



**UNIVERSIDADE
FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
RENORBIO**

**EXPRESSÃO DE GENES RESPONSIVOS AO DÉFICIT HÍDRICO NA FASE
INICIAL DE CRESCIMENTO DO ALGODOEIRO**

VANDRÉ GUEVARA LYRA BATISTA

RECIFE-PE

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
RENORBIO

TESE DE DOUTORADO

**EXPRESSÃO DE GENES RESPONSIVOS AO DÉFICIT HÍDRICO NA FASE
INICIAL DE CRESCIMENTO DO ALGODOEIRO**

VANDRÉ GUEVARA LYRA BATISTA

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – RENORBIO na Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia na agropecuária

Orientador: Prof. Dr. Péricles de Albuquerque Melo Filho

Co-orientadoras: Dra. Liziane Maria de Lima e Dra. Roseane Cavalcanti dos Santos

RECIFE-PE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

B333e Batista, Vandr  Guevara Lyra
Expressão de genes responsivos ao déficit hídrico na fase
inicial de crescimento do algodoeiro / Vandr  Guevara Lyra
Batista. – 2018.
89 f.: il.

Orientador: Péricles de Albuquerque Melo Filho.

Coorientadora: Liziane Maria de Lima.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Gradua o em
Biotecnologia – RENORBIO, Recife, BR-PE, 2018.

Ponto focal em Pernambuco – Universidade Federal Rural
de Pernambuco.

Inclui referências e anexo(s).

1. Biotecnologia agrícola 2. Algodão 3. Genes 4. Plantas – Efeito
da seca 5. Genética molecular I. Melo Filho, Pericles de
Albuquerque, orient. II. Lima, Liziane Maria de, coorient. III. Título

CDD 620.8

TERMO DE APROVAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA RENORBIO

TESE DE DOUTORADO ELABORADA POR:

VANDRÉ GUEVARA LYRA BATISTA

Expressão de genes responsivos ao déficit hídrico na fase inicial de crescimento do algodoeiro

BANCA EXAMINADORA

Tese defendida e aprovada pela Banca examinadora em: 29 de Junho de 2018

Orientador:

Prof. Dr. *Péricles de Albuquerque Melo Filho*
Departamento de Agronomia - UFRPE

Co-orientadoras:

Dra. *Roseane Cavalcanti dos Santos*
Pesquisadora Embrapa Algodão – PB

Dra. *Liziane Maria de Lima*
Pesquisadora Embrapa Algodão – PB

Examinadores:

Dr. *José Jaime Vasconcelos*
Pesquisador Embrapa Algodão – PB

Prof. Dr. *José Luiz Sandes de Carvalho Filho*
Departamento de Fitotecnia – UFRPE

Prof. Dr. *Reginaldo de Carvalho*
Departamento de Biologia – UFRPE

Profa. Dra. *Vivian Loges*
Departamento de Agronomia – UFRPE

Dedico este trabalho a minha
família e a todos meus amigos.

Primeiramente a Deus, por ter me dado saúde e paz em todos os momentos e a minha família por todo incentivo e apoio.

Ao programa de doutorado RENORBIO, aos professores e funcionários pela realização do curso de pós-graduação.

Ao professor Dr. Péricles de Albuquerque Melo Filho pela orientação, suporte e confiança.

A professora Dr^a Liziane Maria de Lima, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado desde 2008, onde não faltaram palavras de incentivo, paciência, confiança e principalmente de conhecimento.

A professora Dr^a Roseane Santos, por sempre estar disponível em me ajudar, agradeço pelos ensinamentos e pelo suporte.

A Milena Silva Porto, minha esposa e companheira de jornada, por todo suporte emocional e companheirismo, imprescindíveis para alcançar meus objetivos.

Aos técnicos de laboratórios: Fábria, Terezinha, Juarez, Seu Amaro, Dione e Antônio; e a todos os funcionários da Embrapa Algodão

Aos meus estimados amigos de laboratório: Morganna, Taiza, Jean, Carliane, Valeska, Eveline, Silmara, Samara, Daniela, Allef, Bárbara, Geise, Wellisson, Fátima, Aline, Patrícia, Géssica, Jéssica, Camila, Talita, Digiane, Tiago, Bruno, Mizael, Luana e Marília pelo convívio sempre fraterno.

Aos colegas que conquistei no Doutorado.

A Embrapa Algodão, por toda estrutura fornecida.

A Capes pela bolsa concedida.

“O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário.”

Albert Einstein

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Algodoeiro Mocó (A) e Herbáceo (B).....	6
Figura 2. Efeitos da seca sobre plantas e suas respostas.....	10
Figura 3. Representação esquemática das vias de transdução de sinal celular que conduzem a partir da percepção do sinal a expressão do gene. Os genes <i>DREB1/CBF</i> são induzidos pelo estresse causado pelo frio, enquanto que <i>DREB2</i> são induzidos pelos estresses de desidratação e salino. Ambos trabalham em vias independentes de ABA. <i>CBF4</i> , <i>MYC/MYB</i> e <i>bZIP</i> são induzidos pela desidratação/estresse salino e trabalham em uma via dependente de ABA. <i>DREB1/CBF</i> e <i>DREB2</i> se ligam ao elemento <i>cis</i> -atuante DRE/CRT, <i>MYC/MYB</i> e <i>bZIP</i> aABRE.....	12
Figura 4. Proteínas induzidas durante o déficit hídrico e o frio e suas possíveis funções na tolerância em plantas sob estresse.....	13
Figura 5. Rede de fatores de transcrição R2R3-MYB caracterizados por seus papéis regulatórios em diferentes órgãos, tipos específicos de células e caminhos metabólicos em resposta ao estresse por seca. As setas de linha representam uma regulação positiva, enquanto a linha que termina com uma barra indica uma regulação negativa. Processos e caminhos relacionados a órgãos vegetativos, flor, raiz ou planta inteira são coloridos em verde, amarelo, laranja e rosa, respectivamente).....	19

CAPÍTULO II

Fig. 1. Activity of SOD and CAT in cotton plants submitted to water stress. 1, 4, 7 and 10 - Control; 2, 5, 8 and 11 - phase 1 (50% of stomata closure); 3, 6, 9 and 12 - phase 2 (80% of stomata closure).....	38
Fig. 2. Relative expression quantification of <i>GUSP1</i> e <i>MYB60</i> genes involved in water stress. 1, 4, 7 and 10 - No stress; 2 and 5 (4° DWS), 8 and 11 (3° DWS) - phase 1; 3 and 6 (7° DEH), 9 and 12 (6° DEH) - phase 2.....	40

CAPÍTULO III

Fig. 1. Cotton cultivars on the fifth day of stress water, with 50% of stomatal closure. A-FMT 701; B- FMT 705; C-FM 966; D- CNPA ITA 90; E- BRS 286; F- CNPA 5M; G- BRS SERIDÓ; H- BRS RUBI; I- CNPA 7MH. S- Stress; C- Control..... 57

Fig. 2. Relative value of transcripts *GUSPI* (A) and *MYB60* (B) by RT-qPCR in the control (C) and stress (S) treatments. 1- FMT 701, 2- FMT 705, 3- FM 966, 4- ITA 90, 5- BRS 286, 6- CNPA 5M, 7- CNPA 7MH, 8- BRS RUBI, 9- BRS SERIDÓ. Lower case compares among stressed genotypes (means tested by student's t-test, $p \leq 0.05$)..... 61

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Conjunto de dados das entradas de proteínas de estresse universal (USP) em UniProt.....	16
--	----

CAPÍTULO II

Table 1. Passport data of genotypes used in assays.....	35
Table 2. Sequences of specific and endogenous oligonucleotides used in RT-qPCR assays.....	37
Table 3. Relative losses (%) of growth traits in cotton genotypes submitted to 25 days of water suppression.....	38

CAPÍTULO III

Table 1. Cotton cultivars used in water stress tests.....	54
Table 2. <i>G. hirsutum</i> primer sequence used for the study with RT-qPCR.....	56
Table 3. Average Transpiration (<i>E</i>), Internal Carbon Concentration (<i>C_i</i>) and Photosynthesis (<i>A</i>) in cotton cultivars submitted to water stress.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

IRGA- Infrared Gas Analyser
EROs- Espécies reativas de oxigênio
SOD- Superóxido dismutase
CAT- Catalase
APX- Ascorbato peroxidase
MDHAR- Monodeidro ascorbato redutase
DHAR- Deidroascorbato redutase
GR- Glutathiona redutase
ABA- Ácido Abscísico
ABFs- ABRE binding factor /ABA responsive element binding protein
MYC/MYB- MYB/MYC domain protein
DREB- Drought responsive element binding
NAC- (NAM, ATAF1,2 and CUC) fatores de transcrição
CBF- C-repeat/DRE binding factor
LEA- Late Embryogenesis Abundant
NCED- 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenase
USP- Universal stress protein
BAD- Betaine aldehyde dehydrogenase
P5CS- Pyrroline-5-carboxylate synthetase
RT-qPCR- PCR em tempo real
CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento
ABRAPA- Associação Brasileira dos Produtores de Algodão
TFs- Fatores de transcrição
MAPKs- Proteínas quinases ativadas por mitógenos
CDPKs- Proteínas quinases ativadas por cálcio
ESTs- Expressed Sequence Tags

RESUMO

O algodoeiro tem alta adaptabilidade a condições adversas, contudo, um dos principais fatores para perdas na produção é o déficit hídrico. A utilização de ferramentas moleculares em conjunto com dados bioquímicos e fisiológicos tem elucidado algumas perguntas a respeito da complexidade de respostas das plantas ao estresse hídrico. Diante do exposto, a identificação de genes que compõem essa complexa cadeia é de grande importância. Objetivou-se nesse estudo determinar os efeitos do estresse hídrico sobre a expressão dos genes *GUSPI* e *MYB60* e sobre variáveis fisiológicas, bioquímicas e de crescimento na fase vegetativa (V1) de algodoeiros. Foram utilizados genótipos de algodoeiro *Gossypium hirsutum* oriundos do BAG da Embrapa Algodão. As sementes foram plantadas em tubetes. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 (genótipos) x 2 (irrigado e não irrigado), com 10 repetições. As trocas gasosas (*g*, *ci*, *E* e *A*) foram realizadas com um aparelho contendo IRGA (Infra Red Gás Analylser). Nas avaliações de crescimento foram mensuradas: altura da planta (ALT), diâmetro da haste (DH), número de folhas (NF), fitomassa da raiz (FITOR) e fitomassa da parte aérea (FITOA) aos 25 DEH. As atividades da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a expressão gênica via RT-qPCR foram analisadas em folhas. Em relação ao primeiro estudo todas as variáveis foram afetadas significativamente ($p < 0.05$) pelos tratamentos hídricos. Mocó 1 e CNPA Precoce 1 apresentaram reduções significativas nas variáveis NF, DC, FITOA e FITOR. SOD e CAT apresentaram comportamento semelhante em todos os genótipos, porém CNPA Precoce 1 apresentou o maior nível de atividade com 80-90% do fechamento estomático (fase 2), indicando que esse genótipo foi o mais afetado pelo estresse imposto. *GUSPI* aumentou gradativamente a expressão em todos os genótipos, destacando-se o Mocó 2 na fase 2, enquanto que *MYB60* apresentou um pico de expressão com 50% do fechamento estomático (fase 1), decaindo com a severidade do estresse. No segundo estudo as variáveis referentes as trocas gasosas não foram afetadas significativamente ($p < 0.05$), pois as mesmas foram realizadas na fase 1. Os genótipos adaptados ao semi árido nordestino apresentaram as menores reduções das variáveis fisiológicas, indicando maior tolerância ao estresse hídrico. Para o estudo de expressão gênica, *GUSPI* apresentou os maiores níveis nesses mesmos genótipos, o contrário foi observado para o gene *MYB60*, onde os genótipos relativamente mais sensíveis apresentaram os maiores

níveis de expressão, dados esses que corroboram com trabalhos envolvendo os genes estudados. De acordo com os resultados, os genes podem contribuir para seleção de materiais mais tolerantes ao estresse hídrico, visto que conseguiram identificar os genótipos mais tolerantes logo no início do crescimento (fase V1), tornando tal estratégia mais prática em função da identificação mais precoce.

Palavras-chave: Genes *GUSP1* e *MYB60*, RT-qPCR, SOD, CAT, algodão perene.

ABSTRACT

The cotton has high adaptability to adverse conditions, however, one of the main factors for losses in production is the water deficit. The use of molecular tools in conjunction with biochemical and physiological data has elucidated some questions regarding the complexity of plant responses to water stress. In view of the above, the identification of genes that make up this complex chain is of great importance. The objective of this study was to determine the effects of water stress on GUSP1 and MYB60 gene expression and on physiological, biochemical and growth variables in the vegetative (V1) phase of cotton plants. *Gossypium hirsutum* genotypes from Embrapa Cotton BAG were used. The seeds were planted in tubes. The experimental design was completely randomized, in a factorial scheme 4 (genotypes) x 2 (irrigated and non-irrigated), with 10 replications. The gas exchanges (g , ci , E and A) were performed with an apparatus containing IRGA (Infra Red Gas Analyser). Plant height (ALT), stem diameter (DH), number of leaves (NF), root phytomass (FITOR) and shoot phytomass (FITOA) were measured at 25 DEH. The activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and gene expression via RT-qPCR were analyzed in leaves. In relation to the first study all variables were significantly affected ($p < 0.05$) by water treatments. Mocó 1 and CNPA Precoce 1 showed significant reductions in the variables NF, DC, FITOA and FITOR. SOD and CAT presented similar behavior in all genotypes, but CNPA Precoce 1 presented the highest level of activity with 80-90% of stomatal closure (phase 2), indicating that this genotype was the most affected by the stress imposed. GUSP1 gradually increased expression in all genotypes, especially Moc 2 in phase 2, while MYB 60 showed a peak expression with 50% of the stomatal closure (phase 1), decreasing with the severity of the stress. In the second study, the variables related to gas exchange were not significantly affected ($p < 0.05$), since they were performed in phase 1. The genotypes adapted to the northeastern semi-arid region presented the smallest reductions in physiological variables, indicating a higher tolerance to water stress. For the study of gene expression, GUSP1 presented the highest levels in these same genotypes, the opposite was observed for the MYB60 gene, where the relatively more sensitive genotypes showed the highest levels of expression, data that corroborate with studies involving the genes studied. According to the results, the genes can contribute to the selection of materials more tolerant to water stress, since they were

able to identify the most tolerant genotypes at the beginning of the growth phase V1, making this strategy more practical due to the earlier identification

Key words: *GUSP1* and *MYB60* genes, RT-qPCR, SOD, CAT, perennial cotton.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO I.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. ASPECTOS GERAIS DA CULTURA DO ALGODOEIRO.....	4
2.2. ESTRESSE HÍDRICO NO ALGODOEIRO.....	6
2.3. GENES RESPONSIVOS A ESTRESSE HÍDRICO.....	10
2.3.1. <i>GUSP1</i>	14
2.3.2. <i>MYB60</i>	17
3. REFERÊNCIAS.....	20
CAPÍTULO II.....	30
ARTIGO 1.....	32
CAPÍTULO III.....	51
ARTIGO 2.....	53
4. CONCLUSÃO.....	70
ANEXO 01.....	71
ANEXO 02.....	72

CAPÍTULO I

Revisão de Literatura

1. Introdução

A cotonicultura é uma das principais culturas agrícolas tanto no aspecto cultural quanto econômico, em nível mundial. A fibra é o principal produto, de grande relevância para indústria têxtil em todo o mundo.

De acordo com a CONAB (2017), na safra 2016/17 a área plantada foi de 939,1 mil hectares no Brasil. A região Centro-Oeste detém a maior parte dessa produção (72%), seguida da região Nordeste com 22,8%. Em relação à produtividade, no Brasil, houve uma retomada no crescimento com um aumento de 11% em relação à safra anterior (CONAB, 2017). Grande parte dessa retomada, vem da adoção de novas tecnologias especificamente cultivares de alta produtividade e adaptação ambiental.

As plantas estão constantemente submetidas aos mais variados estresses ambientais, sejam eles de origem biótica (pragas e doenças), como de origem abiótica (estresse por calor, frio, radiação e hídrico); tais estresses afetam diretamente a produção, em especial o estresse hídrico.

Diante dos vários estresses abióticos que podem ocorrer durante o cultivo do algodoeiro, os genótipos respondem diferentemente quanto à tolerância, revelando sintomas variados ao longo do crescimento e desenvolvimento das plantas (PARIDA et al., 2007).

A seca é um dos principais fatores que afeta o desenvolvimento das plantas, prejudicando a produtividade das culturas em geral. Tal condição induz um conjunto de respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares nas plantas, dependendo da intensidade e da duração do estresse, dos efeitos interativos com outros tipos de estresse, do estágio de desenvolvimento e do genótipo (Meneses et al., 2006). O impacto da seca na agricultura é uma importante consequência socioeconômica que afeta milhões de pessoas ao redor do mundo (ELLIOTT et al., 2013).

O estresse hídrico pode afetar a produção de algodão, principalmente nas etapas de pré-florescimento e de enchimento das maçãs. O estresse no início do crescimento pode acarretar em redução da expansão das raízes, tamanho dos botões florais e das posições frutíferas, conseqüentemente, capulhos menores e em menor número.

No algodoeiro, vários sinais são ativados na célula em resposta aos danos provocados pela falta de água. Fenotipicamente percebe-se alterações no crescimento, com reflexo na fibra e produção (LOKA et al., 2011), em nível fisiológico, alterações são registradas na fotossíntese e trocas gasosas (KUMAR et al., 2001).

De acordo com a literatura, o algodoeiro possui um mecanismo bioquímico complexo para monitorar a homeostase redox das células, de modo a evitar o excesso de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). Alterações no metabolismo de enzimas antioxidativas (catalase, superóxido desmutase, ascorbato peroxidase, etc), como também o balanço osmótico por meio do aumento de açúcares (trealose e fructanos) e aminoácidos (prolina e glicina) podem influenciar a tolerância à seca no algodão (DAS e ROYCHOUDHURY, 2014; FANG e XIONG, 2015).

No que se refere à resposta molecular, o algodoeiro possui várias vias de transdução de sinais em resposta ao estresse por seca. Alguns dos genes que são induzidos por esse tipo de estresse já foram identificados e caracterizados, inclusive as vias de sinalização e regulação, mas em comparação com *Arabidopsis thaliana*, a quantidade de dados sobre tais genes e suas funções, ainda é insuficiente. Estudos com *A. thaliana* mostraram que a percepção inicial do déficit hídrico é mediada por uma histidina quinase transmembrana (AtHK1A). Esta proteína faz o papel de um sensor, detectando mudanças no potencial osmótico dentro da célula e induzindo a expressão de genes relacionados ao estresse hídrico (RIERA, 2005), dentre eles, genes que sintetizam fatores de transcrição (FTs) (YANG et al., 2009). Estes FTs desempenham um importante papel na resposta das plantas a estresses, regulando diversas vias de sinalização através da sua ligação a elementos *cis* que atuam na região promotora de genes, fazendo com que tais genes sejam ativados (YAMAGUCHI et al., 2006).

Um dos principais FT relacionado ao estresse hídrico é o MYB, ele está diretamente envolvido com a regulação dos movimentos estomáticos, (COMINELLI et al., 2005; GALBIATI et al., 2011; OH et al., 2011; BALDONI et al., 2015). De acordo com Cominelli et al. (2005), em *A. thaliana* o gene *AtMYB60* foi regulado negativamente à medida que aumentava o tempo de exposição ao ABA exógeno. Resultados similares foram encontrados por Huang et al. (2007) e Jaradat et al. (2013) com o gene *AtMYB44*. Já sob condição de estresse hídrico, plantas de *A. thaliana* apresentaram regulação positiva tanto para o gene *AtMYB44* (Jung et al., 2008), quanto para dois mutantes do gene *AtMYB60* (OH et al., 2011).

Além de FTs, vários genes como *LEA*, *NCED*, *IRX1*, *USP* entre outros, estão envolvidos na resposta de plantas ao déficit hídrico (MAQBOOL et al., 2009; ISOKPEHI et al., 2011; JUNG et al., 2015; SOUZA et al., 2016). A proteína de estresse universal (USP) é uma proteína regulada positivamente quando a célula é exposta a agentes de estresse, como déficit hídrico, apoxia, frio, salinidade, entre outros; sua

função é aumentar a taxa de sobrevivência das células durante a exposição prolongada a estas condições de estresse (SAUTER et al., 2002; MAQBOOL et al., 2009).

Isokpehi et al. (2011) em trabalho envolvendo um conjunto de dados gerados por *microarrays*, identificaram dois genes *USP* em *Arabidopsis*, *At3g62550* e *At3g53990*, que codificam um motivo de ligação ATP regulado positivamente sob estresse hídrico. Em *Gossypium arboreum*, Maqbool et al. (2009) identificaram dois genes, *GUSP1* e *GUSP2*, sob estresse hídrico; os ensaios revelaram um alto nível de expressão do gene *GUSP* em folhas, raízes e hastes, exclusivamente nas plantas após o estresse hídrico. Os níveis mais elevados de expressão induzível pela seca foram encontrados nas folhas.

Apesar da complexidade do mecanismo de tolerância à seca no algodão, grande progresso foi alcançado no que diz respeito a adaptações morfofisiológicas, bioquímicas e moleculares, tais como: aumento do crescimento das raízes, produção de ceras cuticulares, regulação osmótica para manter a turgescência das folhas e raízes, produção de proteínas de estresse, etc (ACKERSON et al. 1981; COOK et al. 1992; SARWAR et al. 2017). No entanto, são necessários mais estudos no intuito de interligar a fisiologia com a biologia dos sistemas e o desempenho no campo.

Diante da temática apresentada, objetivou-se neste trabalho avaliar e validar a expressão dos genes *GUSP1* e *MYB60* durante o crescimento inicial de genótipos de algodão via PCR em tempo real, como também, avaliar o comportamento desses genótipos por meio de caracteres de crescimento, fisiológicos e bioquímicos.

2. Revisão de literatura

2.1. Aspectos gerais da cultura do algodoeiro

O algodoeiro é uma espécie dicotiledônea pertencente à família *Malvaceae*. O gênero *Gossypium* é constituído por mais de 50 espécies, contudo, apenas quatro são cultivadas: *G. arboreum* L. – do tipo arbóreo, nativo da Ásia meridional e *G. herbaceum* L. – do tipo herbáceo, nativo do sul da África, ambos diploides ($2n = 2x = 26$); *G. hirsutum* L. – do tipo herbáceo (*upland*), nativo da América Central, Caribe e sul da Florida e *G. barbadense* L. – do tipo arbustivo, nativo da América do Sul, ambos alotetraploides ($2n = 4x = 52$) (BELTRÃO e SOUZA, 2001).

A poliploidia frequentemente confere propriedades superiores, como maior produtividade e melhor qualidade de fibra no algodão tetraplóide quando comparado ao diploide, domesticados para os mesmos ambientes.

A origem do genoma do algodão é de 60 milhões de anos atrás a partir da diferenciação de um ancestral em comum de cacau, a linhagem do algodão experimentou um aumento abrupto de cinco a seis vezes a ploidia até o aparecimento do algodão alotetraploide a cerca de 2 milhões de anos (CARVALHO et al. 2011)

Os diploides do genoma A, nativos da África, e os diploides do genoma D (mexicano) divergiram de 5 a 10 milhões de anos atrás onde posteriormente foram reunidos por dispersão transoceânica, entre 1 e 2 milhões de anos, por meio de um propágulo materno A-genoma semelhante ao *G. herbaceum*, hibridizado com uma espécie de genoma D semelhante ao *G. raimondii*. A partir desse evento houve a duplicação cromossômica, surgindo assim o alotetraploide At Dt que se espalhou pelos trópicos divergindo para pelo menos 5 espécies diferentes, que foram se diferenciando nas espécies atuais, gerando uma das plantas mais importantes para indústria têxtil mundial (WENDEL, 1989; SENCHINA et al., 2003).

O algodoeiro cultivado é anual, herbáceo e crescimento indeterminado, intermeando eventos vegetativos e reprodutivos durante o ciclo, com produção variável de capulhos. As flores são completas com presença de gametófitos masculino e feminino na mesma flor. Em relação ao meio de propagação, Beltrão e Souza (2001) explicaram que a principal via de propagação é por intermédio de sementes. No que diz respeito à polinização e a fecundação, o algodoeiro é classificado como uma planta autógama, embora a taxa de cruzamento natural possa atingir 50% ou mais. Possui

ovário multiovular com três a cinco lóculos, cada um contém entre 20 e 40 óvulos, nos quais dão origem as sementes. Após fertilização o fruto é formado e denominado maçã, dando início ao processo de desenvolvimento das fibras, que são tricomas das sementes, formados por uma única célula que se projeta para fora da epiderme. As fibras contêm mais de 95% de celulose, além de proteínas, substâncias pécicas e cera. Quando há o maturamento da maçã as fibras se encontram completamente desenvolvidas passando a ser chamada de capulho (VASCONCELOS, 2018).

Em relação a fisiologia da espécie, trata-se de uma planta de metabolismo fotossintético C3, apresentando alta taxa de fotorrespiração, podendo chegar a mais de 50% da fotossíntese absoluta, não se saturando em campo com níveis máximos de radiação solar (BELTRÃO e SOUZA, 2001). O algodoeiro possui baixa eficiência na transformação da energia luminosa em energia química potencial por meio da fotossíntese, sendo inferior a 1,5%, como também baixa eficiência de partição de assimilados (BELTRÃO e SOUZA, 2001).

Em relação ao crescimento, a água é de extrema importância, cerca de 95% da água absorvida é usada para manutenção da temperatura do dossel, ou seja, para resfriar a planta, visto que a manutenção dessa temperatura deve ocorrer entre 23,5°C a 30°C para que a atividade enzimática seja favorável ao bom desempenho fotossintético, e consequentemente a uma boa produtividade (CONATY et al., 2012). A água também tem grande importância no que diz respeito à turgescência celular. A diminuição na oferta de água afeta diretamente a expansão foliar e alongamento das raízes, consequentemente, o crescimento (TAIZ e ZEIGER, 2016).

Dentre as quatro espécies, destaca-se *G. hirsutum* L., representando cerca de 95% da produção de fibra em todo o mundo (FREIRE, 2007; CARVALHO, 2008). Esta espécie originou a maioria das variedades de algodão cultivadas, representadas no Brasil pela raças: *G. hirsutum* L. var. *latifolium* Hutch (herbáceo) e o *G. hirsutum* L. var. *marie galante* Hutch (arbóreo - mocó) (Figura 1) (FREIRE, 2007).

Em relação as cultivares atuais de algodoeiro, de acordo com documento oficial do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio do Registro Nacional de Cultivares (RNC), existem 223 cultivares de algodoeiro registradas, aptas ao cultivo no Brasil, das quais 27 são da variedade *latifolium* e 2 da variedade *marie galante* (MAPA, 2017).



Figura 1. Algodoeiros mocó (A) e herbáceo (B).

Fonte: (papjerimum.blogspot; tribuna10; guarapua.blogspot)

Em média, no mundo é plantado cerca de 35 milhões de hectares de algodão, distribuído em mais de 60 países, nos cinco continentes. Economicamente, o algodoeiro movimenta cerca de 12 bilhões de dólares por ano. A Índia é o principal produtor, seguida da China e Estados Unidos; o Brasil se posiciona em quinto lugar com 6% da produção de pluma do mundo. Os estados brasileiros de maior produção são, em ordem de produtividade: Mato-Grosso, Bahia e Goiás (ABRAPA, 2017; CONAB, 2017).

De acordo com a CONAB (2017), a produção de algodão envolve maquinaria pesada, altamente tecnificada e tecnologia de ponta. A pluma do algodão beneficiada passa por vários testes, como classificação visual, comprimento de fibra e resistência. O caroço do algodão também é comercializado e serve como matéria-prima para a produção de ração, óleo e biocombustível.

2.2. Estresse hídrico no algodoeiro

Durante a fase de desenvolvimento da planta, vários tipos de estresses podem ocorrer, alguns intrínsecos, relacionados ao próprio metabolismo e outros extrínsecos, oriundos de agentes externos, dentre eles o hídrico. O estresse hídrico é um dos mais

danosos dependendo da fase em que ocorre e da intensidade, podendo comprometer a produção (MAHAJAN e TUTEJA, 2005; FAROOQ et al., 2009; PEREIRA et al., 2012).

De acordo com Larcher (2006), o estresse é considerado um desvio significativo das condições ótimas para a vida, e induz a mudanças e respostas em todos os níveis funcionais do organismo, as quais são reversíveis a princípio, mas podem se tornar permanentes.

O estresse hídrico restringe severamente o crescimento e o desenvolvimento do algodão, afetando a altura da planta, fitomassa da folha, do caule, índice de área foliar, número de nós, qualidade da fibra, desenvolvimento do dossel e raiz (LOKA et al., 2011). Especificamente, a taxa de fotossíntese líquida, a taxa de transpiração, a condutância dos estômatos, a eficiência de carboxilação e o potencial de água das folhas de algodão diminuem significativamente durante as condições de seca (KUMAR et al., 2001). Em trabalho com algodoeiro *G. barbadense*, Hejnák et al. (2015) estudaram os efeitos prejudiciais do estresse por seca. De acordo com os resultados, a acumulação de 50% de matéria seca foi limitada devido ao estresse como também a condutância estomática, a taxa fotossintética e a taxa de transpiração diminuíram sob déficit de água.

De maneira geral, as plantas possuem diferentes estratégias para enfrentar o déficit hídrico (FANG e XIONG, 2015): (i) evasão da seca, é a manutenção de processos fisiológicos chave, como regulação dos estômatos e desenvolvimento do sistema raiz durante condições moderadas de seca; (ii) tolerância à seca, é a capacidade das plantas para suportar a perda severa de água por meio de atividades fisiológicas específicas, como ajuste osmótico via osmoprotetores (LUO, 2010); (iii) escape à seca, é a capacidade das plantas no ajuste de seu período de crescimento ou ciclo de vida, para evitar o estresse por seca (MANAVALAN et al., 2009); e (iv) recuperação da seca, é a capacidade de retomar o crescimento e produzir depois da exposição severa a condições de estresse por seca. Dentre essas, a evasão à seca e a tolerância à seca são as principais estratégias contra esse tipo de estresse (FANG e XIONG, 2015).

Por ser cultivada largamente em regiões semiáridas, a planta do algodão desenvolveu ao longo dos anos estratégias morfofisiológicas para se adaptar ao estresse por seca, como a regulação dos estômatos, desenvolvimento de raízes em profundidade, ajustamento osmótico, além de mecanismos moleculares (ULLAH et al., 2017). A regulação estomática desempenha um papel fundamental na troca de gases entre os tecidos e a atmosfera (WANG et al., 2009). A diminuição da água no solo ocasiona

redução no potencial hídrico da folha, acúmulo de ácido abscísico (ABA) e fechamento estomático reduzindo a transpiração. Cerca de 90% da perda de água por transpiração ocorre através dos estômatos (WANG et al., 2009). No algodoeiro, o fechamento estomático é a primeira resposta da perda de água em condições de déficit hídrico. De acordo com Taiz e Zaiger (2016), a síntese e distribuição do ABA é muito eficaz no fechamento dos estômatos e seu acúmulo em folhas estressadas tem um importante papel na diminuição da perda de água em estresse hídrico. A condutância estomática pode ser um indicador potencial de tolerância a seca em algodão, visto que existe uma correlação negativa entre a tolerância a seca e a condutância dos estômatos (ULLAH et al., 2017).

A transdução de sinal desencadeada pela percepção do componente osmótico do estresse pode ser mediada por duas vias de sinalização distintas: uma dependente do ABA e outra independente do ABA (TAIZ E ZAIGER, 2016). As vias de sinalização dependentes do ABA desempenham um papel crítico na expressão de genes estresse-responsivos durante a ocorrência de vários tipos de estresses, como estresse por sal e estresse hídrico (ULLAH et al., 2017).

O estresse hídrico tem efeitos negativos sobre o equilíbrio osmótico. As plantas acumulam diferentes substâncias orgânicas e inorgânicas para reduzir o potencial osmótico em resposta ao estresse (FANG e XIONG, 2015). Essas substâncias auxiliam na proteção de proteínas e membranas dos danos oxidativos causados pelo estresse hídrico (CHEN e MURATA, 2011). Em resumo, o ajustamento osmótico é um processo pelo qual o potencial hídrico pode ser diminuído, sem que as células percam o turgor ou o seu volume. Como a turgescência é mantida, outros processos como condutância estomática, fotossíntese e alongamento celular também são mantidos em potenciais hídricos mais baixos. Com isso pode-se sugerir que o ajustamento osmótico é uma aclimatação que aumenta a tolerância ao déficit hídrico (NEPOMUCENO et al., 2001; TAIZ e ZEIGER, 2016).

Em condição de estresses, as plantas naturalmente produzem compostos nas células denominados EROs, que consistem basicamente em quatro formas: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($HO\bullet$), radical anion superóxido (O_2^-) e oxigênio singlete (1O_2). Tais substâncias são nocivas às células, podendo oxidar vários componentes celulares, como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, ocasionando a morte celular caso a oxidação não seja controlada (FANG e XIONG, 2015). Para combater o excesso desses compostos, as células ativam o sistema antioxidativo de duas

formas: vias enzimáticas, por meio da catalase (CAT), superóxido desmutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), glutatona redutase (GR), etc.; e as vias não-enzimáticas, como ácido ascórbico (AA), flavonóides, carotenóides, aminoácidos, etc. (DAS e ROYCHOUDHURY, 2014). A via enzimática inicia-se com a SOD desmutando o radical O_2^- para H_2O_2 , este, por sua vez, sofre ação de várias enzimas como a CAT, responsável pela conversão do H_2O_2 a H_2O e O_2 , e as peroxidases, APX e guaiacol peroxidase (GPX) que reduzem o H_2O_2 a H_2O (APEL e HIRT, 2004). O equilíbrio entre a produção de EROs e as atividades antioxidativas determinam se a sinalização e/ ou danos oxidativos ocorreram (ZHANG et al., 2014).

Em trabalho com dois genótipos de algodoeiro *G. hirsutum* um moderadamente tolerante e outro sensível a seca, após estresse hídrico por 7 dias, Parida et al. (2007) observaram um aumento significativo dos aminoácidos livres totais, prolina, açúcares e polifenóis no genótipo tolerante comparado ao sensível, sugerindo que tais compostos atuam como principais solutos compatíveis em algodão, a fim de manter o equilíbrio osmótico, proteger as macromoléculas celulares, desintoxicar as células e eliminar os radicais livres sob condições de estresse hídrico.

Rodrigues et al. (2016) trabalhando com genótipos de algodão com vários níveis de tolerância a seca sob estresse hídrico por 7 dias, constataram que os algodoeiros considerados mais tolerantes, BRS 286, CNPA 7MH e CNPA 5M, apresentaram maior capacidade de crescimento sob limitação de água e também melhor desempenho das enzimas antioxidativas para evitar danos celulares.

Na figura 2 se encontra uma rede de eventos envolvendo o efeito do estresse hídrico sobre o meio celular e as respostas associadas, induzidas pelas plantas quando o sinal de déficit hídrico é reconhecido.

No aspecto molecular as plantas desenvolveram várias adaptações ao meio ambiente. Essa adaptação é oriunda de uma série de redes moleculares, consistindo em percepção do estresse, transdução de sinal e expressão de genes específicos relacionados ao estresse (ULLAH et al., 2017). O primeiro passo da rede molecular em resposta a um sinal ambiental (como um déficit hídrico) é a sua percepção por receptores específicos, denominados proteínas quinases, que podem ser de vários tipos, dentre elas, proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e ativadas por cálcio (Ca^{+2}) (CDPKs). Após a ativação, estes receptores iniciam (ou suprimem) uma resposta em cascata e transmitem a informação por meio de uma via de transdução de sinal (CHAVES et al. 2003). Uma dessas proteínas quinases bastante conhecida é a AtHTK1 (URAO et al.

1999). De acordo com Urao et al. (1999), essa proteína transmembrana tem um papel de osmossensor em *A. thaliana*, quando a planta é exposta a estresse por déficit hídrico, ela desencadeia uma cascata de sinalização que resulta em uma desidratação induzida via expressão de genes responsivos ao estresse.

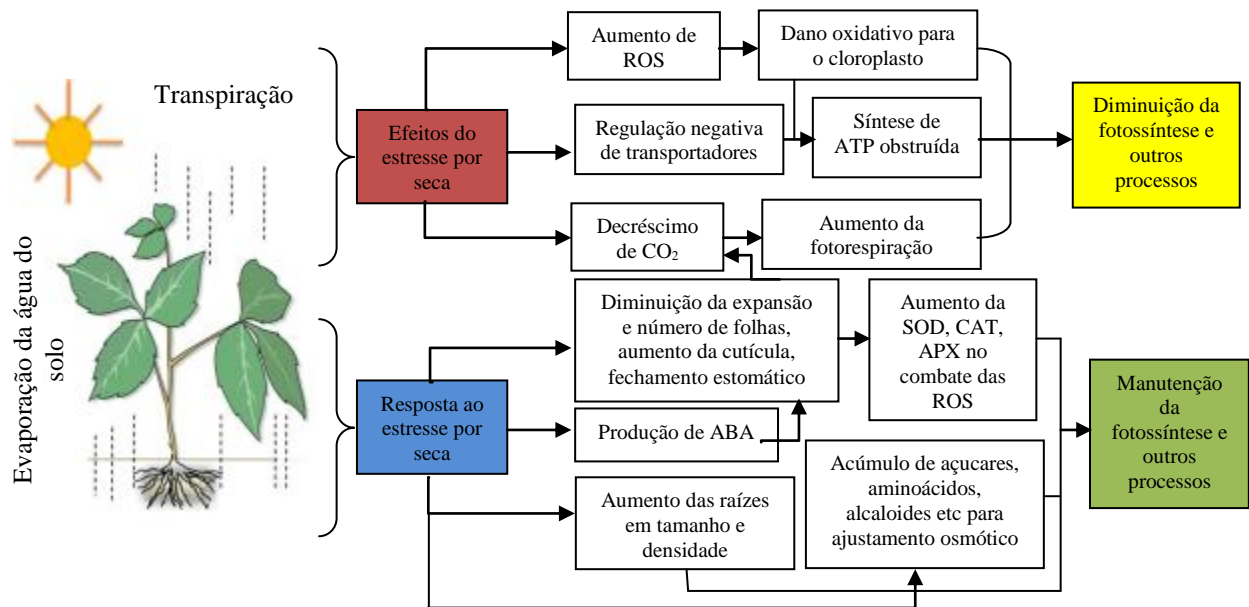


Figura 2. Efeitos da seca sobre plantas e suas respostas. Fonte: Adaptado de Ullah et al. (2017).

A cascata de MAPK é uma das principais estratégias desenvolvidas por plantas contra os vários tipos de estresses bióticos e abióticos. Os genes que compõem essa cascata participam na transdução de sinal de estímulos extracelulares e regula a resposta da planta a tais estímulos. A via MAPK é um regulador central altamente conservado de vários processos, incluindo respostas hormonais, divisão celular, apoptose e respostas ao estresse (ULLAH et al., 2017). Esta complexidade e *cross-talk* encontradas em cascatas de sinalização são típicas da sinalização eucariótica, tal complexidade reflete a riqueza da interação entre a expressão gênica e os processos fisiológicos mediadores das adaptações aos estresses (TAIZ e ZEIGER, 2016).

2.3. Genes responsivos a estresse hídrico

Genes responsivos ao estresse podem ser regulados por processos ABA-dependentes ou ABA-independentes (TAIZ e ZEIGER, 2016). A transcrição desses genes é controlada por proteínas reguladoras (FTs) (Figura 3) com sequências

reguladoras específicas nos promotores dos genes que elas regulam (elementos *cis* e *trans*). Genes diferentes induzidos pelo mesmo sinal (déficit hídrico, frio, etc.) são controlados por uma rota de sinalização que leva a ativação desses FTs específicos. A manipulação dos FTs tem sido muito utilizada para aumentar a tolerância à seca, ao contrário da maioria dos genes estruturais, os FTs controlam várias etapas na resposta das plantas aos estresses, surgindo como ferramentas poderosas para a manipulação dos complexos caminhos metabólicos nas plantas. Uma dessas classes de TFs é o DREB / CBF que se liga a elementos de ação *cis* responsivos à seca (HUSSAIN et al., 2011).

No que diz respeito ao algodão, vários trabalhos têm reportado sobre FTs envolvidos na resposta das plantas ao déficit hídrico como: o ERF, FT responsivo ao etileno exógeno, sal, frio, seca e tratamento de ácido abscísico exógeno, sugerindo que tal fator responde a vários tipos de estresses ambientais; o NAC também responsivo a vários tipos de estresses, incluindo estresse por calor, está envolvido na regulação transcricional da senescência foliar; o MYB, intimamente envolvido na regulação do movimento estomático por se encontrarem nas células guarda, com isso, reguladores da perda de água das células para o meio externo; o bZIP atua em resposta ao ABA, induzido por estresse por seca e sal; comportamento semelhante pode-se observar para o WRKY, responsivo a estresses induzidos pelo ABA (JIN e LIU, 2008; SHAH et al., 2013; CHEN et al., 2015; LIANG et al., 2016; ULLAH et al., 2017b).

Recentemente, o gene *GhABF2* que codifica para o fator de transcrição bZIP, foi relacionado a tolerância à seca e à salinidade em *A. thaliana* e algodão. A análise transcriptômica revelou que *GhABF2* está relacionado ao ABA e sua alta expressão em plantas de algodão sob condições de estresse hídrico e salinidade aumentaram as atividades de SOD e CAT. Além disso, as plantas superexpressando tal gene apresentaram melhores resultados no campo, com rendimento mais alto do que plantas sem estresse (LIANG et al., 2016). O gene *GbMYB5*, que codifica o fator de transcrição MYB do tipo R2R3, quando investigado em tabaco, esteve positivamente envolvido na resposta ao estresse por seca. A alta expressão reduziu a perda de água ao diminuir o tamanho dos estômatos e aumentou a taxa de sobrevivência após o estresse, quando comparado às plantas não estressadas (CHEN et al., 2015).

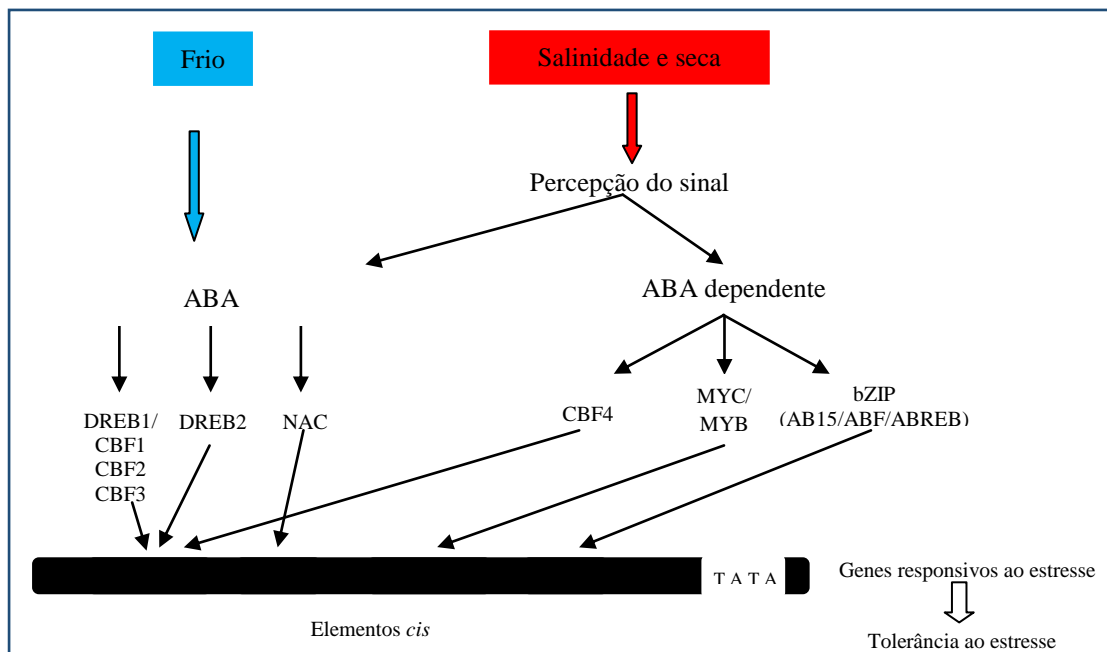


Figura 3. Representação esquemática das vias de transdução de sinal celular que conduzem, a partir da percepção do sinal, a expressão de genes. Os genes *DREB1/CBF* são induzidos pelo estresse causado pelo frio, enquanto que *DREB2* é induzido pelos estresses de desidratação e salino. Ambos trabalham em vias independentes de ABA. *CBF4*, *MYC/MYB* e *bZIP* são induzidos pela desidratação, estresse salino e trabalham em uma via dependente de ABA. *DREB1/CBF* e *DREB2* se ligam aos elementos *cis*-atuante DRE/CRT, *MYC/MYB* e *bZIP* a ABRE. Fonte: Adaptado de Khan (2011).

Plantas modelo como *A. thaliana* e Arroz têm sido amplamente utilizadas para desvendar as bases moleculares da tolerância ao estresse. Em especial, *A. thaliana* provou ser extremamente importante para avaliar as funções dos genes associados ao estresse individual devido à disponibilidade de mutantes *knockout* e à sua capacidade de transformação genética. Um número considerável de genes envolvidos em estresse por seca tem sido identificados como o *RD22*, *Gly*, *RD29B*, *RD20A*, *ERD1*, *GUSP1*, *GUSP2*, etc (BARTELS e SUNKAR, 2005; SHINOZAKI et al., 2007; MAQBOOL et al., 2009).

Em estudos com *A. thaliana*, os genes induzidos por seca são divididos em dois grupos: o primeiro grupo inclui genes que codificam proteínas funcionais que provavelmente funcionam efetivamente na tolerância a estresses abióticos, incluindo: (i) chaperonas, que são proteínas que atuam no processo de compactação e descompactação de outras proteínas, como também na degradação de proteínas que apresentaram erro; (ii) proteínas LEA, que tem funções de proteção de membrana como também age como chaperona; (iii) osmotinas, com várias funções, dentre elas atuam na

recuperação celular após estresse térmico e uma função específica na biossíntese do aminoácido prolina; (iv) proteínas de ligação ao mRNA; (v) enzimas chave para a biossíntese de osmólitos, como a própria osmotina; (vi) aquaporinas, que são canais proteicos presentes na membrana plasmática das células para passagem de água entre o meio intra e extracelular, etc. O segundo grupo é constituído por proteínas reguladoras, ou seja, proteínas envolvidas na regulação da transdução de sinal e expressão de genes responsivos ao estresse, como: (i) FTs, que são, de forma geral, proteínas reguladoras da transcrição gênica; (ii) proteínas quinases e fosfatases, proteínas sinalizadoras de diversos tipos de estresses; (iii) enzimas envolvidas na biossíntese do ABA, como é o caso da enzima 9-cis-epoxicarotenóide dioxigenase (NCED), precursora do hormônio no citosol (figura 4) (SHINOZAKI et al., 2007).

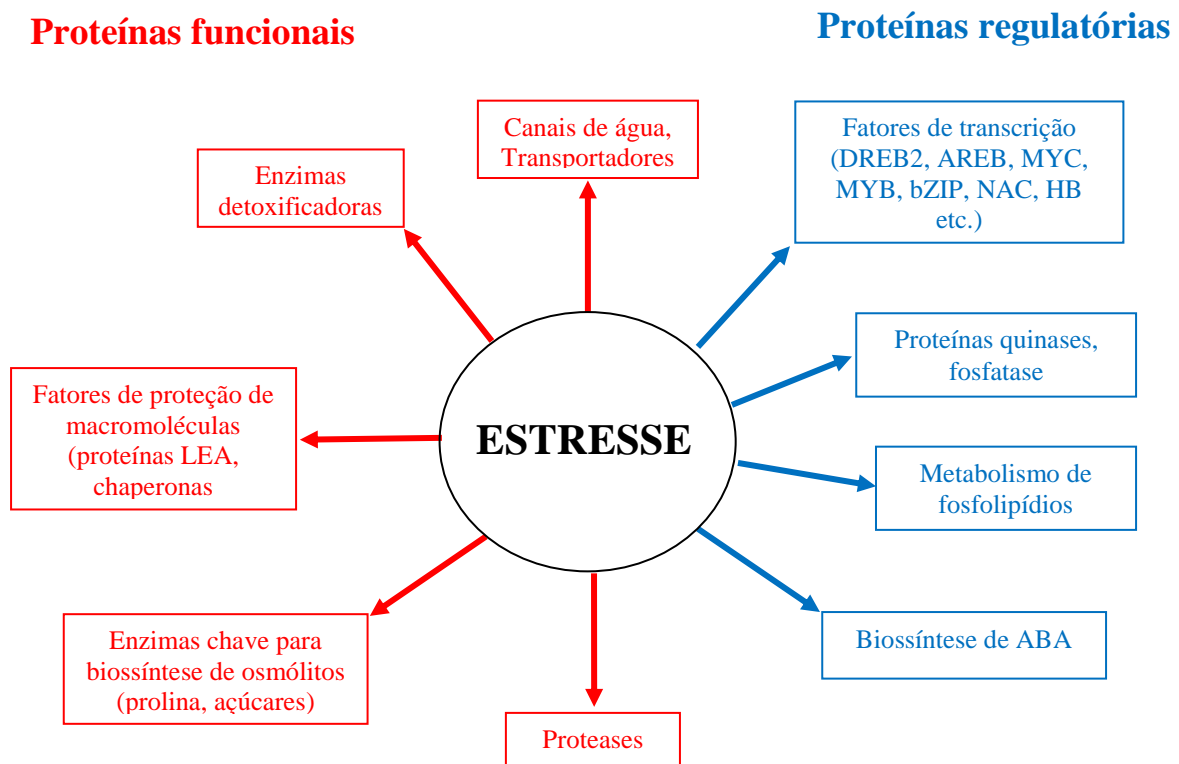


Figura 4. Proteínas induzidas durante o déficit hídrico e o frio e suas possíveis funções na tolerância em plantas sob estresse. Fonte: Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki (2007).

As análises de expressão gênica têm ampliado a compreensão das respostas moleculares e da interação dos genótipos em determinado por ambiente. Muitos genes

descritos relacionados ao estresse hídrico foram identificados por meio de expressão heteróloga, microarranjos, bibliotecas de genes e data mining (SAUTER et al., 2002; MAQBOOL et al., 2009; LI et al., 2010; OH et al., 2011; LOUKEHAICH et al., 2012; CHEN et al., 2015; SOUZA et al., 2016). Além de qRT-PCR, uma das técnicas preferidas para análise e quantificação de transcritos de baixo ou alto nível de expressão, por ser uma técnica muito sensível e relativamente fácil (MORGANTE et al., 2011).

2.3.1. *GUSP1*

Genes da família USP foram caracterizados em várias espécies vegetais, como *Astragalus sinicus* onde foi identificado o gene *AsD243* que apresentou expressão em todos os órgãos das plantas sob estresse (CHOU et al., 2007); em arroz, um gene denominado *OsUSP1*, apresentou resposta ao hormônio etileno, sugerindo uma função potencial na adaptação de plantas submersas, o que caracteriza estresse por hipoxia (SAUTER et al., 2002); em algodoeiro da espécie *G. arboreum* submetido a estresse hídrico, foram identificados dois genes responsivos ao estresse, *GUSP1* e *GUSP2* apresentando expressão em folhas, estame e raízes (MAQBOOL et al., 2009); em cevada também foram identificados genes via data mining, onde foram investigados a expressão e a localização sob plantas em condições de estresse salino (LI et al., 2010).

De acordo com Maqbool et al. (2009) a homologia entre genes *USP* conhecidos de outras plantas e de *G. arboreum* é suficiente para considerar ambos os genes isolados como membros da mesma família. Pesquisas de homologia revelaram que as proteínas do tipo USP estão presentes em plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas, codificados por famílias de genes com pelo menos 10 membros em arroz e 17 em *Arabidopsis*, localizados nos cinco cromossomos (SAUTER et al., 2002). Essas proteínas são reguladas positivamente quando as células são expostas a agentes de estresse como a seca, frio, altas temperaturas, alta salinidade, etc (NYSTROM e NEIDHARDT 1992, 1993, 1994).

Os membros da família USP são conservados filogeneticamente em procariotos, fungos, protistas e plantas conferindo habilidades para responder a uma ampla gama de estresses ambientais. Kerk et al. (2003) examinaram a sequência de 44 proteínas em *A. thaliana* contendo similaridade com o domínio USP de bactérias e concluíram que todas as sequências contendo o domínio USP em *A. thaliana*, evoluíram a partir de um

ancestral comum. Desde então, tem-se realizado estudos para compreender a função das proteínas de estresse universal em *A. thaliana*. Tais proteínas são anotadas como "proteína de superfamília tipo adenina nucleotídica α -hidrolase", embora não tenha sido relatado se eles se ligam ou hidrolisam ATP.

De acordo com o trabalho de Isokpehi et al. (2011), por meio de anotação funcional em vários bancos de dados, foram identificadas 511 proteínas USP e 1561 ESTs em várias espécies de plantas (Tabela 1).

A crescente disponibilidade de sequências genômicas de membros de viridiplantae (algas verdes e plantas terrestres) principalmente em organismos modelos como *A. thaliana* e *O. sativa*, em combinação com ferramentas de bioinformática de alto rendimento e bancos de dados públicos, fornecem novas oportunidades para examinar famílias de genes fundamentais para a resposta ao estresse nas plantas (Isokpehi et al., 2011), nas quais a tolerância à seca é um fenótipo desejável.

Apesar do largo conhecimento de proteínas USP em bactérias, onde foram primeiramente identificados, a diversidade funcional das USPs em outros organismos, incluindo várias espécies de plantas como o algodão, não está bem definida. O estudo em algodoeiro torna-se de grande importância visto que existem poucas informações a respeito do referido gene.

Tabela 1. Conjunto de dados das entradas de proteínas de estresse universal viridiplantae no UniProt.

Organismos	NCBI ID	Nº de entradas UniProt	Domínios USP
<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>	39947	88	60
<i>Arabidopsis thaliana</i>	3702	78	53
<i>Populus trichocarpa</i>	3694	59	45
<i>Oryza sativa subsp. indica</i>	39946	52	32
<i>Zea mays</i>	4577	52	45
<i>Ricinus communis</i>	3988	43	32
<i>Picea sitchensis</i>	3332	21	21
<i>Physcomitrella patens</i>	3218	18	15
<i>Vitis vinifera</i>	29760	18	11
<i>Micromonas pusilla</i>	564608	10	10
<i>Medicago truncatula</i>	3880	8	8
<i>Micromonas sp.</i>	296587	8	8
<i>Brassica campestris</i>	3711	7	7
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	3055	6	4
<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	436017	5	5
<i>Ostreococcus tauri</i>	70448	4	4
<i>Vicia faba</i>	3906	4	4
<i>Brachypodium distachyon</i>	15368	3	1
<i>Gossypium arboreum</i>	29729	2	2
<i>Oryza sativa</i>	4530	1	1
<i>Arachis hypogaea</i>	3818	1	1
<i>Astragalus sinicus</i>	47065	1	1
<i>Brachypodium sylvaticum</i>	29664	1	1
<i>Brassica oleracea var. alboglabra</i>	3714	1	1
<i>Capsicum chinense</i>	80379	1	1
<i>Cicer arietinum</i>	3827	1	1
<i>Gossypium barbadense</i>	3634	1	1
<i>Hordeum bulbosum</i>	4516	1	1
<i>Hordeum vulgare</i>	4513	1	1
<i>Hordeum vulgare var. distichum</i>	112509	1	1
<i>Marchantia polymorpha</i>	3197	1	1
<i>Potamogeton distinctus</i>	62344	1	1
<i>Mirabilis jalapa</i>	3538	1	1
<i>Pisum sativum</i>	3888	1	1
<i>Populus trichocarpa x Populus deltoids</i>	3695	1	1
<i>Prunus dulcis</i>	3755	1	1
<i>Solanum lycopersicum</i>	4081	1	1
<i>Solanum tuberosum</i>	4113	1	1
<i>Sonneratia alba</i>	122812	1	1
<i>Sonneratia apetala</i>	122813	1	1
<i>Sonneratia caseolaris</i>	122814	1	1
<i>Sonneratia ovata</i>	122816	1	1
<i>Triticum aestivum</i>	4565	1	1

Fonte: Isokpehi et al. (2011).

2.3.2. MYB

Os genes *MYB* compreendem uma das maiores famílias de FT conhecidas em plantas (Stracke et al., 2011) com importantes papéis em diversos processos, incluindo a defesa contra fatores bióticos e abióticos (Dubos et al., 2010). Genes *MYB* do tipo R2R3 codificam proteínas envolvidas no desenvolvimento celular, na regulação do metabolismo dos fenilpropanóides, como precursores de polímeros naturais (Kranz et al. 1998; Stracke et al. 2011). Em *A. thaliana*, *AtMYB77* foi descrito como um regulador positivo do crescimento de raiz lateral através da sinalização de auxina (SHIN et al., 2007); nas flores a expressão do gene *AtMYB21* é induzida pela seca. *AtMYB21*, juntamente com *AtMYB24* e *AtMYB108*, são reguladores positivos do alongamento do filamento e da deiscência da antera através das vias de sinalização do ácido jasmônico (AJ) e ácido giberélico (AG) (CHENG et al., 2009; MANDAOKAR et al., 2009; MANDAOKAR et al., 2006). Como também tem envolvimento na biossíntese de metabólitos (componentes da parede celular, cutícula, suberina e flavonóides) (Figura 5).

Entre os genes envolvidos na regulação da abertura estomática, *AtMYB60* foi o primeiro a ser caracterizado em *A. thaliana* (COMINELLI et al., 2015). Nas folhas, a expressão de *AtMYB60* é especificamente localizada nas células-guarda, onde é induzida por sinais que promovem a abertura estomática, como a luz branca e azul, e é reprimida por sinais que promovem o fechamento estomático, como escuridão, dessecação e tratamento com ABA. Apesar de vários trabalhos indicarem que o gene *MYB60* é regulado negativamente em condição de déficit hídrico (COMINELLI et al., 2015; GALBIATI et al., 2011), Oh et al. (2011) em *A. thaliana* observaram um aumento na expressão de duas variantes do gene *MYB60* com tratamento por ABA. Em outro trabalho envolvendo variantes do gene *SULF1* geradas por splicing alternativo, Sahota e Dhoot (2009) identificaram também funções opostas. Ainda são poucas as informações a respeito dessa dupla função e, especificamente em algodoeiro é ausente, contudo estima-se que as expressões de diferentes genes MYB são cuidadosamente controladas de maneira única e específica (OH et al., 2011).

Em trabalho com arroz, relatou-se que 65% dos genes MYB foram regulados diferencialmente sob estresse por seca (KATIYAR et al., 2012). Uma porcentagem ainda maior foi observada em *A. thaliana* por meio de dados transcriptômicos coletados na base de dados GENEVESTIGATOR. Nesta base, 51% dos genes *AtMYB* foram up-

regulados pela seca e 41% foram down-regulados, no total de 92% dos genes MYB responsivos a estresse por seca (KATIYAR et al., 2012).

Em algodão (*G. barbadense*), por meio de silenciamento gênico, o gene *GbMYB5* foi caracterizado com envolvimento no controle de tamanho e abertura dos estômatos. Observou-se diminuição no teor de prolina e das atividades das enzimas antioxidativas comprometendo a tolerância das plântulas (CHEN et al. 2015)

Os FTs são a chave das redes reguladoras na resposta das plantas aos estresses abióticos (GOLLDACK et al., 2014), entre eles, diferentes genes *MYB* têm sido estudados por seu envolvimento na regulação da resposta a estresses abióticos, conforme revisado recentemente por Li et al. (2015). Os FTs MYB são caracterizados pela presença do domínio MYB. O critério de classificação utilizado para as proteínas MYB é baseado no número de repetições presentes em suas sequências, variando de um a quatro. Cada repetição consiste em cerca de 52 resíduos de aminoácidos e forma três hélices α , o segundo e o terceiro estão envolvidos na formação de uma dobra de hélice-volta-hélice (DUBOS et al., 2010). Nas plantas, a maioria das proteínas MYB pertencem à subfamília R2R3-MYB, cujos membros contêm duas repetições. Mais de 100 membros desta subfamília foram descritos em diferentes espécies e classificados em 23 subgrupos (DUBOS et al., 2010).

A subfamília R2R3-MYB desempenha papel central no controle de processos específicos de plantas, incluindo metabolismo primário, secundário e resposta a estresses bióticos e abióticos, como também em diferentes órgãos e tipos específicos de células (DUBOS et al., 2010) (Figura 5). Em relação ao estresse abiótico, essa subfamília tem um papel fundamental na resposta à seca e, em particular, na regulação dos movimentos estomáticos (CAI et al., 2015).

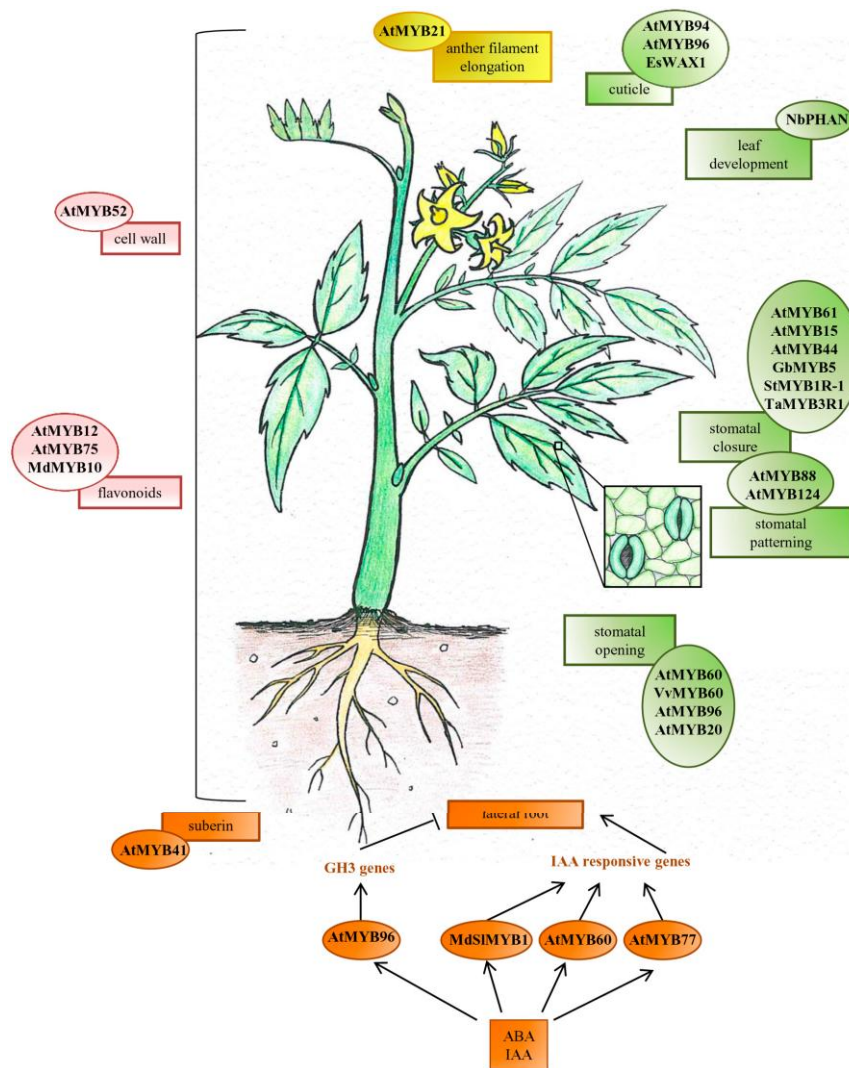


Figura 5. Rede de fatores de transcrição R2R3-MYB caracterizados por seus papéis regulatórios em diferentes órgãos, tipos específicos de células e caminhos metabólicos em resposta ao estresse por seca. As setas de linha representam uma regulação positiva, enquanto a linha que termina com uma barra indica uma regulação negativa. Processos e caminhos relacionados a órgãos vegetativos, flor, raiz ou planta inteira são coloridos em verde, amarelo, laranja e rosa, respectivamente.

Grande parte dos trabalhos referentes aos genes relacionados a seca em plantas estão descritos em *A. thaliana* como relatado anteriormente, com algodão são poucos. Considerando que a tolerância à seca é uma herança poligênica torna-se difícil o manejo por meio do melhoramento genético clássico, portanto, são poucas as cultivares desenvolvidas com tolerância à seca. Mas por meio das ferramentas biotecnológicas pode-se identificar e isolar genes envolvidos nas respostas ao déficit hídrico, que permitam entender as rotas metabólicas envolvidas nas respostas das plantas à seca.

3. REFERÊNCIAS

ACKERSON, R. C. Osmoregulation in cotton in response to water stress. II. Leaf carbohydrate status in relation to osmotic adjustment. **Plant Physiology**, v.67, p.489-493. 1981.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, p.373-399, 2004.

BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.24, p.23-58, 2005.

BELTRAO, N.E.M.; SOUZA, J.G. Fisiologia e ecofisiologia do algodoeiro. In: **algodão tecnologia de produção**. Dourados, MG. Embrapa agropecuária oeste algodão. p.54-75, 2001.

CAI, H.; TIAN, S.; DONG, H.; GUO, C. Pleiotropic effects of TaMYB3R1 on plant development and response to osmotic stress in transgenic *Arabidopsis*. **Gene**, v.558, p.227–234, 2015.

CARVALHO, L.P. O gênero *Gossypium* e suas espécies cultivadas e silvestres. In: AZEVEDO, D.M.P.; BELTRAO, N.E.M. **O agronegócio do algodão no Brasil**, Brasília: Embrapa informação tecnológica. v.1, p. 251-270, 2008.

CARVALHO, M.R.; HERRERA, F.A.; JARAMILLO, C.A.; WING, S.L.; CALLEJAS, R. Paleocene Malvaceae from northern South America and their biogeographical implications. **American Journal of Botany**, v.98, p.1337–1355, 2011.

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

CHEN, T.; LI, W.; HU, X.; GUO, J.; LIU, A; ZHANG, B. A cotton MYB transcription factor, GbMYB5, is positively involved in plant adaptive response to drought stress. **Plant Cell Physiology**, v.56, p.917–929, 2015.

CHEN, T.H. and MURATA, N. Glycine betaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. **Plant Cell Environment**, v.34, p.1–20, 2011.

CHENG, H.; SONG, S.; XIAO, L.; SOO, H.; CHENG, Z.; XIE, D.; PENG, J. Gibberellin acts through jasmonate to control the expression of MYB21, MYB24, and MYB57 to promote stamen filament growth in *Arabidopsis*. **PLoS Genetics**, v.5, 2009.

CHOU, M.X.; WEI, X.Y.; CHEN, D.S.; ZHOU, J.C. A novel nodule-enhanced gene encoding a putative universal stress protein from *Astragalus sinicus*. **Journal of Plant Physiology**, v.164, p.764–72. 2007.

COOK, C. G.; EL-ZIK, K. M. Cotton seedling and first-bloom plant characteristics: relationships with drought-influenced boll abscission and lint yield. **Crop science**, v. 32, n. 6, p. 1464-1467, 1992.

COMINELLI, E.; GALBIATI, M.; VAVASSEUR, A.; CONTI, L.; SALA, T.; VUYLSTEKE, M.; LEONHARDT, N.; DELLAPORTA, S.L.; TONELLI, C. A guard-cell-specific MYB transcription factor regulates stomatal movements and plant drought tolerance. **Current Biology**, v.15, p.1196–1200, 2005.

Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB -. **Acompanhamento de safras brasileiras-grãos**. V. 5 - SAFRA 2017/18- n.1 - Primeiro levantamento, 2017. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_10_16_16_34_39_graos_ou_tubro_2017.pdf>. Acesso em: 25 de Dezembro de 2017.

CONATY, W.C.; BURKE J. J.; MAHAN J.R.; NEILSON, J.E.; SUTTON, B.G. Determining the optimum plant temperature of cotton physiology and yield to improve plant-based irrigation scheduling. **Crop Science**, v.52, p.1828-1836, 2012.

DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontier Environment Science**, v.2, p.53, 2014.

DUBOS, C.; STRACKE, R.; GROTEWOLD, E.; WEISSHAAR, B.; MARTIN, C.; LEPINIEC, L. MYB transcription factors in *Arabidopsis*. **Trends Plant Science**, v.15, p. 573–581, 2010.

ELLIOTT, J.; GLOTTER, M.; BEST, N.; BOOTE, K. J.; JONES, J. W.; HATFIELD, J. L.; ROSENZWEIG, C.; SMITH, L.; FOSTER, I. Predicting agricultural impacts of large-scale drought: 2012 and the case for better modeling. Center for Robust Decision **Making on Climate & Energy Policy**, p. 1-8, 2013.

FANG, Y.; XIONG, L. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. **Cellular Molecular Life Science**, v. 72, 673–689, 2015.

FREIRE, E.C. **Algodão no cerrado do Brasil**. ABRAPA: Brasilia, DF. 2007.

GALBIATI, M.; MATUS, J.T.; FRANCA, P.; RUSCONI, F.; CAÑÓN, P.; MEDINA, C.; CONTI, L.; COMINELLI, E.; TONELLI, C.; ARCE-JOHNSON, P. The grapevine guard cell-related VvMYB60 transcription factor is involved in the regulation of stomatal activity and is differentially expressed in response to ABA and osmotic stress. **BMC Plant Biology**, v.11, p.142, 2011.

GOLLDACK, D.; LI, C.; MOHAN, H.; PROBST, N. Tolerance to drought and salt stress in plants: Unraveling the signaling networks. **Frontier Plant Science**, v.5, p.151. 2014.

HUSSAIN, S.S.; KAYANI, M.A.; AMJAD, M. Transcription factors as tools to engineer enhanced drought stress tolerance in plants. **Biotechnology Progress**, v.27, n.2, p.297-306, 2011.

ISOKPEHI, R.D.; SIMMONS, S.S.; COHLY, H.H.; EKUNWE, S.I.; BEGONIA, G.B.; AYENSU, W.K. Identification of Drought-Responsive Universal Stress Proteins in Viridiplantae. **Bioinformatic Biology Insights**, v.5, p.41–58, 2011.

JIN, L.G.; LIU, J.Y. Molecular cloning, expression profile and promoter analysis of a novel ethylene responsive transcription factor gene GhERF4 from cotton (*Gossypium hirsutum*). **Plant Physiology Biochemical**, v.46, p.46–53, 2008.

KATIYAR, A.; SMITA, S.; LENKA, S.K.; RAJWANSHI, R.; CHINNUSAMY, V.; BANSAL, K.C. Genome-wide classification and expression analysis of MYB transcription factor families in rice and *Arabidopsis*. **BMC Genomics**, v.13, p.544, 2012.

KERK, D.; BULGRIEN, J.; SMITH, D.W.; GRIBSKOV, M. *Arabidopsis* proteins containing similarity to the universal stress protein domain of bacteria. **Plant Physiology**, v.131, p.1209–19. 2003.

KHAN, M.S. The Role of DREB transcription factors in abiotic stress tolerance of plants. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v.25, p.2433-2442, 2011.

KUMAR, B.; PANDEY, D.M.; GOSWAMI, C.L.; JAIN, S. Effect of growth regulators on photosynthesis, transpiration and related parameters in water stressed cotton. **Biology Plantarum**, v. 44, 475–478, 2001.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. 2. ed. São Carlos, RIMA, p.531, 2006.

LAWLOR, D.W. Genetic engineering to improve plant performance under drought: Physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. **Journal Experiment Botanical**, v.64, p.83–108, 2013.

LI, C.; NG, C.K.Y.; FAN, L.M. MYB transcription factors, active players in abiotic stress signaling. **Environment Experiment Botanical**, v.114, p.80–91, 2015.

LI, W.T.; WEI, Y.M.; WANG, J.R.; LIU, C.J.; LAN, X.J; JIANG, Q.T.; PU, Z.E.; ZHENG, Y.L. Identification, localization, and characterization of putative USP genes in barley. **Theoretical and Applied Genetics**, v.121, p. 907–17, 2010.

LIANG, C.; MENG, Z.; MENG, Z.; MALIK, W.; YAN, R.; LWIN, K.M.; LIN, F.; WANG, Y.; SUN, G.; ZHOU, T.; ZHU, T.; LI, J.; JIN, S.; GUO, S.; ZHANG, R. GhABF2, a bZIP transcription factor, confers drought and salinity tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Science Report**, v.6, p.35-40, 2016.

LOKA, D.M.; DERRICK, M.; OOSTERHUIS, D.M.; RITCHIE, G.L. Water-deficit stress in cotton. In **Stress Physiology in Cotton** (Oosterhuis, D.M., eds), p. 37–72. Number Seven The Cotton Foundation Book Series. National Cotton Council of America. 2011.

LOUKEHAICH R, WANG T, OUYANG B, ZIAF K, LI H, ZHANG J, LU Y, YE Z *SpUSP*, an annexin-interacting universal stress protein, enhances drought tolerance in tomato. **Journal of Experimental Botany**, v.63, p.5593-606, 2012.

LUO, L.J. Breeding for water-saving and drought-resistance rice (WDR) in China. **Journal of Experimental Botany**, v.61, p. 3509–3517, 2010.

MANAVALAN, L.P.; GUTTIKONDA, S.K.; TRAN, L.S.P.; NGUYEN, H.T. Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean. **Plant Cell Physiology**, v.50, p. 1260–1276, 2009.

MANDAOKAR, A.; BROWSE, J. MYB108 acts together with MYB24 to regulate jasmonate-mediated stamen maturation in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.149, p.851–862. 2009.

MANDAOKAR, A.; THINES, B.; SHIN, B.; LANGE, B.; CHOI, G.; KOO, Y.; YOO, Y.; CHOI, Y.; Browse, J. Transcriptional regulators of stamen development in *Arabidopsis* identified by transcriptional profiling. **The Plant Journal**. v.46, p.984–1008. 2006.

MAQBOOL, A.; ZAHUR, M.; HUSNAIN, T.; RIAZUDDIN, S. GUSP1 and GUSP2, two drought-responsive genes in *Gossypium arboreum* have homology to universal stress proteins. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.27, p.109-114, 2009.

MORGANTE, C.V.; GUIMARAES, P.M.; MARTINS, A.Q.; ARAUJO, A.C.G.; LEAL-BERTIOLI, S.C.M.; BERTIOLI, D.J.; BRASILEIRO, A.C.M. Reference genes for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction expression studies in wild and cultivated peanut. **BMC Research Notes**, v.4, p.339, 2011.

NEPOMUCENO, A.L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J.R.P.; OYA, T. Tolerância a seca em plantas: mecanismos fisiológicos e moleculares. **Revista Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n.23, p.12-18, 2001.

NYSTROM, T.; NEIDHARDT, F.C. Cloning, mapping and nucleotide sequencing of a gene encoding a universal stress protein in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v.6, p.3187-98, 1992.

NYSTROM, T.; NEIDHARDT, F.C. Expression and role of the universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli* during growth arrest. **Molecular Microbiology**, v.11, p.537-44, 1994.

NYSTROM, T.; NEIDHARDT, F.C. Isolation and properties of a mutant of *Escherichia coli* with an insertional inactivation of the *uspA* gene, which encodes a universal stress protein. **Journal Bacteriology**, v.175, p.3949-56, 1993.

OH, J.E.; KWON, Y.; KIM, J.H.; NOH, H.; HONG, S.W.; LEE, H. A dual role for MYB60 in stomatal regulation and root growth of *Arabidopsis thaliana* under drought stress. **Plant Molecular Biology**, v.77, p.91-103, 2011.

PARIDA, A.K.; DAGAONKAR, V.S.; PHALAK, M.S.; AURANGABADKAR, L. P. Differential responses of the enzymes involved in proline biosynthesis and degradation in drought tolerant and sensitive cotton genotypes during drought stress and recovery, **Acta Physiologiae Plantarum**, v.30, p. 619-627, 2008.

PARIDA, A.K.; DAGAONKAR, V.S. e PHALAK, M.S. Alterations in Photosynthetic Pigments, Protein and Osmotic Components in Cotton Genotypes Subjected to Short-Term Drought Stress Followed by Recovery. **Plant Biotechnology Reports**, v. 1, p. 37-48, 2007.

PEREIRA, J.W.L.; MELO FILHO, P.A.; ALBUQUERQUE, M.B.; NOGUEIRA, R. J. M.C.; SANTOS, R.C. Biochemical changes in peanut genotypes submitted to moderate water stress. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 4, p. 766-773, 2012.

QIAO, Z.X.; HUANG, B.; LIU, J.Y. Molecular cloning and functional analysis of an ERF gene from cotton (*Gossypium hirsutum*). **Biochemic Biophysyc Acta**, v.1779, p.122–127, 2008.

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

RNC. Disponível em:
http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php, Acesso em 10 de jan. de 2018.

RODRIGUES, J.D.; 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, p.3763-3770, 2016.

SAHOTA, A.P.; DHOOT, G.K. A novel *SULF1* splice variant inhibits Wnt signalling but enhances angiogenesis by opposing *SULF1* activity. **Experimental Cell Research**, v.315, p. 2752-2764, 2009.

SAUTER, M.; RZEWUSKI, G.; MARWEDEL, T.; LORBIECKE, R. The novel ethylene-regulated gene *OsUsp1* from rice encodes a member of a plant protein family related to prokaryotic universal stress proteins. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.2325–31, 2002.

SARWAR, M.B.; SADIQUE, S.; HASSAN, S., RIAZ, S.; RASHID, B.; MOHAMED, B.B.; HUSNAIN, T. Physio-Biochemical and Molecular Responses in Transgenic Cotton under Drought Stress. **Tarim Bilimleri Dergisi**, v.23, p.157-166, 2017.

SENGCHINA, D. S. et al. Rate variation among nuclear genes and the age of polyploidy in *Gossypium*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 20, p. 633–643, 2003.

SHAH, S.T.; PANG, C.; FAN, S.; SONG, M.; ARAIN, S.; YU, S. Isolation and expression profiling of GhNAC transcription factor genes in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) during leaf senescence and in response to stresses. **Gene**, v.531, p.220–234, 2013.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v.58, p.221–227, 2007.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SEKI, M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, v.6, p.410–417, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**, 6^{ed}. Porto Alegre. ARTMED, 888p, 2016.

ULLAH, A.; SUN, H.; YANG, X.; ZHANG, X. Drought coping strategies in cotton: increased crop per drop. **Plant Biotechnology Journal**, v.15, p.271-284, 2017.

ULLAH A, SUN H, HAKIM, YANG X, ZHANG X. A novel cotton WRKY gene, *GhWRKY6*-like, improves salt tolerance by activating the ABA signaling pathway and scavenging of reactive oxygen species. **Physiologia Plantarum** 2017.

URAO, T.; YAKUBOVA, B.; SATOHA, R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKIA, K.; SEKIB, M.; HIRAYAMAB, T.; SHINOZAKIB, K. A transmembrane hybrid-type

histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. **The Plant Cell**, v.11, p. 1743–1754, 1999.

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

WANG, J.; GRIFFITHS, R.; YING, J.; MCCOURT, P.; HUANG, Y. Development of drought-tolerant (*Brassica napus* L.) through genetic modulation of ABA mediated stomata responses. **Crop Science**, v.49, p. 1539–1554, 2009.

WENDEL, J. F. New world tetraploid cottons contain old-world cytoplasm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 86, p. 4132–4136, 1989.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annual Review Plant Biology**, v. 57, p. 781–803, 2006.

YANG, Z.; WU, Y.; LI, Y.; LING, H.Q.; CHU, C. OsMT1a, a type 1 metallothionein, plays the pivotal role in zinc homeostasis and drought tolerance in rice. **Plant Molecular Biology**, v. 70, p. 219-229, 2009.

ZHANG, L.; PENG, J.; CHEN, T.T.; ZHAO, X.H.; ZHANG, S.D.; LIU, H.L.; DONG, L. FENG, S.X.; YU, S.X. Effect of drought stress on lipid peroxidation and proline content in cotton roots. **Journal Animal Plant Science**, v.24, p.1729–1736, 2014.

Capítulo II

**Profile of two drought related-genes during early growth of cotton genotypes
submitted to water stress**

**Profile of two drought related-genes during early growth of cotton genotypes
submitted to water stress**

Vandré Guevara Lyra Batista¹; Pedro Dantas Fernandes²; Roseane Cavalcanti dos Santos³; Péricles de Albuquerque Melo Filho⁴; Liziane Maria de Lima^{3*}

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco/RENORBIO. Recife, PE, Brazil. E-mail: vanguarda@gmail.com

²Universidade Estadual da Paraíba/Departamento de Agroecologia. Lagoa Seca, PB, Brazil. E-mail: pdantas@pesquisador.cnpq.br

³Embrapa Algodão/Laboratório de Biotecnologia. Campina Grande, PB, Brazil. E-mail: roseane.santos@embrapa.br; liziane.lima@embrapa.br

⁴Universidade Federal Rural de Pernambuco/Departamento de Agronomia. Recife, PE, Brazil. E-mail: periclesmf@gmail.com

Corresponding author - Liziane Maria de Lima, E-mail: liziane.lima@embrapa.br, Tel: +55 83 3182 4442 – ORCID 0000-0003-2314-6881

Drought responsive genes in cotton

Keywords: gene expression, gas exchange, antioxidative enzymes, *MYB60*, *GUSP1*

ABSTRACT – This work presents a profile of two genes involved in the pathway of abiotic stress, focusing on drought tolerance. Four Upland and Mocó genotypes were submitted to water stress during early growth and further evaluated at 50% (phase 1) and 80% (phase 2) of enclosure stomata. Plants were previously phenotyped, based on vegetative, physiological and biochemical traits. Expression of *GUSP1* and *MYB60* transcripts was estimated by qRT-PCR. Plants were grown in pots (288 mL) in greenhouse and further submitted to water stress during 25 days. Although Mocó cotton is considered tolerant to drought, here we found different behavior between genotypes. Mocó 1 and CNPA Precoce 1 (Upland) were very sensitive to the imposed stress, showing severe reductions in leaf number, stem diameter and weight of roots and canopy. Expression of *GUSP1* transcripts was high in all stressed genotypes, in both phases, during water stress period, standing out the genotype Mocó 2, presenting the highest level of expression., while *MYB60* transcripts were high only in phase 1, decreasing in phase 2. Considering that the expression of *MYB60* can be detected more briefly, it is worthwhile to invest on divergent germplasm in order to estimate its interrelation with drought tolerant genotypes.

INTRODUCTION

Drought is one of the primary stresses that influences the yield of several important crops, despite to management adopted by the farmers. The response of plants to water stress involves broad physiological and metabolic adaptations and the perception of water unavailability during cell growth leads to osmotic stress, producing redundant Reactive Oxygen Species (ROS). The disturbances caused in the cell due to ROS excess may lead to lipid peroxidation, oxidation of proteins, enzyme inhibition, DNA damages, and even cell death (Cooke *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2016). The

damages in DNA may result in either arrest or induction of transcription, induction of signal transduction pathways, replication errors, cell membrane destruction and genomic instability (Cooke *et al.*, 2003).

Several plant species employ antioxidative defense systems in order to protect themselves against ROS. Antioxidative enzymes include superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), monodehydro ascorbate reductase (MDHAR), dehydroascorbate reductase (DHAR) and glutathione reductase (GR). The overexpression of these enzymes are associated to tolerance to various abiotic stresses (Wang *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2016).

At molecular aspect, many genes that are induced under drought conditions have been identified and used as candidates in molecular assays in order to assist the selection procedures of crop breeding. Some of them have been found to be involved in stress perception, signal transduction and transcriptional regulatory pathways (Aktas *et al.*, 2009; Uribe *et al.*, 2014). In *Arabidopsis thaliana*, Wohlbach *et al.* (2008) found evidence that ATHK1-His kinase, plays a role in regulation of water stress response during early growth, soon after perception through plants. As to authors, ATHK1-mediated response to osmotic stress is abscisic acid (ABA) dependent and functions by positively regulating genes involved in ABA biosynthesis to increase ABA hormone levels.

ABA is a broad-spectrum phytohormone involved in plant growth and development, and also in pathways of various signal transduction during abiotic stresses. The pathways of ABA from stress perception to gene expression involve different transcription factors such as DREB, MYC/MYB, ABFs, NAC and CBF/DREB1. In literature, several authors have reported overexpression of genes linked to stress tolerance in plants submitted to drought, in *A. thaliana* (Abe *et al.*, 2003;

Jung *et al.*, 2008), *Triticum aestivum* (Rahaie *et al.*, 2010), *Oryza sativa* (Wang *et al.*, 2008), among others.

The MYC/MYB proteins are widely found in both plants and animals and play important roles in many physiological processes under normal or adverse growth conditions, such as in upregulation of genes involved in response of abiotic stresses. In transgenic plants of *Arabidopsis*, Abe *et al.* (2003) reported overexpression of *AtMYC2* and *AtMYB2* which were induced through ABA responsive- genes. According to authors both *AtMYC2* and *AtMYB2* proteins function as transcriptional activators in ABA-inducible gene expression under drought stress in plants. In *T. aestivum*, Rahaie *et al.* (2010) analyzed the expression of ten *MYB* genes in plants submitted to salt or drought stresses and found several genes up-regulated, including *TaMYBsdu1*, an important regulator in adaptation of wheat to both salt and drought stresses. In addition to the transcription factors, several genes have been involved in drought tolerance, such as *LEA*, *NCED*, *P5CS*, *USP*, among others (Maqbool *et al.*, 2009; Isokpehi *et al.*, 2011; Jung *et al.*, 2015). *USP* is a small protein that is upregulated when the cell is exposed to stress agents, enhancing the cell survival during prolonged exposure to such conditions (Nystrom and Neidhardt 1992, 1993; Jung *et al.*, 2015). Isokpehi *et al.* (2011) found two *Arabidopsis* *USP* genes, *At3g62550* and *At3g53990*, that encode an ATP-binding motif up-regulated in a drought microarray dataset. In *Gossypium arboreum*, Maqbool *et al.* (2009) identified two closely related genes, *GUSP1* and *GUSP2* from water-stressed leaves. Expression assays revealed a high level of *GUSP* gene expression in leaves, roots, and stems exclusively in plants following water stress. However, the highest levels of drought-inducible expression were found in the leaves.

Cotton (*G. hirsutum* L.) is a fiber crop grown worldwide, and is often exposed to environmental stresses such as soil salinity, heat and drought. The specie have two

botanic type with contrasting differences as to drought tolerance. Genotypes from *G. hirsutum* spp. Marie Galante (Mocó) are perennial cycle and more adapted to dry environments, while upland genotypes are annual cycle and show different level of drought tolerance (Rodrigues *et al.*, 2016). In environments prone to drought, the use of short cycle and drought tolerant genotypes is an adequate strategy in order to avoid losses in fiber production. Tolerance to drought is a multigenic trait and a highly complex phenomenon. The traits that affect the tolerance of crops to drought are quantitatively inherited and the polygenic nature of the traits makes difficult to identify a single gene conferring stress tolerance in several crop plants. For this reason, the identification of drought-responsive genes could provide important molecular markers for further use in selection procedures of cotton breeding. Numerous articles associated with this subject have been reported (Aktas *et al.*, 2009; Uribe *et al.*, 2014).

Aktas *et al.* (2009) used two contrasting cotton genotypes in order to identify compounds with ability to ROS-scavenging and found that the drought-tolerant genotype had higher levels of polyphenols, proline, carotenoids and antiradical capacity. Uribe *et al.* (2014) used a tolerant genotype (Acala 1517-99) in order to identify drought-responsive genes under drought stress conditions, and found a total of 110 drought-responsive genes, 79% of which were drought-repressed and 21% were drought-induced. As to authors, genes for CAT and NADPH were also suppressed by drought in cotton plants and suggest that the antioxidant and radical scavenging systems in Acala 1517-99 were not highly active in alleviating oxidative stress after prolonged water stress treatment.

Considering the availability of drought tolerance-genes reported in literature and also the necessity to validate such findings in order to assist the selection procedures of cotton breeding, in this work we tread the profile of *MYB* and *USP* transcripts in cotton

genotypes submitted to water stress at early growth. Additionally, we evaluated the growth of plants in condition of severe stress.

MATERIAL AND METHODS

Germplasm and experimental procedures

Seeds of four cotton genotypes were used (two Upland and two Mocó, Table 1) and grown in green house (Campina Grande, PB, 07°13'50", 35°52'52", 551 m), in tubes (0.3 L), containing commercial substrate (Basaplant, Base). After emergence, one plant was kept per tube. Plants were watered daily up to V2 phase (about 15 days after emergence) from which a total water suppression was established. A completely randomized experimental design was adopted, with two treatments (control and stress) and four repetitions. To growth analyses, plants were maintained under water suppression during 25 days, when the follows traits were collected: plant height, stem diameter, total number of leaves, weight of dry root and weight of dry shoots. Data were submitted to variance analyses, using F test ($p < 0.05$). Means were compared by Tukey test ($p < 0.05$). The software SISVAR 5.3 was adopted to statistical analyses (Ferreira 2014). The air temperature and RH in greenhouse ranged from 28°C to 35°C and 43% to 64%, during assay.

Table 1. Passport data of genotypes used in assays.

Genotypes	Origin	Genealogy	Botanic type
Delta Opal	Cultivar/BASF, EUA	DP 5816 x Sicala 33	latifolium
CNPA Precoce1	Cultivar/Embrapa, Brazil	GH 11-9-75	latifolium
Mocó 1	Accession/Embrapa, Brazil	Wild	Marie Galant
Mocó 2	Accession/Embrapa, Brazil	Wild	Marie Galant

Biochemical and molecular assays

The biochemical analyzes started when plants reached 50% (Phase 1) and 80% (Phase 2) of stomata closure, measured in young leaves, during 8:00h -10:00, through IRGA (LCpro⁺, ADC Bioscientific). The activity of the antioxidative enzymes (SOD and CAT) was estimated from crude extract of leave proteins, in both phases. Briefly, fresh leaves (200 mg) crushed in 2 mL potassium phosphate buffer (100 mM, pH 7.0) + ascorbic acid (0.1 mM), EDTA (0.1 mM) and PVP (10%). Concentration of samples was estimated by Bradford (1976). The methodology of free proline content was followed according Bates *et al.* (1973) method, and estimated through spectrophotometry (Biomate 3, USA) at 520 nm. SOD and CAT procedures were performed according Giannopolitis and Ries (1977) and Sudhakar *et al.* (2001), and estimated at 560 nm and 240 nm, respectively. Biological triplicates were adopted in all assays.

RNA extraction and RT-PCR assays

RNAs were extracted from the same leaves used in biochemical assays, using were also used to RNA extraction (Invisorb Spin Plant Mini kit, Invitex). cDNAs were synthesized with ImProm-IITM Reverse Transcription System, Promega. To RT-qPCR assays, a set of endogenous and specific primers were used (Table 2). The reactions were carried out using 1 µL cDNA (1 µg), 0.2 µL of each primer and qPCR-SYBR-Green mix/ROX kit (Ludwig), according to manufacturer's recommendation. Reactions were performed as follow: 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 1 min, and 72°C for 15 s. Biological triplicates were adopted.

The graphics, Cqs, and melt curve were automatically generated by software of Eco Real-Time PCR System thermocycler (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA), based

on normalization method with three reference genes (Livak and Schmittgen 2001). The expression pattern was estimated by relative quantification. Reference genes used here were normalized by *Ártico et al.* (2014).

Table 2. Sequences of specific and endogenous oligonucleotides used in RT-qPCR assays.

Gene	Genbank	Sequence 5'→3'
<i>GUSP1</i>	EU107766.1	F: GCAAATCGGTGTAGCAATGG R: CTCCTTCTCTCTGAACTCC
<i>MYB60</i>	NM_100755.2	F: ACCATGGACTCCTGAAGAAG R: CCAATAAGGCTTGCAAGTGA
<i>ACTINA</i>	AY305726	F: TTGCAGACCGTATGAGCAAG R: ACTCTCCGATCCAGACACTG
<i>UBIQUITINA</i>	DW505546	F: CAACGCTCCATCTTGTCCTT R: TGATCGTCTTTCCCGTAAGC
<i>PP2A</i>	DT545658	F GATCCTTGTGGAGGAGTGGA R GCGAAACAGTTCGACGAGAT

F- forward; R- reverse.

RESULTS AND DISCUSSION

Growth profile of plants

After seven days of water suppression, all genotypes showed wilting symptoms that increased till final of assay, however, the mortality rate of plants, based on permanent wilting stage, was 7.5% to Delta Opal, 15% to CNPA Precoce 1 and 2.6% to Mocó 1. To Mocó 2, no dead plant was found.

Growth measures were taken at end of assay, at 25 days of water suppression. Statistical differences were found to all growth traits (Table 3). Mocó 1 and CNPA Precoce 1 were more affected in most traits. This result is quite surprising because both genotypes belong to different botanical types and, as Mocó 1 was collected in the same region of Mocó 2 (Northeast semi-arid), we expected similar behavior between these two accessions. This results mean that, despite Mocó 1 and Mocó 2 are non-

domesticated accessions, it is possible that Mocó 1 had inherited genes derived from herbaceous accesses, considering the proximity of collection site with cotton fields in that region.

Table 3. Relative losses (%) of growth traits in cotton genotypes submitted to 25 days of water suppression.

Genotype	Growth traits				
	PH	TNL	SD	WDR	WDS
Delta Opal	5.8 B	14.1 B	27.4 B	36.9 B	52.66 B
CNPA Precoce1	13.9 A	42.7 A	34.0 B	50.7 A	65.66 A
Mocó 1	13.5 A	44.1 A	41.3 A	53.3 A	60.65 A
Mocó 2	12.7 A	29.5 B	27.2 B	29.8 C	55.02 B

Means with same letter do not differ statistically ($p < 0.05$). PH - plant height, NL- total number of leaves, SD - stem diameter; WDR - weight of dry root; WDS - weight of dry shoots

Antioxidative enzymes

The profile of SOD and CAT in cotton plants, collected in leaves at 50% (phase 1) and 80% (phase 2) of stomata closure is seen in Fig. 1. We found that SOD activity in scavenging of free radical was mild in both phases of Mocó 2, meaning that plants had broad ability to adjust the water stress, facilitating the action of CAT in neutralizing of ROS produced by cells due to water stress. This profile is an indication that this genotype has a greater ability to tolerate the imposed water stress, more than the others ones studied.

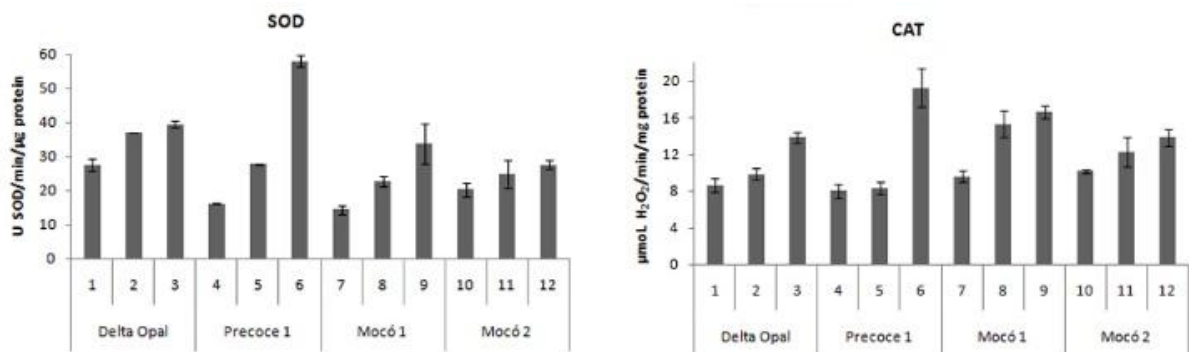


Fig. 1 Activity of SOD and CAT in cotton plants submitted to water stress. 1, 4, 7 and 10 - Control; 2, 5, 8 and 11 - phase 1 (50% of stomata closure); 3, 6, 9 and 12 - phase 2 (80% of stomata closure).

Molecular Analyses

MYB60 (ID: 837403) and *USP* (ID: 108483041) genes are involved in water stress tolerance in several crops, as *A. thaliana*, *Oryza sativa*, *G. arboreum*, *Salvia miltiorrhiza*, (Sauter *et al.*, 2002; Maqbool *et al.*, 2009; Cominelli *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2017). According to literature, *USP* appears improves the rate of cell survival during prolonged exposure to stress agents, and may endow plants with wide-ranging stress tolerance (Zahur *et al.*, 2009). In *Arabidopsis*, *USP-At3g53990* exhibits a chaperone function and is largely induced by heat, H₂O₂, and drought treatments (Jung *et al.*, 2015). In this study we tread the profile of *MYB* and *USP* transcripts in latifolium and Marie Galant genotypes in young leaves at phase 1 and phase 2. As seen in Fig. 2, the expression of *GUSPI* transcripts was higher in both phases of Mocó 2, which was also more tolerant based on biochemical assays and growth analyses. Then, we suggest that *GUSPI* transcription may be used to assist in selection procedures of drought tolerance in cotton plants.

As to *MYB60*, transcript levels were found to be higher when the plants were in phase 1, decreasing slightly in the Marie Galant and abruptly in the latifolium, in phase 2 (Fig. 2). This behavior corroborates with findings reported in the literature, in which *MYB60* is involved in the regulation of stomatal movement during stress. Their level of expression decreases in guard cells with increasing ABA levels, promoting stomatal closure (Oh *et al.*, 2011). The high levels of expression found in both Delta

Opal and Precoce 1 mean that genotypes suffered more during stress. According to Oh *et al.* (2011) the overexpression of the MYB60 gene confers sensitivity to the plant.

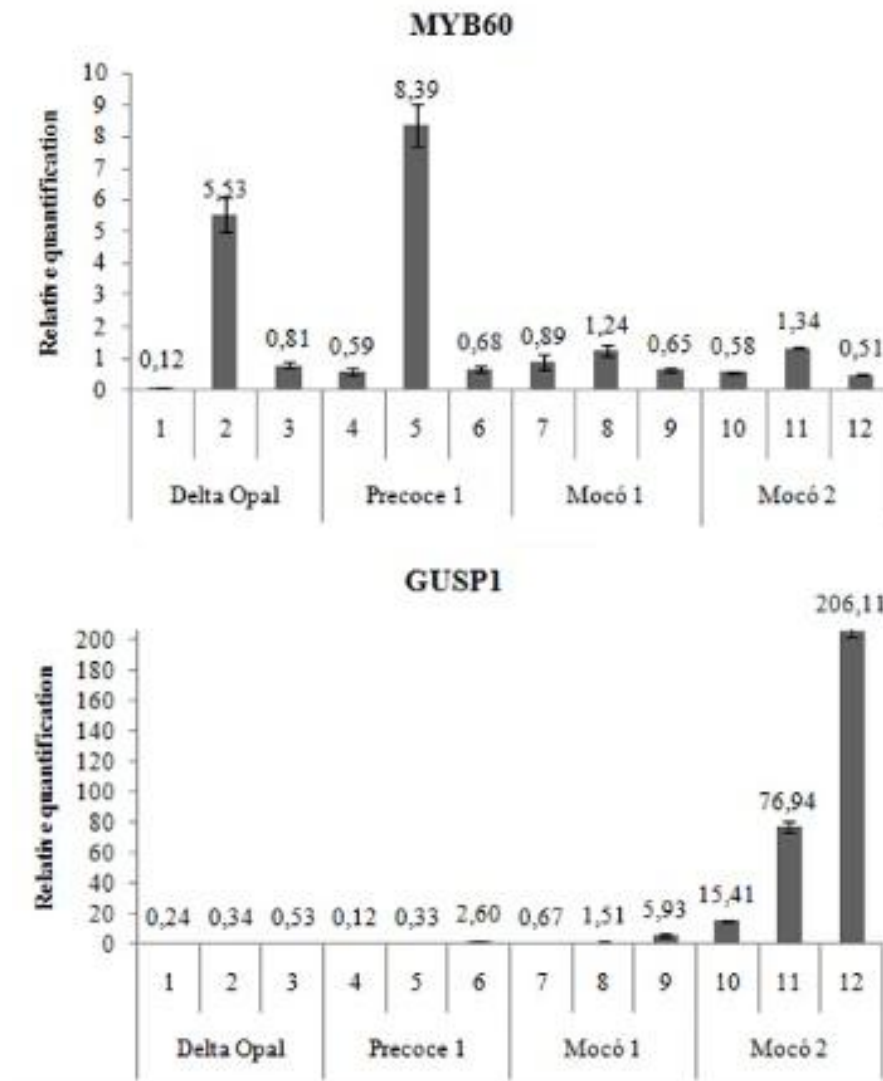


Fig. 2 Relative expression quantification of *GUSPI* e *MYB60* genes involved in water stress. 1, 4, 7 and 10 - No stress; 2 and 5 (4° DWS), 8 and 11 (3° DWS) - phase 1; 3 and 6 (7° DEH), 9 and 12 (6° DEH) - phase 2.

Tolerance to abiotic stresses is one of the main targets of plant breeding in several annual or perennial crops. When face environmental stresses, plant cells activate

several signaling pathways that trigger the expression of transcription factors. Water stress is considered widely critical because drought occurs in several environments, affecting the plant growth in critical phases during life cycle. Several descriptors have been adopted in order to aid in the identification of plants tolerant to water stress. As drought tolerance is a multigenic trait, involving a set of physiological and biochemical processes (Ullah *et al.*, 2017), the adoption of several traits is generally necessary to attest the level of tolerance of the evaluated genotypes.

At the molecular level, plants respond differently depending on the level of tolerance, altering gene expression, up- or down-regulating, depending on the role of the gene involved in the processes of cell defense. The findings of genomics have contributed broadly to the validation of such results. From these studies, several genes involved in the path of plant defense have contributed to assist some selection procedures in several commercial crops, such as rice (*O. sativa*), cotton (*G. arboreum* and *G. barbadense*) and soybean (*Glycine max*) (Sauter *et al.*, 2002; Maqbool *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2015).

The genes *GUSP1* and *MYB60*, initially identified in *A. thaliana*, have also homology in cotton. In plants, USP is upregulated when the cell is exposed to stress, increasing the survival rate (Nystrom and Neidhardt 1992, 1993). In *G. arboreum*, Maqbool *et al.* (2009) suggest that *GUSP1* is widely expressed in leaves due to involvement with chloroplasts. In work involving water stress in wild tomato (*Solanum pennellii*), Loukehaich *et al.* (2012) observed that overexpression of the USP gene increased plant tolerance to drought. Wang *et al.* (2017), in working with heterologous expression of *S. miltiorrhiza* USP genes in *E. coli*, observed that the increase in gene expression confers tolerance to salt stress and heat as well as the combination between them. In this work, using different genotypes of *G. hirsutum*, we found that Delta Opal,

CNPA Precoce 1 and Mocó 1 showed slight increase in *GUSPI* expression, in both phases, unlike Mocó 2, that had an expressive increase, leading to the assumption that this genotype is the more tolerant to water stress, based on the set of data here presented (Fig. 2).

MYB has also been widely reported in response to abiotic stresses in several crops. As to Baldoni *et al.* (2015), the MYB family has a specific role in responses of plants to water stress, such as regulation of stomatal movement, control of suberin synthesis and cuticular waxes. Here, we found that *MYB60* transcripts were more expressed in leaves collected in phase 1, falling sharply with advancing of stress, especially in sensitive plants (Fig. 2). This result is coherent with those found by Oh *et al.* (2011), which studied the involvement of two splice variants of the *MYB60* in *A. thaliana* under drought conditions. As to authors, *MYB60* played a crucial role in stomatal movement, based on over-expressing of each variant, resulting in enhanced sensitivity to water deficit stress. Severe drought stress inhibited the expression of *MYB60* resulting in stomatal closure and root growth inhibition.

Although our work focused on expression of *MYB60* only in leaves, there are several reports of *MYB60* expression in roots and flowers, with negative or positive regulation, depending on the stress condition in which the plant was submitted (Cominelli *et al.*, 2005; Oh *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2014).

Despite to availability of information about these genes in several crops, the reports in *Gossypium*, focusing on tolerance do abiotic stress are limited. More researches must be incentivated in this area, taking in account the importance of cotton to world agribusiness and the current environmental chances that face on several crops. The validation of tolerant genes may widely contribute in selection procedures of the cotton-breeding program focusing on semi-arid environments.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Embrapa (Brazilian Agricultural Research Corporation) for the financial support. To Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the scholarship granted.

REFERENCES

Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K (2003) *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15:63-78.

Aktas YL, Dagnon S, Gurel A, Gesheva E and Edreva A (2009) Drought tolerance in cotton: involvement of nonenzymatic ROS-scavenging compounds. *J Agron Crop Sci* 195:247-253.

Ártico S, Alves MR, Ribeiro-Alves M, Oliveira Neto OB, Macedo LL, Silveira S, Grossi-de-Sá MF, Martinelli AP and Alves Ferreira M (2014) Transcriptome analysis of *Gossypium hirsutum* flower buds infested by cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) larvae. *BMC Genomics* 15:1-24.

Baldoni E, Genga A and Cominelli E (2015) Plant MYB Transcription Factors: Their Role in Drought Response Mechanisms. *Int J Mol Sci* 16:15811-15851.

Cominelli E, Galbiati M and Tonelli C (2010) Transcription factors controlling stomatal movements and drought tolerance. *Transcription* 1:1-5.

Cominelli, E, Galbiati M, Vavasseur A and Tonelli C (2005) A guard-cell-specific MYB transcription factor regulates stomatal movements and plant drought tolerance. *Curr Biol* 15:1196-1200.

Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M and Lunec J (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 17:1195-214.

Chen T, Li W, Hu X, Guo J, Liu A and Zhang B (2015) A Cotton MYB Transcription Factor, GbMYB5, is Positively Involved in Plant Adaptive Response to Drought Stress. *Plant Cell Physiol* 56:917-929.

Ferreira DF (2014) Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Cienc Agrotec* 38:109-112.

Giannopolitis CN and Ries SK (1977) Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol* 59:309-314.

Isokpehi RD, Simmons SS, Cohly HH, Ekunwe SI, Begonia GB and Ayensu WK (2011) Identification of Drought-Responsive Universal Stress Proteins in Viridiplantae. *Bioinform Biol Insights* 5:41-58.

Jung C, Seo JS, Han SW, Koo YJ, Kim CH, Song SI, Nahm BH, Choi YD and Cheong JJ (2008) Overexpression of AtMYB44 enhances stomatal closure to confer abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 146:623-635.

Jung YJ, Melencion SMB, Lee ES, Park JH, Alinapon CV, Oh HT, Yun DJ, Chi YH and Lee SY (2015) Universal stress protein exhibits a redox-dependent chaperone function in *Arabidopsis* and enhances plant tolerance to heat shock and oxidative stress. *Front Plant Sci* 6:1141.

Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method *Methods* 25:402-408.

Loukehaich R, Wang T, Ouyang B, Ziaf K, Li H, Zhang J, Lu Y and Ye Z (2012) *SpUSP*, an annexin-interacting universal stress protein, enhances drought tolerance in tomato. *J Exp Bot* 63:5593-606.

Maqbool A, Zahur M, Husnain T and Riazuddin S (2009) GUSP1 and GUSP2, Two Drought-Responsive Genes in *Gossypium arboreum* Have Homology to Universal Stress Proteins. *Plant Mol Biol Rep* 27:109-114.

Nystrom T and Neidhardt FC (1992) Cloning, mapping and nucleotide sequencing of a gene encoding a universal stress protein in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 6:3187-98.

Nystrom T and Neidhardt FC (1993) Isolation and properties of a mutant of *Escherichia coli* with an insertional inactivation of the *uspA* gene, which encodes a universal stress protein. *J Bacteriol* 175:3949-56.

Oh JE, Kwon Y, Kim JH, Noh H, Hong SW and Lee H (2011) A dual role for MYB60 in stomatal regulation and root growth of *Arabidopsis thaliana* under drought stress. *Plant Mol Biol* 77:91-103.

Rahaie M, Xue GP, Naghav MR, Alizadeh H and Schenk PM (2010) A MYB gene from wheat (*Triticum aestivum* L.) is up-regulated during salt and drought stresses and differentially regulated between salt-tolerant and sensitive genotypes. *Plant Cell Rep* 29:835-844.

Rodrigues JD, Silva CRC, Pereira RF, Ramos JPC, Melo Filho PA, Cavalcanti JJV and Santos RC (2016) Characterization of water stress tolerant cotton cultivars based on plant growth and in activity of antioxidant enzymes. *Afr J Agric Res* 11:3763-3770.

Sauter M, Rzewuski G, Marwedel T and Lorbiecke R (2002) The novel ethylene-regulated gene OsUsp1 from rice encodes a member of a plant protein family related to prokaryotic universal stress proteins. *J Exp Bot* 53:2325-2331.

Sudhakar C, Lakshmi A and Giridarakumar S (2001) Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Sci* 161:613-619.

Ullah A, Sun H, Yang X and Zhang X (2017) Drought coping strategies in cotton: increased crop per drop. *Plant Biotechnol J* 15:271-284.

Uribe LR, Abdelraheem A, Tiwari R, Gopalan CS, Hughs SE and Zhang J (2014) Identification of drought-responsive genes in a drought tolerant cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivar under reduced irrigation field conditions and development of candidate gene markers for drought tolerance. *Mol Breed* 34:1777-1796.

Wang Q, Guan Y, Wu Y, Chen H, Chen F and Chu C (2008) Overexpression of a rice OsDREB1F gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both *Arabidopsis* and rice. *Plant Mol Biol* 67:589-602.

Wang Y, Ying Y, Chen J and Wang X (2004) Transgenic *Arabidopsis* overexpressing Mn-SOD enhanced salt-tolerance. *Plant Sci* 167:671-677.

Wang XF, Su J, Yang N, Zhang H, Cao XY and Kang JF (2017) Functional Characterization of Selected Universal Stress Protein from *Salvia miltiorrhiza* (SmUSP) in *Escherichia coli*. *Genes (Basel)* 8:224.

Wohlbach DJ, Quirino BF and Sussman MR (2008) Analysis of the *Arabidopsis* histidine kinase ATHK1 reveals a connection between vegetative osmotic stress sensing and seed maturation. *Plant Cell* 20:1101-1117.

Yang Z, Wu Y, Li Y, Ling HQ and Chu C (2009) OsMT1a, a type 1 metallothionein, plays the pivotal role in zinc homeostasis and drought tolerance in rice. *Plant Mol Biol* 70:219-229.

Zahur M, Maqbool A, Ifran M, Barozai MY, Rashid B, Riazuddin S and Husnain T (2009) Isolation and functional analysis of cotton universal stress protein promoter in response to phytohormones and abiotic stresses. *Mol Biol (Mosk)* 43:628-35.

Zhao Y, Xing L, Wang X, Hou YJ, Gao J, Wang P, Duan CG, Zhu X and Zhu JK (2014) The ABA receptor PYL8 promotes lateral root growth by enhancing MYB77-dependent transcription of auxin-responsive genes. *Sci Signal* 7:ra53.

Capítulo III

***GUSP1* and *MYB60*: respond to water stress in cotton cultivars**

***GUSP1* and *MYB60*: respond to water stress in cotton cultivars**

Vandré Guevara Lyra Batista¹; Pedro Dantas Fernandes²; José Jaime Vasconcelos Cavalcanti³, Roseane Cavalcanti dos Santos³; Péricles de Albuquerque Melo Filho⁴; Liziane Maria de Lima^{3*}

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco/RENORBIO. Recife, PE. E-mail: vanguevara@gmail.com

²Universidade Estadual da Paraíba/Departamento de Agroecologia. Lagoa Seca, PB. E-mail: pdantas@pq.cnpq.br

³Embrapa Algodão/Laboratório de Biotecnologia. Campina Grande, PB. E-mail: roseane.santos@embrapa.br; liziane.lima@embrapa.com*

⁴Universidade Federal Rural de Pernambuco/Departamento de Agronomia. Recife, PE. E-mail: periclesmf@gmail.com

* Corresponding author - Liziane Maria de Lima, E-mail: liziane.lima@embrapa.br, Tel: +55 83 3182 4442

Water stress responsive genes in cotton

Keywords – Drought, semi-arid, gene expression, stomatal closure.

ABSTRACT - In this study, the RT-qPCR expression profile of the *GUSP1* gene and *MYB60* transcription factor were studied in cotton genotypes submitted to water stress in the initial growth phase (V2). In addition, the physiological behavior of the genotypes was evaluated based on the gas exchanges. Nine cotton genotypes were used in DIC with factorial scheme 9 (genotypes) x 2 (water regimes) with 10 replicates, submitted to water suppression until reaching 50% of stomatal closure. The gas exchanges were measured (*E*, *ci* and *A*) by means of equipment containing IRGA. Leaves were collected for molecular analyses. The partial perception of water stress by the plants (50% of the stomatal closure) occurred around the fifth day of water suppression. According to the gas exchange data, it was verified that genotypes CNPA 5M, CNPA 7MH, BRS RUBI and BRS SERIDÓ presented the smallest reductions in these variables, and therefore were the materials with greater ability to prevent the deleterious effects of water stress. For the study of gene expression, *GUSP1* presented the highest levels in genotypes adapted to the Brazilian semiarid (CNPA 5M, CNPA 7MH and BRS SERIDÓ). On the other hand, the *MYB60* transcription factor presented higher levels of expression in the genotypes considered sensitive to water stress (FMT 701, FMT 705 and FM 966). Considering the results, *GUSP1* and *MYB60* can be used in the identification of cotton genotypes with divergent characteristics of tolerance to water stress in the V2 phase.

INTRODUCTION

Water stress is one of the main limiting factors for productivity success in most crops in the world, especially in the arid and semi-arid regions, such as the Brazilian Northeast where there is an exposure of plants to long periods of drought (Zonta *et al.* 2017).

Under water deficit conditions plants are affected negatively in most of the phenological phases, in which they trigger a series of morpho-physiological mechanisms: stomatal closure, repression of cell growth, decreased gas exchange and carboxylation efficiency, which negatively affect photosynthesis and consequently promote loss of organic matter (Kumar *et al.* 2001; Parida *et al.* 2007; Hejník *et al.* 2015); and molecular mechanisms: the accumulation of osmolytes and the synthesis of proteins, such as regulatory proteins (transcription factors - TFs) and functional proteins (late embryogenesis abundant – LEA and universal stress proteins – USP) (Shinozaki *et al.* 2007; Maqbool *et al.* 2009). Phenotypically, changes in growth are observed with a reflection on fiber quality and production (Parida *et al.* 2007).

In a study with cotton (*G. hirsutum*) under water stress, Kumar *et al.* (2001) observed decreases in gas exchange and efficiency of carboxylation, which negatively affected photosynthesis. Hejnak *et al.* (2015) studied the effects of water stress in cotton (*G. barbadense*), based on vegetative growth and gas exchange data during 10 days of stress. According to the results, approximately 50% of the dry matter was lost due to stress. In addition, there was a decrease in stomatal conductance, photosynthesis and transpiration in the plants under water stress.

Stomatal closure in cotton is the first step in reducing the loss of water under drought conditions, when the transpiration rate is very high (Ullah *et al.* 2017). Souza *et al.* (2016) investigated cotton genotypes under hydric deficit and observed a decrease in stomatal conductance. As the stress increased, they also observed an increase in the level of the *NCED* gene expression, precursor of the phytohormone abscisic acid (ABA) on the sixth day of stress, indicating the involvement of this gene in the response to water stress in the genotypes studied.

Several genes related to water stress have been identified, mainly in

Arabidopsis thaliana. Wohlbach *et al.* (2008) have found evidence that the *ATHK1* gene, a transmembrane kinase histidine, plays an osmosensor role in regulating stress response during vegetative growth. Abe *et al.* (2003) reported overexpression of *AtMYC2* and *AtMYB2* genes, which encode TFs, induced by ABA under stress by drought.

Water stress triggers ABA production, which in turn causes stomatal closure and induces the expression of stress-related genes. There are signaling cascades, which rule the expression of genes inducible by drought, ABA-dependent and independent (Yamaguchi-Shinozaki, 2006). Transcription of these genes is controlled by regulatory proteins called TFs. The manipulation of TFs has become widely used to increase drought tolerance in plants (Chen *et al.* 2015; Li *et al.* 2015; Liang *et al.* 2016). Among them, different genes of *MYB* transcription factors have been studied for their involvement in the regulation of the response to abiotic stresses (Li *et al.* 2015).

A few studies have been conducted to investigate other TFs involved in the response of plants to water stress. Recently, gene *GhABF2*, which encodes the bZIP transcription factor, was related to drought and salinity tolerance in *A. thaliana* and cotton (Liang *et al.* 2016). The *G. barbadense* *GbMYB5* gene, which encodes the MYB transcription factor of R2R3 type, when investigated by means of heterologous expression in tobacco, was positively involved in response to stress by drought. The high expression reduced the loss of water to decrease the size of the stomata, thus increasing the survival rate after stress (Chen *et al.* 2015). In *G. arboreum*, Maqbool *et al.* (2009) identified a high expression of *GUSP1* and *GUSP2* genes belonging to the family of universal stress proteins (USP) in plants under water stress.

In this study, the expression profile of the *MYB60* and *GUSP1* genes was

investigated in cotton genotypes submitted to water stress, with partial closure of the stomata. In addition, the physiological behavior of the genotypes was evaluated based on the gas exchanges.

MATERIAL AND METHODS

Genetic resources and experimental procedures

Nine accesses of the Active Germplasm Bank of cotton at Embrapa were used for this study (Table 1). The seeds were sown in tubes (0.3 L) containing commercial substrate (BASAPLANT, BASE, Brazil), maintaining 1 plant/tube. The differentiation of treatments was done at 13 days after emergence (DAE), when the plants were in the V2 phase (Souza *et al.* 2016), being control (C), plants that received normal watering and stress (S), the plants that were submitted to water suspension until stomatal closure of 50%. The outline adopted was completely randomized, with factorial scheme: 9 (genotypes) x 2 (water regimes), with 10 replications.

Table 1. Cotton cultivars used in water stress tests.

Genotypes	Botanic type	Origin	Life Cycle	Characteristics
FMT 705	Herbaceous	FMT	Medium/Precocious	AC
FM 966	Herbaceous	Bayer	Precocious	AC
BRS RUBI	Herbaceous	Embrapa	Late	AS
BRS 286	Herbaceous	Embrapa	Medium/Precocious	ACS
FMT 701	Herbaceous	FMT	Late	AC
CNPA ITA 90	Herbaceous	Embrapa	Late	AC
CNPA 5M	Arboreal	Embrapa	Late	AS
CNPA 7MH*	Arboreal	Embrapa	Late	AS
BRS SERIDÓ	Herbaceous	Embrapa	Medium	AS

Life cycle: Precocious- less than 130 days; Medium- 130 to 150 days; late- over 150 days; Characteristics: AC- adapted to the climate of the Cerrado, AS- adapted to the semiarid climate, ACS- adapted to the climates of the Cerrado and the semiarid; FMT- Mato Grossense Foundation.

Determining the gas exchanges

The reading of gas exchanges started after 24 hours of establishing water stress, between 08:00 am and 10:00 am, by means of the IRGA (Infrared Gas Analyzer, model LCpro⁺, ADC Bioscientific). The photosynthetic photon flux density, air temperature and internal CO₂ concentration to the environment level, were adjusted to 1,200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, at 25 °C. The plants were measured daily until they reached 50% (\pm 5%) stomatal conductance (*g_s*) compared to the control treatment. The following variables were recorded at the time: photosynthesis (*A*) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), transpiration (*E*) ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and internal concentration of CO₂ (*C_i*) ($\mu\text{mol mol}^{-1}$). The leaves used to collect the physiological data were collected and stored at -80 °C for later molecular analysis.

Statistical analyses

The data was submitted to variance analysis by the F test ($p < 0.05$) and the averages were compared by the Tukey test ($p < 0.05$) using the SISVAR software version 5.3 (Ferreira, 2014).

Analysis of the *GUSPI* and *MYB60* gene expression via RT-qPCR

The total leaf RNA was extracted using the Illustra RNAspin Mini Kit (GE Healthcare), following the manufacturer's recommendations and treated with DNase I (BioLab). The total RNAs were analyzed in 0.8% agarose gel and quantified in spectrophotometer. The cDNA synthesis was performed with the ImProm-IITM Reverse Transcription System (Promega) kit using 1 μg of total RNA.

For each RT-qPCR reaction, 6 μL of Syber Green (Ludwig) were used, 0.2 μL of each primer (Table 2), 1 μL of cDNA and water for a final volume of 12 μL . The

amplification conditions were: 95 °C/10 min, 40 cycles of 95 °C/15 sec, 60 °C/1 min and 72 °C/15 sec. The reactions were performed in biological and experimental triplicates. The graphics, Melt curve and Cqs were generated automatically by the Eco™ Real-Time PCR System thermocycler (Illumina) based on the normalization method with a reference gene, $\Delta\Delta Cq$ (Livak *et al.* 2001). For the analysis of the pattern generated was used the relative quantification, and for the endogenous control were used the *Actin*, *Ubiquitin* and *PP2A* genes (Ártico *et al.* 2014).

Table 2. *G. hirsutum* primer sequence used for the study with RT-qPCR.

Genes	Genbank	Sequence 5'→3'
<i>GUSP1</i>	EU107766.1	F: GCAAATCGGTGTAGCAATGG R: CTCCTTCTCTCTGAACTCC
<i>MYB60</i>	NM_100755.2	F: ACCATGGACTCCTGAAGAAG R: CCAATAAGGCTTGCAAGTGA
<i>ACTINA</i>	AY305726	F: TTGCAGACCGTATGAGCAAG R: ACTCTCCGATCCAGACACTG
<i>UBIQUITINA</i>	DW505546	F: CAACGCTCCATCTTGTCCTT R: TGATCGTCTTTCCCGTAAGC
<i>PP2A</i>	DT545658	F GATCCTTGTGGAGGAGTGGA R GCGAAACAGTTCGACGAGAT

RESULTS AND DISCUSSION

Gas exchanges

The partial perception of water stress by plants (50% of stomatal closure) occurred around the fifth day of water suppression, when *E*, *Ci* and *A* values were recorded. Most of the cultivars under water stress showed a slight symptom of wilting and sagging in the true and cotyledonary leaves, but without foliar abscission; some plants presented reduction in height, as seen in FMT 705, BRS 286, and BRS RUBI cultivars (Fig 1B, E and H). According to Ullah *et al.* (2017), stomatal conductance is a reliable indicator to estimate the potential of drought tolerance in cotton because

there is a negative correlation between stomatal conductance and drought tolerance. No effect of interaction between genotype and treatment (G x T) was found, indicating predictable response of the cultivars to the stress to which they were submitted.

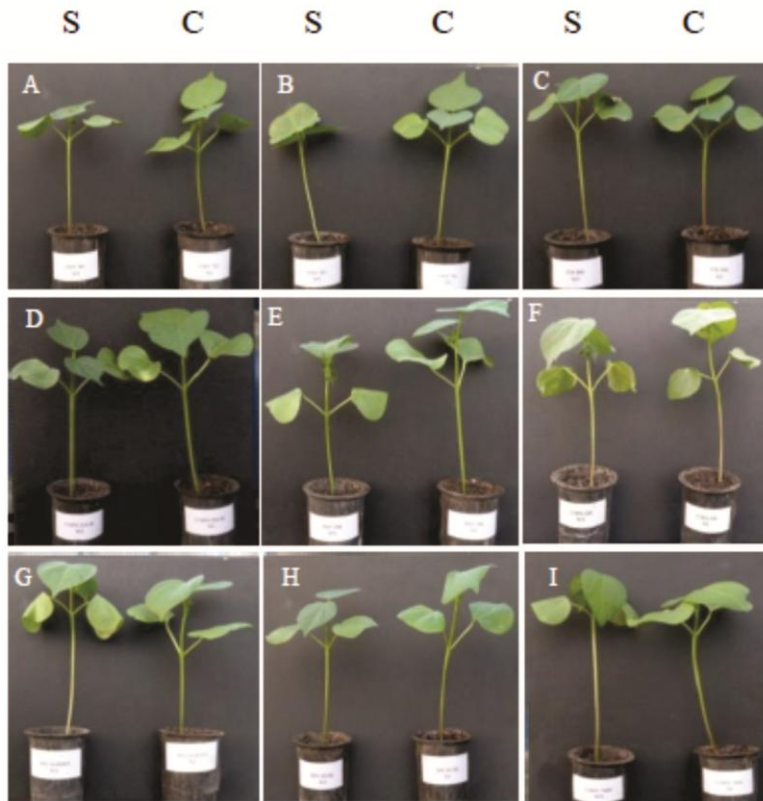


Fig 1. Cotton cultivars on the fifth day of stress water, with 50% of stomatal closure. A-FMT 701; B- FMT 705; C-FM 966; D- CNPA ITA 90; E- BRS 286; F- CNPA 5M; G- BRS SERIDÓ; H- BRS RUBI; I- CNPA 7MH. S- Stress; C- Control.

The plants, when submitted to water stress tend to reduce gas exchange as well as translocation of photoassimilates. In Table 3 are the values for E , C_i and A . In general, it was found that CNPA 5M, CNPA 7MH, BRS RUBI, and BRS SERIDÓ fall within the same statistical group. These genotypes have a greater ability to prevent the deleterious effects of water stress, and are therefore the ones that offer better

conditions to adjust physiologically to the stress to which they were subjected. The cultivars mentioned above presented the lowest reductions in the physiological variables, common characteristics in resistant genotypes. Highlighting genotype CNPA 5M, with minor reductions for E and C_i , greater transpiration indicates greater stomatal opening, and consequently greater accumulation of photoassimilates. The variation in the physiological parameters, such as transpiration and photosynthesis, have been suggested as tools for the comparison and evaluation of different plant varieties for drought tolerance (Krieg, 1983).

Hafeez *et al.* (2015) worked with contrasting cotton crops for drought tolerance and observed that the data referring to A , g_s and E presented the lowest reductions in plants tolerant to 5, 10, 15 and 20 days of water stress, corroborating with the tolerance profile of the genotypes studied here. During the water deficit, the various physiological adjustments of the plant determine the adaptive morpho-physiological responses. In a study with drought-tolerant transgenic cotton crops, Sarwar *et al.* (2017) observed, by means of gaseous exchange data, a lower reduction in variables A , g_s and E in transgenic plants with 5 and 10 days of water stress.

According to the findings in the literature, the impact of water stress in cotton crops depends not only on the duration, but also on the stage of development that occurs, being more sensitive during the reproductive phase (Baldo *et al.* 2009; Sun *et al.* 2015). Rodrigues *et al.* (2016) investigated the same cultivars of this study, submitted to 7 days of water stress in the R1 reproductive phase, and observed based on growth characteristics and the activity of antioxidative enzymes that the same group of plants presented adaptations to established drought conditions, especially the CNPA 5M, CNPA 7MH, and BRS SERIDÓ cultivars. Taking into account this data, we can observe that these materials maintain drought-tolerance characteristics

throughout its development.

The FMT 701, FMT 705, FM 966, CNPA ITA 90, and BRS 286 cultivars were less tolerant to the stress imposed because they presented the highest reductions in the physiological variables studied. Such behavior is a natural strategy of plants when subjected to water stress, in order to save water for the organism's vital processes, varying according to the tolerance (Baldo *et al.* 2009). Especially for the photosynthesis variable, the FMT 701 and FMT 705 cultivars were within the same statistical group, presenting the greatest reductions. Considering that this characteristic is of great importance for plant growth and development, this greater reduction can be reflected in a smaller development during the cycle, resulting in a lower production under drought conditions. With the exception of BRS 286, which has a double ability for cultivation in the Cerrado and in the Semi-arid, the other cultivars are better adapted to the Cerrado climate, with more suitable management for environments with an average annual rainfall of 1,300 mm.

Table 3. Average Transpiration (*E*), Internal Carbon Concentration (*C_i*) and Photosynthesis (*A*) in cotton cultivars submitted to water stress.

Cultivar	Treatment	<i>E</i>	Rdc	<i>C_i</i>	Rdc	<i>A</i>	Rdc
FMT 701	C	6,73	-	326	-	0,64	-
	S	3,22	52,14a	322	1,15bc	0,30	53,13a
FMT 705	C	7,55	-	327	-	0,71	-
	S	3,71	50,90ab	323	1,22b	0,32	54,47a
FM 966	C	8,26	-	328	-	0,70	-
	S	3,93	52,39a	324	1,22b	0,33	52,86ab
ITA 90	C	8,11	-	327	-	0,72	-
	S	4,00	50,65ab	323	1,28b	0,34	52,36ab
BRS 286	C	7,49	-	328	-	0,72	-
	S	3,72	50,33ab	323	1,46a	0,34	52,64ab
CNPA 5M	C	8,78	-	329	-	0,75	-

	S	5,05	42,43bc	326	0,76c	0,37	50,40b
CNPA 7MH	C	8,55	-	329	-	0,78	-
	S	4,63	45,82b	326	0,91c	0,39	50,19b
BRS RUBI	C	8,50	-	330	-	0,74	-
	S	4,25	49,95b	327	0,91c	0,36	51,35b
BRS SERIDÓ	C	8,74	-	327	-	0,80	-
	S	4,89	44,05b	325	0,84c	0,39	51,25b

Rdc- Relative difference in relation to control (%). Different letters differ statistically by the Tukey test ($p \leq 0.05$). C- Control; S- Stress.

***GUSPI* and *MYB60* expression**

The *GUSPI* (GenBank ID: 108483041) and *MYB60* (GenBank ID: 837403) genes were pre-selected *in silico* because they were involved in the water stress tolerance route in *A. thaliana* (Cominelli *et al.* 2010; Isokpehi *et al.* 2011; Jung *et al.* 2015). In this study, the *GUSPI* expression observed was higher in leaves of the CNPA 5M, CNPA 7MH, and BRS SERIDÓ genotypes compared to those considered more sensitive to water stress (Fig 2), corroborating with the results of the physiological variables found (Table 3), which demonstrate the adaptability of these genotypes to stress conditions. It can be verified that BRS SERIDÓ, CNPA 5M and CNPA 7MH revealed expression levels of 16.47x, 15.02x and 13.89x, respectively, higher than the control. For the genotypes adapted to the Brazilian Cerrado, the level of *GUSPI* expression in leaves was smaller, especially in the FMT 701 (1.63x), FMT 705 (2.16x), FM 966 (2.28x), and ITA 90 (2.80x) genotypes. According to the literature, genes from the USP family are regulated positively when the cell is exposed to external agents that cause some type of stress, being the greater expression in tolerant individuals (Maqbool *et al.* 2009). This characteristic was presented in the relatively more tolerant individuals of this study. Despite the lack of specific information on the molecular and biochemical mode of action in *GUSPI*, we observe that it presented a positive response (increase of expression) with the increase of stress and that its activity was greater in the genotypes more adapted to drought, thus indicating the adaptive function of genotypes under stress

conditions.

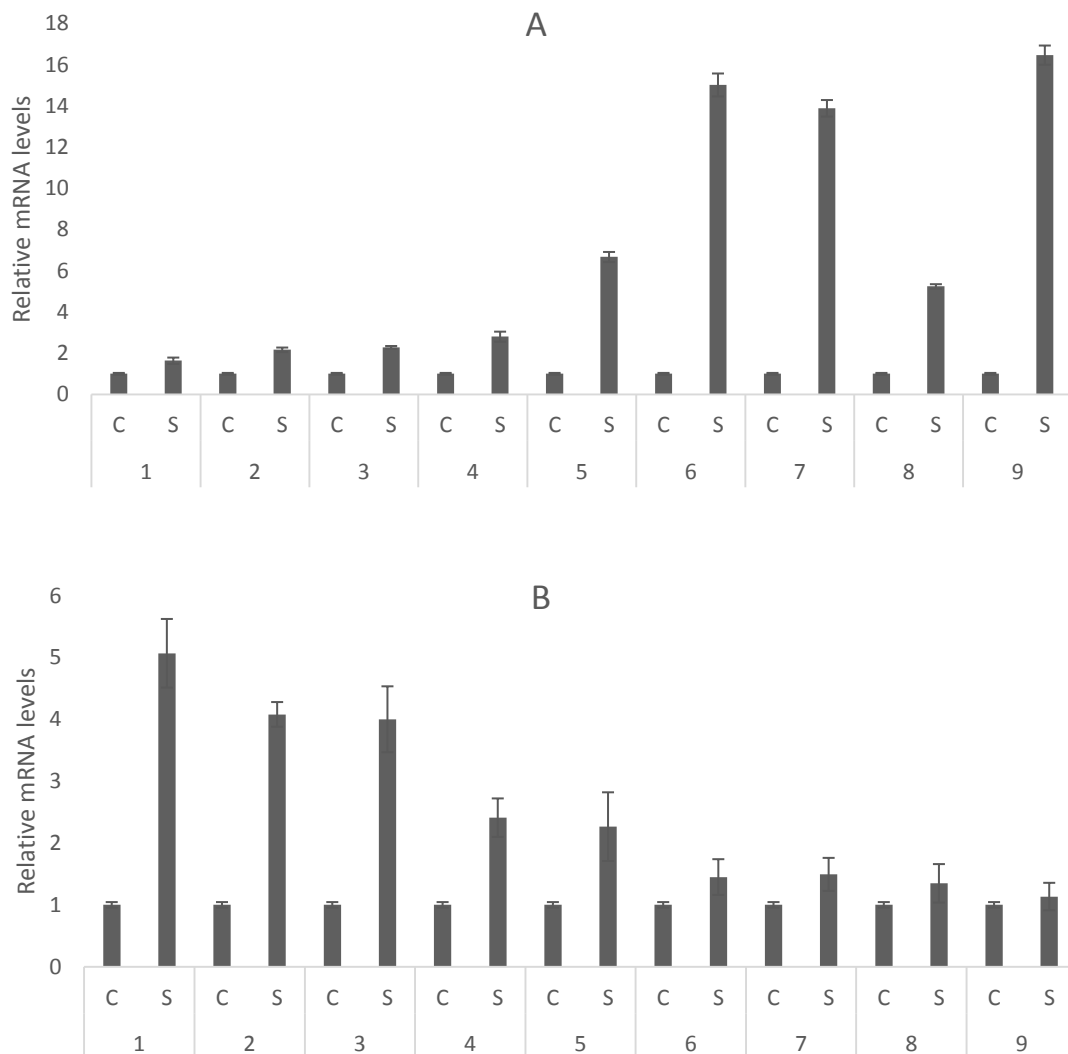


Fig 2. Relative value of transcripts *GUSPI* (A) and *MYB60* (B) by RT-qPCR in the control (C) and stress (S) treatments. 1- FMT 701, 2- FMT 705, 3- FM 966, 4- ITA 90, 5- BRS 286, 6- CNPA 5M, 7- CNPA 7MH, 8- BRS RUBI, 9- BRS SERIDÓ. Lower case compares among stressed genotypes (means tested by student's t-test, $p \leq 0.05$).

In a study with *G. arboreum* cotton using RT-qPCR techniques, Maqbool et. al. (2009) demonstrated that *GUSPI* presents constitutive expression, indicating a vital

role in the cell metabolism of the entire plant, although the expression pattern is greater in the leaves, suggesting a specific role of the USP in chloroplast. In a study with tomatoes (*Solanum pennellii*) under stress water, the *SpUSP* expression was identified in the stomata (Loukehaich *et al.* 2012), in this same study, the authors concluded that the gene overexpression increased the tolerance of tomatoes to drought in the seedling and adult stages. This information is relevant regarding the stability of expression, considering that said protein is possibly synthesized under stress throughout the development of the plant.

For the authors, the increase in ABA levels increased the number of gene transcriptions, thus indicating the positive relationship positive between water stress and the level of gene expression.

In *A. thaliana*, one of the genes in the USP (Universal Stress Proteins) family, the *USP-At3g53990*, exhibits a chaperone function of protecting plants from various environmental stresses, widely induced by heat stress, H₂O₂ and water deficit, in other words, the high expression of said gene confers tolerance to these plants (Jung *et al.* 2015). Despite the existence of information on USPs, especially in bacteria, in higher plants this data is still little explored, especially regarding molecular function.

Considering that the USPs respond to the various types of stress (drought, high salinity, temperature, apoxia, radiation, among others), their use is of great relevance in studies involving mechanisms of stress response in plants.

The large number of members of the MYB protein family indicates its importance in the control of specific biological processes in plants, where their functions have been investigated in numerous plant species such as *A. thaliana*, corn, cotton, rice, among others. Specifically, the *MYB60* has been studied only in *A. thaliana* and described as being involved in the regulation of stomatal movement,

relating to plant tolerance to water stress (Cominelli *et al.* 2005). In this study, the expression of *MYB60* in the leaves of cultivars adapted to dry environments was lower in CNPA 5M (1.45x), CNPA 7MH (1.49x), and BRS SERIDÓ (1.13x), while a high expression level in genotypes sensitive to stress was observed in FMT 701, FMT 705 and FM 966, with 5.07x, 4.08x and 4.00x respectively. These results corroborate with the findings of Oh *et al.* (2011), who found a high expression of two variants of *MYB60* in *Arabidopsis* plants sensitive to water stress. These *MYB60* variants are located in the nucleus and promote deflation of guard cells in response to the water deficit conferring sensitivity to stress. It is worth noting that each variant of the *MYB60* gene has a specific function depending on the environmental variable, as for example, the presence or absence of light and CO₂ concentration in the atmosphere (Cominelli *et al.* 2005; Liang *et al.* 2005).

According to Oh *et al.* (2011), under normal conditions, *MYB60* is expressed in substantial levels. In the early stages of stress, the low level of ABA leads to an increase in expression levels in *MYB60*; on the other hand, when the plant is under severe water stress, the *MYB60* expression is inhibited, resulting in stomatal closure and inhibition of root growth. This promotes differentiated responses in plants that are tolerant and sensitive to drought, as is also observed in the cotton cultivars evaluated in this study.

In another study involving *A.thaliana*, Cominelli *et al.* (2005) observed, via RT-PCR, a decrease in the expression of the *AtMYB60* gene as dehydration stress was increased and by exogenous ABA at a 8-hour interval, after 48 hours there is an increase in gene expression in the treatment with ABA. This suggests that its activity increases with the progression of stress, at least up to two days from the start of treatment.

The data published here is the first to relate to the *MYB60* gene with cotton crops, because most of the studies concerning *MYB* genes in plants are described in *A. thaliana* (Abe *et al.* 2003; Cominelli *et al.* 2005, 2010; Oh *et al.* 2011).

CONCLUSIONS

Considering the results presented here, *GUSP1* and *MYB60* can be used in the identification of cotton genotypes with water-stress tolerance characteristics in the V2 phase, especially the *GUSP1* gene due to the greater amount of information available for cotton.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Embrapa (Brazilian Agricultural Research Corporation) for the financial support. To Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the scholarship granted.

REFERENCES

Abe H., Urao T., Ito T., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2003) *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell*, **15**, 63-78.

Ártico S., Alves M.R. (2014) Transcriptome analysis of *Gossypium hirsutum* flower buds infested by cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) larvae. *BMC Genomics*, **15**, 1-24.

Baldo R., Scalon S.P.Q., Rosa Y.B.C.J., Mussury R.M., Betoni R., Barreto W.S. (2009) Comportamento do algodoeiro cultivar delta opal sob estresse hídrico com e sem aplicação de bioestimulante. *Cienc.Agrotec*, **33**, 804-1812.

Chen T., Li W., Hu X., Guo J., Liu A., Zhang B. (2015) A Cotton MYB Transcription Factor, GbMYB5, is Positively Involved in Plant Adaptive Response to Drought Stress. *Plant Cell Physiol*, **56**, 917-929.

Cominelli E., Galbiati M., Tonelli C. (2010) Transcription factors controlling stomatal movements and drought tolerance. *Transcription*, **1**, 1-5.

Cominelli E., Galbiati M., Vavasseur A., Conti L., Sala T., Vuylsteke M., Leonhardt N., Dellaporta S.L., Tonelli C. (2005) A guard-cell-specific MYB transcription factor regulates stomatal movements and plant drought tolerance. *Curr Biol*, **15**, 1196–1200.

Ferreira D.F. (2014) Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Cienc Agrotec*, **38**, 109-112.

Hafeez M.N., Sadique S., Hassan S., Sarwar M.B., Rashid B., Ali Q., Husnain T. (2015) Physiological, morphological, biochemical and molecular basis of drought tolerance in cotton. *IJBPAS*, **4**, 1091-1112.

Hejnák V., Tatar Ö., Atasoy G.D., Martinková J., Çelen A.E., Hnilička F., Skalický M. (2015) Growth and photosynthesis of Upland and Pima cotton: response to drought and heat stress. *Plant Soil Environ*, **11**, 507–514.

Hussain S.S., Kayani M.A., Amjad M. (2011) Transcription factors as tools to engineer enhanced drought stress tolerance in plants. *Biotech P*, **2**, 297-306.

Isokpehi R.D., Simmons S.S., Hari H.P., Stephen C.I.N., Gregorio E.B, Ayensu W.K. (2011) Identification of Drought-Responsive Universal Stress Proteins in Viridiplantae. *Bioinf Biol Ins*, **5**, 41–58.

Jung Y.J., Melencion S.M.B. (2015) Universal stress protein exhibits a redox-dependent chaperone function in *Arabidopsis* and enhances plant tolerance to heat shock and oxidative stress. *Front Plant Sci*, **6**, 1141.

Krieg D.R. (1983) Photosynthetic activity during stress. *Agricultural Water Management*, **7**, 249-263.

Kumar B., Pandey D.M., Goswami C.L., Jain S. (2001) Effect of growth regulators on photosynthesis, transpiration and related parameters in water stressed cotton. *Biol Plant*, **44**, 475–478.

Li C., Ng C.K.Y., Fan L.M. (2015) MYB transcription factors, active players in abiotic stress signaling. *Env Exp Bot*, **114**, 80–91.

Liang C., Meng Z., Meng Z., Malik W., Yan R., Lwin K.M., Lin F., Wang Y., Sun G., Zhou T., Zhu T., Li J., Jin S., Guo S., Zhang R. (2016) *GhABF2*, a bZIP transcription factor, confers drought and salinity tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Sci Rep*, **6**, 35-40.

Liang Y.K., Dubos C., Dodd I.C., Holroyd G.H., Hetherington A.M., Campbell M.M. (2005) *AtMYB61*, an R2R3-MYB transcription factor controlling stomatal aperture in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol*, **15**, 1201-1206.

Livak KJ, Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} *Method Methods*, **25**, 402-408.

Maqbool A., Zahur M., Husnain T., Riazuddin S. (2009) *GUSP1* and *GUSP2*, Two Drought-Responsive Genes in *Gossypium arboreum* Have Homology to Universal Stress Proteins. *Plant Mol Biol Rep*, **27**, 109-114.

Oh J.E., Kwon Y., Kim J.H., Noh H., Hong S.W., Lee H. (2011) A dual role for *MYB60* in stomatal regulation and root growth of *Arabidopsis thaliana* under drought stress. *Plant Mol Biol*, **77**, 91-103.

Parida A.K., Dagaonkar V.S., Phalak M.S., Umalkar G., Aurangabadkar L.P. (2007) Alterations in photosynthetic pigments, protein and osmotic components in cotton genotypes subjected to short-term drought stress followed by recovery. *Plant Biotechnol Rep*, **1**, 37-48.

Rodrigues J.D., Silva C.R.C., Pereira R.F., Ramos J.P.C., Melo Filho P.A., Cavalcanti J.J.V., Santos R.C. (2016) Characterization of water stress tolerant cotton cultivars based on plant growth and in activity of antioxidant enzymes. *Afr J Agric Res*, **11**, 3763-3770.

Sarwar M.B., Sadique S., Hassan S., Sania R., Rashid B., Mohamed B.B., Husnain T. (2017) Physio-Biochemical and Molecular Responses in Transgenic Cotton under Drought Stress. *Tar Bil Der*, **23**, 157-166.

Sauter M., Rzewuski G., Marwedel T., Lorbiecke R (2002) The novel ethylene-regulated gene *OsUsp1* from rice encodes a member of a plant protein family related to prokaryotic universal stress proteins. *J Exp Bot*, **53**, 2325-2331.

Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J Exp Bot*, **58**, 221–227.

Souza A.M.S., Batista V.G.L., Pinheiro M.P.N., Suassuna J.F., Lima L.M., Fernandes P.D. (2016) Expression of *NCED* gene in colored cotton genotypes subjected to water stress. *Rev Bras Eng Agríc e Amb*, **20**, 692-696.

Sun Y.P., Niu G.H., Zhang J.F., Valle P. (2015) Growth responses of an interspecific cotton breeding line and its parents to controlled drought using an automated irrigation system. *The Journal of Cotton Science*, **19**, 290-297.

Taji T., Ohsumi C., Iuchi S., Seki M., Kasuga M., Kobayashi M., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **29**, 417-26.

Ullah A., Sun H., Yang X., Zhang X. (2017) Drought coping strategies in cotton: increased crop per drop. *Plant Biotechnol J*, **15**, 271-284.

Wang X.F., Su J., Yang N., Zhang H., Cao X.Y., Kang J.F. (2017) Functional Characterization of Selected Universal Stress Protein from *Salvia miltiorrhiza* (*SmUSP*) in *Escherichia coli*. *Genes (Basel)*, **8**, 224.

Wohlbach D.J., Quirino B.F., Sussman M.R. (2008) Analysis of the *Arabidopsis* histidine kinase ATHK1 reveals a connection between vegetative osmotic stress sensing and seed maturation. *Plant Cell*, **20**, 1101-1117.

Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Rev Plant Biol*, **57**, 781–803.

Zonta J.H., Brandão Z.N., Rodrigues J.I.S, Sofiatti V. (2017) Resposta do algodoeiro ao déficit hídrico em diferentes fases de crescimento. *Rev Caatinga*, **30**, 980-990.

4. CONCLUSÃO

Considerando os resultados presentes nesse trabalho, os genes *GUSP1* e *MYB60* podem ser utilizados na identificação de genótipos de algodoeiro com tolerância ao estresse hídrico na fase V2 de desenvolvimento.

ANEXO 01

Submissão do artigo “**Profile of two drought related-genes during early growth of cotton genotypes submitted to water stress**” à revista **GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY**

Genetics and Molecular Biology



Profile of two drought related-genes during early growth of cotton genotypes submitted to water stress

Journal:	<i>Genetics and Molecular Biology</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Batista, Vandré; UFRPE/Renorbio, Agronomy Fernandes, Pedro; Universidade Estadual da Paraíba, Agroecology Santos, Roseane; Embrapa Algodão, Biotechnology Laboratory Melo Filho, Péricles; Universidade Federal Rural de Pernambuco, Agronomy Lima, Liziane; Embrapa Algodão, Biotechnology Laboratory
Keyword:	gene expression, gas exchange, antioxidative enzymes, MYB60, GUSP1

SCHOLARONE™
Manuscripts

ANEXO 02

Submissão artigo "GUSP1 and MYB60 respond to water stress in cotton cultivars"

à revista **PLANT BIOLOGY**

Manuscript submitted to editorial office



GUSP1 and MYB60: respond to water stress in cotton cultivars

Journal:	<i>Plant Biology</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Research Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Batista, Vandré; UFRPE/Renorbio, Agronomy Fernandes, Pedro; Universidade Estadual da Paraiba, Agroecology Cavalcanti, José Jaime; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria, Crop Breeding Santos, Roseane Melo Filho, Péricles Lima, Liziane; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria, Biotechnology Laboratory
Keyword:	Drought, Semi-arid, Gene expression, Stomatal closure

SCHOLARONE™
Manuscripts