (E) – $\text{mmol de H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$; C: Carbono interno (C_i) – $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$; D: Condutância estomática (g_s) – $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$; E: Eficiência instantânea de carboxilação (EiC) – $[(\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}) (\mu\text{mol mol}^{-1})^{-1}]$; F: Eficiência instantânea do uso da água ($EiUA$) – $[(\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1})(\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1})^{-1}]$. Marcados com (*) diferem estatisticamente do tratamento controle pelo teste de Tukey ($p <$



A BRS Acácia apresentou leve redução (17%) em A , comparada aos demais genótipos (Figura 7A), o que associado com redução da transpiração (E) (Figura 7B) resultou no aumento de 56% na eficiência instantânea do uso da água ($EiUA$, Figura 7F). Esse ajuste foi um importante para esse genótipo, visto que ele sofreu redução no conteúdo relativo de água (CRA) (Figura 8A), mas foi capaz de direcionar e aproveitar a limitação de água disponível para a A . O aumento na $EiUA$ em BRS Acácia (Figura 7F) é uma importante estratégia de tolerância, já que diminuiu o consumo de água junto com a absorção de íons do solo que poderiam levar a toxicidade das células.

Os genótipos BRS Seridó, BRS 416 e 7MH também apresentaram redução em A , na ordem de 30% a 35%, como resultado do fechamento dos estômatos (g_s) e da redução da E , mantendo os mesmos níveis do controle de $EiUA$ (Figura 7F), especialmente na BRS Seridó que teve redução no carbono interno (C_i) e manteve a eficiência de carboxilação (EiC) do controle (Figura 7C e 7E). Isso denota que a redução de A nesse genótipo ocorreu pela menor disponibilidade de CO_2 . Quanto aos genótipos FMT 701 e DP 555 BGRR, ambos apresentaram expressivas reduções em A , E , $EiUA$ e EiC (Figura 7A, B, E e F), indicando que esses materiais foram mais sensíveis a salinidade imposta, durante 72 h.

Figura 8. Massa seca de parte aérea (MSPA) (A) e conteúdo relativo de água nas folhas (CRA) (B), após 72 h de estresse salino. *- difere estatisticamente do controle (Tukey, $p < 0,05$).



Apesar do ajuste fisiológico demonstrado em BRS Seridó e BRS 416, esses apresentaram redução na massa seca de parte aérea (Figura 8A), podendo indicar que a energia resultante do processo fotossintético foi realocada para os processos celulares de manutenção e proteção

contra o estresse imposto. Essa suposição se baseia nos achados de Zhang et al. (2014) que avaliaram os efeitos da salinidade na morfologia, bioquímica e fisiologia de genótipos contratantes de algodão, submetidos a quatro concentrações de NaCl (0 a 240 mM) durante 7 dias. Os autores observaram redução na *A* e em *gs* no genótipo tolerante a partir de 80 mM de NaCl em meio hidropônico; o genótipo sensível teve maior redução em *A* que foi resultado também de limitações não estomáticas, como declínio do teor de clorofila nas folhas das plantas. O genótipo tolerante também apresentou redução na fitomassa de folhas, o que, de acordo com os autores, representa um mecanismo de adaptação da planta à salinidade, uma vez que esse ajustamento é necessário para adaptação inicial e posterior manutenção de energia que será direcionada para o crescimento. No genótipo sensível não houve perda na fitomassa, o que também foi observado nesse trabalho com FMT 701 e DP 555 BGRR (Figura 8A).

4.3. Transcritos de aquaporinas em plantas sob estresse salino

Os transcritos de AQPs expressos nas raízes de algodão sob estresse salino durante 72 h revelaram, no geral, uma tendência de repressão nas plantas que se apresentaram como tolerantes à salinidade, nos ensaios fisiológicos, quer sejam BRS Seridó, 7MH, CNPA MT 2009 152 e BRS 416. Em comum entre elas há a larga adaptação ao ambiente semiárido cujos solos, via de regra, possuem baixa retenção hídrica favorecendo a deposição de sais (VASCONCELOS et al., 2013). Os perfis de *GhTIP2;1* e *GhPIP1;1* visto nesses genótipos condizem com o reportado na literatura, quanto a habilidade de plantas tolerantes em lidar com a menor disponibilidade de água do solo. As PIPs se localizam na membrana plasmática e atuam no fluxo de água entre o meio extracelular e o interior da célula (KAPILAN et al., 2018). As TIPs, localizadas na membrana do vacúolo (tonoplasto), estão envolvidas no ajuste osmótico, alterando a permeabilidade de água de modo a reduzir as flutuações no volume do citosol nos casos de mudanças bruscas no potencial de água extracelular provocado tanto pela falta de água como pelo excesso de sais. A *down* regulação de *GhTIP2;1* vista em BRS Seridó, 7MH, CNPA MT 2009 152 e BRS 416 pode contribuir para uma maior capacidade de sequestrar sódio (Na^+) nos vacúolos pela modulação da homeostase de íons e potencial osmótico, uma vez que o acúmulo do Na^+ reduz o potencial hídrico do vacúolo que pode resultar no influxo de água do citosol se não houver modulação da permeabilidade do tonoplasto. De acordo com Peng et al. (2016), que avaliaram genótipos contrastantes de algodão submetidos a salinidade, a compartimentalização do Na^+ é um dos mecanismos de tolerância ao sal nessa cultura. Porém, a relação direta de TIPs com o sequestro de íons nos vacúolos ainda precisa ser estudada. Baseando-se nesses resultados

pode-se atestar que esses quatro genótipos são os mais tolerantes a salinidade, o que também pode ser atestado pelos resultados do ensaio fisiológico.

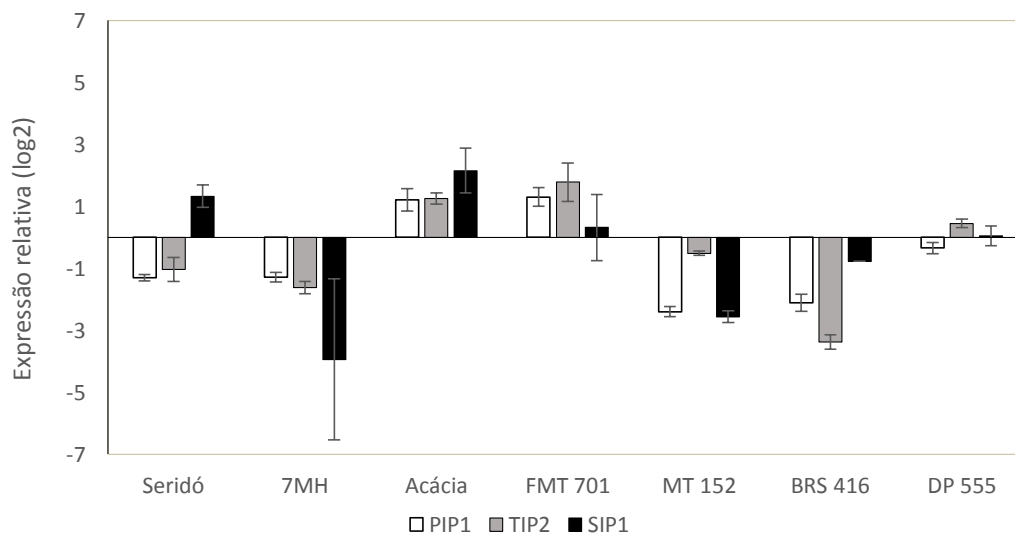


Figura 9. Expressão relativa dos transcritos de *GhPIP1;1*, *GhTIP2;1* e *GhSIP1;3* em genótipos de algodoeiro submetidos a salinidade por 72 h durante a fase inicial de crescimento.

Diferentemente das demais cultivares adaptadas ao semiárido, a BRS Acácia apresentou indução das três AQPs, igualmente a FMT 701, que é adaptada aos Cerrados brasileiros e sensível a salinidade (MARCELINO, 2018). Inicialmente, pode-se inferir que a salinidade interferiu no transporte de água na BRS Acácia, baseando-se nos resultados visto na Figura 7B, onde se observou grande redução no conteúdo relativo de água nas folhas, o que pode ser resultado da ineficiente distribuição da água entre os tecidos. Por se tratar de um material adaptado ao semiárido e, portanto, às intempéries hídricas, acredita-se que a BRS Acácia adota outros mecanismos de ajustamento para tolerar a salinidade considerando que foi a única que apresentou elevação da *EiUA*.

Esse resultado também foi observado por Katsuhara et al. (2003) que transformaram plantas de arroz para superexpressar *HvPIP2;1*. Após duas semanas de estresse salino (100 mM), os autores verificaram que a superexpressão de *HvPIP2;1* prejudicou o transporte de água da raiz para a parte aérea, tornando a planta mais sensível do que o tipo selvagem.

Dentre os materiais analisados, a DP 555 BGRR, foi a única que se manteve, praticamente, em nível basal nos transcritos de AQPs, com uma leve *up* regulação para

GhTIP2;1. Nos resultados fisiológicos verifica-se que esse genótipo reduziu todas variáveis das trocas gasosas (Figura 7A, B, E e F), indicando se tratar de um material com capacidade limitada de ajustar-se ao estresse salino, nas condições adotadas nesse trabalho.

A literatura disponibiliza vários trabalhos com AQPs em plantas sob estresses abióticos, com maior enfoque em PIPs. Na maioria deles, a superexpressão é vista como efeito negativo uma vez que prejudica o crescimento das plantas por interferir no fluxo geral do movimento de água na maioria dos tecidos e células (AHARON et al., 2003; ZHU et al., 2005; JANG et al., 2013). De acordo com Guo et al. (2015), o estresse salino é inicialmente percebido por receptores nas raízes, que acarretam o aumento de moléculas sinalizadoras como cálcio (Ca^{2+}) e EROs, além de mudanças nos fitohormônios. Esses mensageiros secundários provocam eventos em cascata que afetam kinases e fatores de transcrição que regulam a expressão de genes envolvidos em processos como detoxificação, HSPs, metabolismo de carboidratos, desidratação, homeostase de íons e transporte através de membranas, resultando em respostas fisiológicas de adaptação, nas plantas tolerantes.

Em milho, Zhu et al. (2005) avaliaram os efeitos da salinidade na cv. Helix submetida a NaCl (100 e 200 mM), durante 24h. Transcritos de *ZmPIPs* e *ZmTIPs* foram reprimidos em 24 h após a adição de NaCl (200 mM) nas plantas cultivadas em meio hidropônico, enquanto que após 2 h no tratamento com menor concentração de sal (NaCl 100 mM) houve uma indução transiente de *ZmPIPs*. Os autores não informam a natureza genética da Helix, com relação a tolerância a estresses ambientais, porém no estudo de Lohaus et al. (2000), que avaliaram a fisiologia e bioquímica dessa cultivar submetida a 100 mM de NaCl durante 8 dias, os autores a reportaram como tolerante ao sal, considerando que manteve a fotossíntese durante o estresse e não apresentou sintomas de toxicidade devido ao sal.

Em pinhão manso, Jang et al (2013) avaliaram a expressão de *JcPIP1* e *JcPIP2* em uma cultivar tolerante a seca e sensível ao sal submetida a estresse salino (NaCl 200 mM) durante 6 dias. No terceiro dia de estresse salino os autores observaram a *up* regulação de *JcPIP2* em raízes, enquanto que *JcPIP1* manteve os mesmos níveis de expressão do controle. Conforme o período de estresse foi mantido, após 6 dias, ambos *JcPIP1* e *JcPIP2* foram reprimidos em folhas e raízes.

Com relação as SIPs, tratam-se de proteínas localizadas em membranas intracelulares, principalmente nas do RE. Elas têm papel relevante na célula porque regulam o volume e a concentração de íons da organela, permitindo maior ajuste às mudanças osmóticas do meio intracelular provocadas pelo estresse (GOMES et al., 2009). Nesse trabalho a *down* regulação dos transcritos foi mantida nos genótipos adaptados ao semiárido, com exceção da BRS Seridó e

da BRS Acácia nas quais houve indução. Ainda existem poucos estudos sobre o papel dessa variante na resposta a estresses abióticos, comparado com as PIPs e TIPs. Porém foi demonstrado no trabalho de Zhang et al. (2017), que esse gene está envolvido na resposta ao estresse oxidativo, baseando-se na superexpressão de *GmSIP1;3* em plantas de tabaco transgênico, que resultou em tolerância ao estresse imposto pela adição de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (0,5 e 1,0 mM) no meio de cultivo. Assim, acredita-se que a *up* regulação de *GhSIP* vista em BRS Acácia e BRS Seridó pode ser um dos tipos de resposta para minimizar os danos celulares provocados pelas EROS nos tecidos radiculares, causadas pela salinidade. Nos outros genótipos adaptados ao semiárido (7MH, CNPA MT 2009 152 e BRS 416), a *down* regulação da *GhSIP* pode estar relacionada com o outro papel, que seria combater o desequilíbrio osmótico no RE, provocado pelo estresse salino. A adoção de uma dessas vias depende muito da habilidade do genótipo em usar as várias nuances de defesa contra estresse abiótico, considerando-se que o caráter de tolerância é multigênico e, portanto, dependente de várias rotas.

Baseando-se nos achados desse trabalho e os encontrados na literatura, é possível afirmar que a *down* regulação das cultivares estudadas nesse trabalho está relacionada a um dos mecanismos de tolerância ao estresse salino. Para o melhoramento do algodoeiro, recomenda-se que essas ferramentas sejam adotadas, especialmente as baseadas na expressão das AQPs PIP1 e TIP2, de modo a auxiliar nos processos seletivos, focalizando na tolerância a salinidade. Cabe salientar que a maioria das respostas de AQPs em plantas submetidas a salinidade é consistente com as respostas ao estresse hídrico (AFZAL et al., 2016), indicando que o uso de marcadores de AQPs pode ser muito contributivo em programas de melhoramento de várias espécies, submetidas a estresses ambientais.

5. CONCLUSÃO

Baseando-se nos resultados obtidos dos transcritos de AQPs nas plantas de algodão submetidas a salinidade durante 72 h, pode-se atestar que as variantes PIP1 e TIP2 são indicadores confiáveis para identificar plantas tolerantes a salinidade. Essa constatação é consubstanciada com os resultados fisiológicos que também corroboraram com os achados encontrados na literatura, para algodão e outras espécies cultivadas.

REFERÊNCIAS

ABRAPA – Associação Brasileira de Produtores de Algodão. **Algodão no Mundo**. Disponível em: <<http://www.abrapa.com.br/Paginas/dados/algodao-no-mundo.aspx>>. Acesso em: 07 out. 2017.

AFZAL, Z.; HOWTON, T.C.; SUN, Y.; MUKHTAR, M.S. The roles of Aquaporins in plant stress responses. **Journal of Developmental Biology**, v.4, n.1, p.1-22, 2016.

AHARON, R.; SHAHAK, Y.; WININGER, S.; BENDOV, R.; KAPULNIK, Y.; GALILI, G. Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress. **Plant Cell**, v.15, n.2, p.439-447, 2003.

ALEXANDERSSON, E.; FRAYSSE, L.; SJOVALL-LARSEN, S.; GUSTAVSSON, S.; FELLERT, M.; KARLSSON, M.; JOHANSON, U.; KJELLBOM, P. Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. **Plant Molecular Biology**, v.59, p. 469-484, 2005.

ARAÚJO FILHO, A. A.; RABELO, J.L.C.; COELHO, J.D.; FREITAS, G.A.; SENA, J.V.C. **Caracterização da cadeia produtiva de Algodão no Semiárido Nordeste**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil. 2013. 251 p. (Série Documentos do ETENE).

AZAD, A.K.; AHMED, J.; ALUM, M.A.; HASAN, M.M.; ISHIKAWA, T.; SAWA, Y.; KATSUHARA, M. Genome-wide characterization of major intrinsic proteins in four grass plants and their non-aqua transport selectivity profiles with comparative perspective. **PLOS ONE**, v.11, n.6, e0157735, p.1-16, 2016.

AZAMBUJA, R.; DEGRANDE, P.E. Trinta anos do bicudo-do-algodoeiro no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.81, n.4, p.377-410, 2014.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry and Molecular Biology of plants**. Chichester: John Wiley & Sons, 2015. 1280 p.

CHASE, M.W.; CHRISTENHUSZ, M. J. M.; FAY, M. F.; BYNG, J. W.; JUDD, W. S.; SOLTIS, D. E.; MABBERLEY, D. J.; SENNIKOV, A. N.; SOLTIS, P. S.; STEVENS, P. F. An update of the Angiosperm Phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.181, n.1, p.1-20, 2016.

CHAUMONT, F.O.; BARRIEU, F.O.; WOJCIK, E.; CHRISPEELS, M.J.; JUNG, R. Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. **Plant Physiology**, v.125, p.1206-1215, 2001.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Séries históricas**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras>>. Acesso em: 06 jan. 2019.

DEINLEIN, U.; STEPHAN, A.B.; HORIE, T.; LUO, W.; XU, G.; SCHROEDER, J.I. Plant salt-tolerance mechanisms. **Trends in Plant Science**, v.19, n.6, p.371-379, 2014.

DUTRA, W.F.; GUERRA, Y.L.; RAMOS, J.P.C.; FERNANDES, P.D.; SILVA, C.R.C.; BERTIOLI, D.J.; LEAL-BERTIOLI, S.C.M.; SANTOS, R.C. Introgression of wild alleles into the tetraploid peanut crop to improve water use efficiency, earliness and yield. **PLOS ONE**, v. 13, n. 6, e0198776, p.1-16, 2018.

FENG, Z.; XU, S.; LIU, N.; ZHANG, G.; HU, Q.; XU, Z.; GONG, Y. Identification of the AQP members involved in abiotic stress responses from *Arabidopsis*. **Gene**, v.646, p.64-73, 2018.

FENG, Z.J.; LIU, N.; ZHANG, G.W.; NIU, F.G.; XU, S.C.; GONG, Y.M. Investigation of the AQP family in soybean and the promoter activity of *TIP2;6* in heat stress and hormone responses. **International Journal of Molecular Sciences**, v.20, n.2, e262, p.1-21, 2019.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FREIRE, E. C.; MORELLO, C. L.; FARIAS, F. J. C.; PEDROSA, M. B. SILVA FILHO, J. L. Melhoramento do algodoeiro: cultivares convencionais e transgênicas para o Cerrado. **Algodão no Cerrado do Brasil**. 3ed., Brasília, ABRAPA, Cap. 6, p.151-198. 2015.

GOMES, D.; AGASSE, A.; THIÉBAUD, P.; DELROT, S.; GERÓS, H.; CHAUMONT, F. Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1788, n.6, p. 1213-1228, 2009.

GUO, J.; SHI, G.; GUO, X.; ZHANG, L.; XU, W.; WANG, Y.; SU, Z.; HUA, J. Transcriptome analysis reveals that distinct metabolic pathways operate in salt-tolerant and salt-sensitive upland cotton varieties subjected to salinity stress. **Plant Science**, v. 238, p. 33–45, 2015.

ICAC - International Cotton Advisory Committee. Disponível em: <<https://www.icac.org/tech/overview>>. Acesso em: 04 nov. 2017.

ISAAA - International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. Global status of commercialized Biotech/GM Crops: 2016. **ISAAA Brief No. 52**. ISAAA: Ithaca, NY, 2016.

JANG, H.A.; YANG, S.; CARLSON, J.E.; KU, Y.; AHN, S. Two aquaporins of *Jatropha* are regulated differentially during drought stress and subsequent recovery. **Journal of Plant Physiology**, v.170, p.1028-1038, 2013.

JOHANSON, U.; KARLSSON, M.; JOHANSSON, I.; GUSTAVSSON, S.; SJOVALL, S.; FRAYSSE, L.; WEIG, A.R.; KJELLBOM, P. The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. **Plant Physiology**, v.126, p.1358-1369, 2001.

KAPILAN, R.; VAZIRI, M.; ZWIAZEK, J.J. Regulation of aquaporins in plants under stress. **Biological Research**, v.51, n.1, p.1-11, 2018.

KATSUHARA, M.; KOSHIO, K.; SHIBASAKA, M.; HAYASHI, Y.; HAYAKAWA, T.; KASAMO, K. Over-expression of a barley aquaporin increased the shoot/root ratio and raised salt sensitivity in transgenic rice plants. **Plant Cell Physiology**, v.44, n.12, p.1378-1383, 2003.

KUMAR, S.; STECHER G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v.33, p.1870-1874, 2016.

LALOUX, T.; JUNQUEIRA, B.; MAISTRIAUX, L.C.; AHMED, J.; JURKIEWICZ, A.; CHAUMONT, F. Plant and mammal Aquaporins: same but different. **International Journal of Molecular Sciences**, v.19, p.1-27, 2018.

LI, D.; WU, Y., RUAN, X.; LI, B.; ZHU, L.; WANG, H.; LI, X. Expressions of three cotton genes encoding the PIP proteins are regulated in root development and in response to stresses. **Plant Cell Reports**, v.28, p.291-300, 2009.

LI, W.; LI, D.; HAN, L.; TAO, M.; HU, Q.; WU, W.; ZHANG, J.; LI, X.; HUANG, G. Genome-wide identification and characterization of TCP transcription factor genes in upland cotton (*Gossypium hirsutum*). **Scientific Reports**, v. 7, n. 10118, p. 1-14, 2017.

LIAN, H.L.; YU, X.; LANE, D.; SUN, W.N.; TANG, Z.C.; SU, W.A. Upland rice and lowland rice exhibited different PIP expression under water deficit and ABA treatment. **Cell Research**, v.16, p.651-660, 2006.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LOHAUS, G.; HUSSMANN, M.; PENNEWISS, K.; SCHNEIDER, H.; ZHU, J.J.; SATTELMACHER, B. Solute balance of a maize (*Zea mays* L.) source leaf as affected by salt treatment with special emphasis on phloem retranslocation and ion leaching. **Journal of Experimental Botany**, v.51, n.351, p.1721-1732, 2000.

MARCELINO, A.D.A.L. **Comportamento de genótipos de algodoeiro submetidos a estresse salino**. Campina Grande, 2018. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão.

MAUREL, C.; BOURSIAC, Y.; LUU, D.; SANTONI, V.; SHAHZAD, Z.; VERDOUCQ, L. Aquaporins in plants. **Physiological Reviews**, v.95, p.1321-1358, 2015.

MAUREL, C.; REIZER, J.; SCHROEDER, J.I.; CHRISPEELS, M.J. The vacuolar membrane protein gamma-TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes. **EMBO Journal**, v.12, n.2241-2247, 1993.

MURATA, N.; TAKAHASHI, S.; NISHIYAMA, Y.; ALLAKHVERDIEV, S.I. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1767, n.6, p.414-421, 2007.

NCC – National Cotton Council of America. Rankings. Disponível em: <<http://www.cotton.org/econ/cropinfo/cropdata/rankings.cfm>>. Acesso em: 05 fev. 2019.

NEVES, M. F.; PINTO, M.J.A. **A cadeia do Algodão Brasileiro: desafios e estratégias**. [s.l.]: ABRAPA, 2012. 55 p.

OLIVEIRA, I. R. S. de; OLIVEIRA, F. N. de; MEDEIROS, M. A. de; TORRES, S. B.; TEIXEIRA, F. J. V. Crescimento inicial do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) em função da salinidade da água de irrigação. **Revista Caatinga**, v.23, n.4, p.40-45, 2010.

PARK, W.; SCHEFFLER, B.E.; BAUER, P.J.; CAMPBELL, B.T. Identification of the family of aquaporin genes and their expression in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **BMC Plant Biology**, v.10, p.1-17, 2010.

PENG, Z.; HE, S.; SUN, J.; PAN, Z.; GONG, W.; LU, Y.; DU, X. Na⁺ compartmentalization related to salinity stress tolerance in upland cotton (*Gossypium hirsutum*) seedlings. **Scientific Reports**, v.6, n.1, p.1-14, 2016.

REDDY, P.S.; RAO, T.S.R.B.; SHARMA, K.K.; VADEZ, V. Genome-wide identification and characterization of the aquaporin gene family in *Sorghum bicolor* (L.). **Plant Gene**, v.1, p. 18-28, 2015.

RODRIGUES, J.D.; DA SILVA, C.R.C.; PEREIRA, R.F.; RAMOS, J.P.C.; MELO-FILHO, P.A.; CAVALCANTI, J.J.V.; SANTOS, R.C. Characterization of water-stress tolerant cotton cultivars based on plant growth and in activity of antioxidant enzymes. **African Journal of Agricultural Research**, v.11, n.39, p.3763-3770, 2016.

SAKURAI, J.; ISHIKAWA, F.; YAMAGUCHI, T.; UEMURA, M.; MAESHIMA, M. Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. **Plant Cell Physiology**, v. 46, p. 1568–1577, 2005.

SHEKOOFA, A.; SINCLAIR, T.R. Aquaporin activity to improve crop drought tolerance. **Cells**, v.7, n.9, p.1-10, 2018.

SOARES, L. A. A.; FERNANDES, P. D.; LIMA, G. S.; BRITO, M. E. B.; NASCIMENTO, R.; ARRIEL, N. H. C. Physiology and production of naturally-colored cotton under irrigation strategies using salinized water. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.53, n.6, p.746-755, 2018.

TAKASE, T.; ISHIKAWA, H.; MURAKAMI, H.; KIKUCHI, J.; SATO-NARA, K.; SUZUKI, H. The circadian clock modulates water dynamics and aquaporin expression in Arabidopsis roots. **Plant Cell Physiology**, v.52, n.2, p.373-383, 2011.

VASCONCELOS, R. R. A.; BARROS, M.F. C.; SILVA, E. F. F.; GRACIANO, E. S. A.; FONTENELE, A. J. P. B.; SILVA, N. M. L. Características físicas de solos salino-sódicos do semiárido pernambucano em função de diferentes níveis de gesso. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.17, n.12, p.1318-1325, 2013.

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

YAN, W.; ZHONG, Y.; SHANGGUAN, Z. A meta-analysis of leaf gas exchange and water status responses to drought, **Scientific Reports**, v.6, art. 20917, 2016.

ZHANG, D.; HUANG, Y.; KUMAR, M.; WAN, Q.; XU, Z.; SHAO, H.; PANDEY, G.K. Heterologous expression of *GmSIP1;3* from soybean in tobacco showed growth retardation and tolerance to hydrogen peroxide. **Plant Science**, v.263, p.210-218, 2017.

ZHANG, L.; MA, H.; CHEN, T.; PEN, J.; YU, S.; ZHAO, X. Morphological and Physiological Responses of Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Plants to Salinity. **PLOS ONE**, v.9, n.11, e112807, 2014.

ZHANG, L.; ZHANG, G.; WANG, Y.; ZHOU, Z.; MENG, Y.; CHEN, B. Effect of soil salinity on physiological characteristics of functional leaves of cotton plants. **Journal of Plant Research**, v.126, n.2, p.293-304, 2013.

ZHU, C.; SCHRAUT, D.; HARTUNG, W.; SCHAFFNER, A.R. Differential responses of maize MIP genes to salt stress and ABA. **Journal of Experimental Botany**, v.56, n.421, p.2971-2981, 2005.