



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM AGRONOMIA**

BRUNA OLIVEIRA REINHEIMER SPOLAOR

**APLICAÇÃO DE MELATONINA SOBRE ALGODOEIRO SUBMETIDO A REGIME
DE ALTA TEMPERATURA**

Presidente Prudente - SP
2022



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM AGRONOMIA**

BRUNA OLIVEIRA REINHEIMER SPOLAOR

**APLICAÇÃO DE MELATONINA SOBRE ALGODOEIRO SUBMETIDO A REGIME
DE ALTA TEMPERATURA**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de concentração: Produção Vegetal.

Orientadora:
Profa. Dra. Adriana Lima Moro

Coorientador:
Prof. Dr. Fábio Rafael Echer

Presidente Prudente - SP
2022

633.51
S762a

Spolaor, Bruna Oliveira Reinheimer.
Aplicação de melatonina sobre algodoeiro submetido
a regime de alta temperatura / Bruna Oliveira Reinheimer
Spolaor. – Presidente Prudente, 2022.
94f.: il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente
Prudente, SP, 2022.

Bibliografia.

Orientador: Adriana Lima Moro.

1. Algodão. 2. Estresse térmico. 3. Produtividade. I.
Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "APLICAÇÃO MELATONINA SOBRE ALGODOEIRO SUBMETIDO A REGIME DE ALTA TEMPERATURA"

AUTOR(A): BRUNA OLIVEIRA SPOLAOR

ORIENTADOR(A): Profa. Dra. ADRIANA LIMA MORO

Aprovado(a) como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE em AGRONOMIA

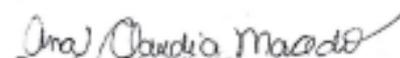
Área de Concentração PRODUÇÃO VEGETAL, pela Comissão Examinadora:


Dra. Adriana Lima Moro

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)


Dr. Alexandrius de Moraes Barbosa

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)


Dra. Ana Claudia Macedo

STOLLER do Brasil / Campinas (SP)

Data da realização: Presidente Prudente, 24 de fevereiro de 2022.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, especialmente aos meus pais Josiane e Marcos, minha base. Dedico ao meu noivo que foi e é meu suporte por toda minha vida acadêmica. Dedico a Deus, acima de tudo, pois tudo foi feito para sua Ele e por Ele.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todo suporte e sustento.

“Deem graças em todas as circunstâncias, pois esta é a vontade de Deus para vocês em Cristo Jesus” (1 Tessalonicenses 5:18).

Aos meus pais Josiane e Marcos, pelo apoio incondicional, amor, confiança e paciência. As minhas irmãs que me deram sábios conselhos e momentos felizes. Sinto um amor incondicional por vocês.

Ao meu esposo Timóteo, que me trouxe tranquilidade, amor e suporte para passar por este desafio. Te amo e sou grata por ti.

A Profa. Dra. Adriana Limo Moro (Dri), pela orientação desde a graduação, confiança, paciência e amizade. Uma cientista para admirar e se espelhar! Aqui deixo meu agradecimento e admiração!

À Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), pela infraestrutura. A todos os professores, em especial: ao Prof. Dr. Fábio Rafael Echer, pelo suporte e atenção.

Ao Centro de Estudos em Ecofisiologia Vegetal do Oeste Paulista (CEVOP), grupo de pesquisa do qual faço parte desde a graduação. Obrigada a todos os membros, pelo conhecimento adquirido, uso dos equipamentos, auxílio durante o experimento, amizade e por todos os momentos de descontração. Em especial ao Prof. Dr. Hilton Fabrício Vítolo, por todo suporte e apoio intelectual.

Bem como ao Grupo de Estudo do Algodão (GEA), por todo suporte oferecido durante a instalação e desenvolvimento do experimento de campo.

Ao meu trio de amizade, Daniele Sukert, Héliida Sala e Ítalo Rafael, agradeço cada momento vivido, por todas as risadas, choros e comilança, amo vocês!

Obrigada!

*“Eu sou a videira; vocês são os ramos, se alguém permanece em mim e eu nele,
esse dará muito fruto; pois sem mim vocês não podem fazer coisa alguma”*

(João 15:5)

RESUMO

Aplicação de melatonina sobre algodoeiro submetido a regime de alta temperatura

O algodão é uma cultura em crescente expansão no comércio mundial. Suas fibras e sementes são utilizadas na fabricação de tecidos, alimentação humana e animal. Por outro lado, a cultura apresenta queda no rendimento produtivo quando exposto à altas temperaturas. Contudo, a biomolécula melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) pode amenizar os efeitos danosos causados pela alta temperatura e aumentar seu potencial produtivo. Ativação do sistema antioxidante, proteção do aparato fotossintético, incremento na germinação e promoção de enraizamento são algumas das características já conhecidas da melatonina (mel). O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da aplicação exógena de melatonina no processo germinativo e reprodutivo do algodoeiro sob regime de alta temperatura e em condições de campo. Na primeira e segunda fase o delineamento foi inteiramente casualizado, fatorial duplo (doses de melatonina x temperatura alta e ideal (38°/28° e 30°/20°), com 10 repetições. Na primeira fase, de germinação, foi aplicado a mel em sementes de algodão nas doses 0,0; 50 e 100 µM, com regime de alta temperatura (diurna e noturna), seguidos de teste de germinação, comprimento de radícula e avaliação de massa de matéria seca. A segunda fase, realizada em câmaras tipo *fitotron*, foi aplicado 100 µM mel foliar em algodão em diferentes fases fenológicas, com regime de alta temperatura (38°/28°) na fase F1 por sete dias, com posteriormente retomando a temperatura normal (30°/20°). Medidas de trocas gasosas, análises bioquímicas, expressão gênica da Hsp70 e retenção das estruturas reprodutivas foram feitas. Na terceira etapa foi em blocos casualizado em campo, sendo duas doses de melatonina (0 e 100 µM). As aplicações de mel ocorreram na fase B1 e F1. Foram avaliados peso e número de capulhos, altura de planta e produtividade. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (p <0.05). Em testes de germinação a dose de 50 µM mitigou os efeitos danosos do estresse térmico, potencializando a germinação e desenvolvimento de plântulas, promovendo ganho de biomassa e comprimento radicular. Da mesma forma, no segundo experimento em Fitotron, a melatonina reduziu os efeitos negativos da alta temperatura, na fisiologia, bioquímica e produção de plantas de algodão. Melhora no aparato fotossintético, acúmulo de açúcares, redução nos danos oxidativos, melhora na germinação e desenvolvimento do grão de pólen, ocasionando queda na taxa de abortamento e aumento da retenção de estruturas de produção, em plantas submetidas ao regime de alta temperatura. Em campo, a melatonina proporcionou incremento no comprimento de planta, aumento na produção de capulho, conseqüentemente, ganho na produtividade de fibra e caroço de algodão. A aplicação de melatonina proporciona a mitigação dos efeitos do estresse térmico, proporcionando melhor desempenho da cultura sobre condição hostil, acarretando em desempenho fisiológico e bioquímico e ganho de produtividade.

Palavras-chave: estresse térmico, fotossíntese, produtividade, germinação pólen, *Gossypium hirsutum*.

ABSTRACT

Effect of melatonin on cotton under high temperature regime

Cotton is an expanding crop in world trade. Its fibers and seeds are used in the manufacture of fabrics, human and animal food. On the other hand, the crop shows a drop in yield when exposed to high temperatures. The melatonin biomolecule, the melatonin biomolecule (high temperature, however, can increase and increase its productive potential). Activation of the antioxidant system, protection of the photosynthetic apparatus, increase in germination and promotion of rooting are some of the already known characteristics of melatonin (honey). The objective of the present work was to evaluate the effects of exogenous application of melatonin on the germination and reproductive process of cotton under high temperature and field conditions. In the first and second phases, the design was completely randomized, double factorial (melatonin doses x high and ideal temperature (38°/28° and 30°/20°), with 10 replications. In the first phase, germination, honey was applied to seeds of cotton at doses of 0.0, 50 and 100 µM, with a high temperature regime (day and night), followed by germination test, radicle length and dry matter mass evaluation. phenological phases, with a high regime (38°/28°) in the F1 phase for seven days, with later renewing the normal (30°/20°). melatoninized blocks in the B1 and F1 phase of bolls, plant height and productivity. Data were selected for analysis of variance and model means by Tukey's test ($p < 0.05$). In germination tests, the dose of 50 µM mitigates the effects of heat stress damage, potential promoting germination and plant development, promoting biomass gain and root length. Likewise, the same test way in cotton plants, biochemistry and high temperature production in physiology, bio and high temperature plant production in Fittron physiology, the second untested temperature in fittron cotton, the second test way in fittron cotton, the second production of phyto cotton plants, biochemical and high-temperature production in cotton. Improvement in apparatus, plant accumulation, reduction in production grain damage, improvement in germination in pollen grain drop and increase in oxidation, in photos and development of occasional sugar structures, increasing temperature oxidizing high rate regime. In gain, melaton, in increasing plant length, increased boll production, consequently, in fiber and cottonseed productivity. The application of latonin application provides a mitigation of the thermal effects, improving the performance of the culture under the hostile condition, improving the performance of the culture under the hostile condition, increasing the balance capacity and biochemical performance and productivity gain.

Keywords: heat stress, photosynthesis, productivity, pollen germination, *Gossypium hirsutum*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Biossíntese da melatonina a partir do triptofano em plantas. A reação enzimática ocorre da seguinte forma: T5H, triptofano 5-hidroxilase; CDT, triptofano descarboxilase; SNAT, N-acetiltransferase de serotonina; e HIOMT, hidroxiindole-O-metiltransferase. Linhas pontilhadas representam reações alternativas descritas em casos particulares.....	27
Figura 2 -	Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μMol) na % de germinação (B), em sementes de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal. Letras maiúsculas comparam as doses e minúsculas o tratamento térmico.....	33
Figura 3 -	Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μMol) no índice de velocidade de germinação (IVG) e na % de germinação (B), em sementes de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal. Letras maiúsculas comparam as doses e minúsculas o tratamento térmico.....	34
Figura 4 -	Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μMol) no comprimento de parte aérea, em sementes de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal. Letras maiúsculas comparam as doses e minúsculas o tratamento térmico.....	35
Figura 5 -	Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μMol) no comprimento de raiz, em sementes de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal. Letras maiúsculas comparam as doses e minúsculas o tratamento térmico.....	36
Figura 6 -	Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μMol) no comprimento total, em sementes de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal. Letras maiúsculas comparam as doses e minúsculas o tratamento térmico.....	36
Figura 7 -	Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μMol) na massa seca de parte aérea, em sementes de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal. Letras maiúsculas comparam as doses e minúsculas o tratamento térmico.....	37
Figura 8 -	Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μMol) na massa seca de raiz, em sementes de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal. Letras maiúsculas comparam as doses e minúsculas o tratamento térmico.....	38
Figura 9 -	Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μMol) na massa seca total, em sementes de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal. Letras maiúsculas comparam as doses e minúsculas o tratamento térmico.....	38

Figura 10 -	Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μMol) na aérea de raiz, em sementes de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal. Letras maiúsculas comparam as doses e minúsculas o tratamento térmico.....	39
Figura 11 -	Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μMol) no número de raiz, em sementes de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal. Letras maiúsculas comparam as doses e minúsculas o tratamento térmico.....	40
Figura 12 -	Esquema cronológico de aplicação de melatonina e imposição do estresse térmico.....	45
Figura 13 -	Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μM) na taxa de assimilação de CO_2 (PN) (A), na condutância estomática (GS) (B), na concentração intercelular de CO_2 (C_i) (C) e na transpiração (E) (D), em plantas de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal, dois dias após submissão do estresse. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição térmica. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições térmicas dentro da mesma dose.....	54
Figura 14 -	Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μM) na taxa de assimilação de CO_2 (PN) (A), na condutância estomática (GS) (B), na concentração intercelular de CO_2 (C_i) (C) e na transpiração (E) (D), em plantas de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal, cinco dias após submissão do estresse. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição térmica. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições térmicas dentro da mesma dose.....	55
Figura 15 -	Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μM) na taxa de assimilação de CO_2 (PN) (A), na condutância estomática (GS) (B), na concentração intercelular de CO_2 (C_i) (C) e na transpiração (E) (D), em plantas de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal, sete dias após submissão do estresse. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição térmica. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições térmicas dentro da mesma dose.....	56

- Figura 16 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μM) na taxa de assimilação de CO_2 (PN) (A), na condutância estomática (GS) (B), na concentração intercelular de CO_2 (C_i) (C) e na transpiração (E) (D), em plantas de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal, 24h após retomada da temperatura normal. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição térmica. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições térmicas dentro da mesma dose..... 57
- Figura 17 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μM) na taxa de transporte de elétrons (ETR), em plantas de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal, sete dias após submissão do estresse (A) e 24h após retomada da temperatura normal (B). Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição térmica. minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições térmicas dentro da mesma dose..... 58
- Figura 18 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μM) área foliar (A), no comprimento de caule (B), na massa seca total (C) e na massa seca de raiz (D), em plantas de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal, 15 dias após retomada da temperatura normal. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição térmica. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições térmicas dentro da mesma dose..... 59
- Figura 19- Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μM) concentração de MDA, em plantas de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal, sete dias após submissão do estresse. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição térmica. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições térmicas dentro da mesma dose..... 60
- Figura 20 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μM) concentração de superóxido (A) e na concentração de peróxido (B), em plantas de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal, sete dias após submissão do estresse. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição térmica. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições térmicas dentro da mesma dose..... 61

- Figura 21 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μM) na concentração de ascorbato peroxidase (APX) (A), na concentração de peroxidase (POD) (B) e concentração de superóxido dismutase (SOD) (C) em plantas de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal, sete dias após submissão do estresse. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição térmica. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições térmicas dentro da mesma dose..... 62
- Figura 22 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μM) na expressão relativa da HSP70, em plantas de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal, 4 horas após submissão do estresse. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição térmica. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições térmicas dentro da mesma dose..... 63
- Figura 23 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μM) na concentração de sacarose (A), na concentração glicose (B) e concentração de frutose (C) em plantas de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal, sete dias após submissão do estresse. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição térmica. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições térmicas dentro da mesma dose..... 64
- Figura 24 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μM) na concentração de frutose (A), na concentração glicose (B), concentração de sacarose (C) e na concentração de sorbitol (D), em plantas de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal, um dia após a retomada da temperatura normal. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição térmica. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições térmicas dentro da mesma dose..... 65
- Figura 25 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μM) na % de germinação dos grãos de pólen (A) e no comprimento do tubo polínico (B), em plantas de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal, sete dias de estresse. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição térmica. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições térmicas dentro da mesma dose..... 66
- Figura 26 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μM) na % de abortamento (A), número de estruturas retidas (B) e na % de retenção (C), em plantas de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal, 15 dias

após retomada da temperatura normal. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição térmica. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições térmicas dentro da mesma dose..... 67

Figura 27 - Histórico da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) máxima, média e mínima durante condução do estudo. Presidente Bernardes, São Paulo, Brasil (Estação Meteorológica – Universidade do Oeste Paulista (Unoeste). 2020/2021..... 75

Figura 28 - Histórico precipitação (mm) durante condução do estudo. Presidente Bernardes, São Paulo, Brasil (Estação Meteorológica – Universidade do Oeste Paulista (Unoeste). 2020/2021..... 75

Figura 29 - Figura 29 – Balanço hídrico (Déficit ou Excess – (mm)) durante condução do estudo. Presidente Bernardes, São Paulo, Brasil (Estação Meteorológica – Universidade do Oeste Paulista (Unoeste). 2020/2021..... 76

Figura 30 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μM) na altura de plantas de algodão. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses de melatonina..... 78

Figura 31 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μM) no número de capulho por metro quadrado (A) e no peso médio de capulho (B). Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses de melatonina..... 79

Figura 32 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μM) na produtividade de fibra (A) e na produtividade de caroço (B). Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses de melatonina..... 80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Descrição dos genes e sequências dos iniciadores utilizados para o RT-qPCR.....	53
Tabela 2 -	Característica químicas do solo, antes da implantação da cultura.....	76

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1	Cultura do algodoeiro sob estresses abióticos (alta temperatura).....	20
2.2	Resposta metabólica por alta temperatura.....	23
2.3	Biorreguladores e seus efeitos em plantas.....	25
2.4	Melatonina e sua ação sob estresses em planta.....	26
3	AÇÃO DA MELATONINA NO DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES DE ALGODÃO SOB ALTA TEMPERATURA.....	31
3.1	Objetivo.....	31
3.1.1	Objetivo geral.....	31
3.1.2	Objetivo específico.....	31
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.2.1	Condução do experimento.....	31
3.2.2	Teste de germinação.....	32
3.2.3	Análise estatística.....	32
3.3	Resultados.....	33
3.4	Discussão.....	40
3.5	Conclusão.....	42
4	DESEMPENHO FISIOLÓGICO DA APLICAÇÃO DE MELATONINA EM PLANTAS DE ALGODÃO SUBMETIDAS A REGIME DE ALTA TEMPERATURA.....	44
4.1	Objetivo.....	44
4.1.1	Objetivo geral.....	44
4.1.2	Objetivo específico.....	44
4.2	Materiais e Métodos.....	44
4.2.1	Condução do experimento.....	44
4.2.2	Medidas de trocas gasosas.....	46
4.2.3	Taxa de transporte de elétrons.....	46
4.2.4	Análise bioquímica.....	46
4.2.5	Atividade da Superóxido dismutase (SOD).....	47
4.2.6	Atividade da peroxidase (POD).....	47
4.2.7	Atividade da enzima Ascorbato Peroxidase (APX).....	47
4.2.8	Determinação de O ₂ ⁻ , H ₂ O ₂ e peroxidação lipídica.....	48
4.2.9	Quantificação de carboidrato e amido em botões florais e taxa de germinação do grão de pólen.....	49
4.2.10	Componentes de produção.....	49
4.2.11	Seleção de genes.....	50
4.2.12	Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores.....	50
4.2.13	Extração de RNA.....	50

4.2.14	Síntese de cDNA.....	51
4.2.15	PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR).....	52
4.2.16	Análise estatística.....	53
4.3	Resultados	54
4.3.1	Avaliações fisiológicas.....	54
4.3.2	Avaliação biomassa.....	58
4.3.3	Avaliações bioquímicas.....	59
4.3.4	Avaliação produção.....	65
4.4	Discussão	67
4.4.1	Melatonina e sua ação nas trocas gasosas e bioquímica de plantas submetidas a alta temperatura.....	67
4.4.2	Melatonina e sua ação na viabilidade de pólenes e componentes de produção de plantas submetidas a alta temperatura.....	70
4.5	Conclusão	73
5	Ação da melatonina no desenvolvimento de sementes de algodão sob alta temperatura	74
5.1	Objetivo	74
5.1.1	Objetivo geral.....	74
5.1.2	Objetivo específico.....	74
5.2	Materiais e Métodos	74
5.2.1	Caracterização da área de estudo.....	74
5.2.2	Condução do experimento.....	76
5.2.3	Avaliação biométrica e de produção.....	77
5.2.4	Análise estatística.....	77
5.3	Resultados	77
5.4	Discussão	80
5.5	Conclusão	82
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
	REFERÊNCIAS	84

1 INTRODUÇÃO

Rico em fibra, o algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) é matéria prima para fabricação de roupas e alimento para animais, tendo grande importância na economia nacional e mundial (CHIAVEGATO *et al.*, 2009). Cultivado em larga escala no país, o algodoeiro pode atingir altas produtividades, desde que esteja exposto a condições favoráveis. A alta temperatura é um dos fatores abióticos que mais afere danos para a cultura do algodoeiro (HEJNÁK *et al.*, 2015). Danos oxidativos, queda na germinação, perturbação no aparato fotossintético, abortamento de flores, abscisão de frutos, queima das folhas, são alguns dos danos causados pelo estresse por alta temperatura (ZHAO *et al.*, 2005; SINGH *et al.*, 2007; DEEBA *et al.*, 2012).

Nas regiões do Centro-Oeste e Nordeste do país, e parte da região Sudeste, concentra-se grande porcentagem da produção nacional agrícola do algodoeiro (USDA, 2019). Estas regiões são caracterizadas por temperaturas elevadas em grande parte do ano. Picos de altas temperaturas têm sido registrado com frequência pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), no qual ultrapassa o limite de temperatura ideal da cultura. A necessidade de prevenir ou combater os efeitos danosos da alta temperatura e falta no algodoeiro é de extrema necessidade.

O uso de biomoléculas que podem amenizar os efeitos danosos de estresse abiótico vem ganhando cada vez mais espaço (XIAO *et al.*, 2019). A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), é uma indolamina encontrada naturalmente em plantas. Utilizada no sistema de defesa contra radicais livres, a melatonina (mel) também atua como um biorregulador osmoprotetor, captura espécie reativa de oxigênio, estimula a ação de enzimas antioxidantes, age na expressão de genes envolvidos na divisão celular, fotossíntese, metabolismo de carboidratos, dentre outros processos (VITALINI *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2017; AHAMMED *et al.*, 2019; XIAO *et al.*, 2019; ERLAND *et al.*, 2019, CHEN *et al.*, 2020). A mel ainda atua como promotora de crescimento e agente de enraizamento, em condições favoráveis ou de estresse (ERLAND *et al.*, 2019; HERNÁNDEZ-RUIZ *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2020). Ainda, a melatonina age positivamente sob a floração, frutificação e senescência foliar (ZHANG *et al.*, 2014).

Vários estudos relatam a atuação da melatonina como um atenuante de estresse térmico (BYEON *et al.*, 2014; XU *et al.*, 2016; AHAMMED *et al.*, 2019). A

ação da melatonina em situações de estresses abióticos indica seu papel como efetivo mitigador nestas situações, desta forma, a melatonina pode atuar como um agente promotor de enraizamento, crescimento de planta, promotor do sistema antioxidante, reduzindo assim os possíveis efeitos ocasionados por alta temperatura em plantas de algodão.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cultura do algodoeiro sob estresses abióticos (alta temperatura)

O algodoeiro é uma dicotiledônea perene, com hábito de crescimento indeterminado, pertencente à família Malvaceae (WENDEL *et al.*, 2010). Grande parte das espécies já classificadas estão localizadas em uma faixa geográfica de regiões tropicais e subtropicais, com características de ambiente áridos (WENDEL *et al.*, 2010). Matéria prima para a produção de fibras, o algodoeiro é uma cultura que se destaca no comércio nacional e mundial.

Cultivada em larga escala, o algodoeiro representa a principal cultura para a produção de fibra, além do uso das sementes como fonte de alimento para animais e para a produção de óleo (CHIAVEGATO *et al.*, 2009; ECHER, 2014). Segundo a estimativa do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), em seu relatório de setembro de 2019, a produção mundial da cultura se concentra em apenas cinco países do mundo. Índia, Estados Unidos e China disparam na produção do algodoeiro, somando um total de mais de 60% da área plantada com o algodoeiro.

O Brasil se destaca como o 5º maior produtor mundial, tendo uma representatividade de 4,5% em área de produção da cultura (USDA, 2019). Ainda, a produção nacional de algodão está em crescente expansão, na qual obtém um aumento estimado de 35,9% em sua produção e 37,8% em área total cultivada com algodoeiro (CONAB, 2019; USDA 2019). Sua produção está concentrada na região Centro-Oeste e Nordeste do país, no qual, mais de 88 % da produção nacional está localizada nos estados de Mato Grosso e Bahia (CONAB, 2022). O estado de São Paulo vem ganhando cada vez mais espaço no cenário agrícola do algodoeiro. Com uma produção de 3,7 mil toneladas e uma área de 2,80 mil hectares na safra de 2016/2017, teve um aumento de 16,2 e 9,90, respectivamente, em relação à safra de 2018/2019 (ABRAPA, 2019). Na região oeste do estado, a cultura tem adquirido destaque, com o aumento de área de produção, em estudos e pesquisa.

Com o clima caracterizado por altas temperaturas, essas cidades têm registrado temperaturas acima dos 30°C. Frequentes períodos de estiagens no Brasil, tendo uma maior ocorrência no verão, provocam demasiados prejuízos para a agricultura, afetando culturas que são cultivadas nesse período (TAVARES *et al.*,

2013). Segundo dados do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), foi registrado temperaturas acima de 36°C no mês de novembro, deste ano, na cidade de Cuiabá, capital do Mato Grosso. Na cidade de Presidente Prudente, ainda no mês de novembro deste ano, foi registrado variações de altas temperaturas de 30 a 35°C.

A alta temperatura é uns dos principais fatores que influência no rendimento das culturas. Devido as mudanças climáticas, as irregularidades de chuva e o aumento de temperatura é cada vez mais recorrentes. Dias quentes ou ondas de calor tornam eventos cada vez mais frequentes. Estudos apontam uma previsão de aumento de temperatura de 0,2°C por década (HASANUZZAMAN *et al.*, 2013), no qual, é estimado um aumento de 1,8 a 4,0°C até o ano de 2100. Com o aumento gradual das temperaturas mundiais, estudos indicam um decréscimo na produção em diversas culturas, oriundo das mudanças climáticas (LOBELL; FIELD, 2007; HASANUZZAMAN *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2017). A queda no rendimento das culturas pode variar até 17%, para cada grau centígrado elevado na temperatura média (LOBELL *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2017).

A temperatura no ambiente térmico ideal para crescimento e metabolismo para o cultivo do algodoeiro é de 28°C, variando entre 25 e 31°C, diurna e noturna, respectivamente, (BURKE *et al.*, 1988; BURKE, 1990; HATFIELD; BURKE, 1991; MAHAN *et al.*, 2000; BURKE *et al.*, 2004; ZHAO *et al.*, 2005; CONATY *et al.*, 2012; ECHER, 2014). Existe uma relação linear positiva entre a produção de biomassa e o tempo que a temperatura das folhas permaneceu dentro desse valor considerado ideal (BURKE *et al.*, 1988). Por outro lado, quando submetidos as altas temperaturas, o algodoeiro demonstra sensibilidades, podendo ocorrer redução no crescimento vegetativo e reprodutivo da cultura, redução da viabilidade dos pólenes e ainda uma elevação na taxa de abscisão dos frutos do algodoeiro (REDDY *et al.*, 1991; SINGH *et al.*, 2007; LOKA; OOSTERHUIS, 2010).

Durante o estágio vegetativo, regimes com altas temperaturas podem destruir componentes fotossintéticos das folhas, como componentes do fotossistema II (PSII), nas membranas dos tilacóides, reduzindo assim as taxas de assimilação de CO₂ e causando danos à membrana (HALL, 2004). Segundo Bibi *et al.* (2008) quando plantas de algodão foram submetidas a regime de alta temperatura, observou uma diminuição no rendimento quântico do PSII, com temperatura acima de 36°C. Ainda, conclui que houve um aumento do extravasamento de membranas e uma queda na florescência da clorofila, em resposta a alta temperatura. Em estudo,

Wise *et al.* (2004), relatam que quando o algodoeiro foi submetido a temperatura acima de 33°C, a fotossíntese da planta foi inibida, e mesmo após a diminuição da temperatura para 30°C, a inibição do aparato fotossintético era efetiva (WISE *et al.*, 2004).

A respiração é um processo metabólico importante que está intimamente relacionado ao desenvolvimento das culturas, por meio do uso de carboidratos e da produção de adenosina 5-trifosfato (ATP). Neste contexto, Loka e Oosterhuis (2010), demonstram que os níveis de ATP foliares em plantas de algodão expostas à alta temperatura noturna, apresentaram declínio em relação as plantas controle. Isto pode estar relacionado a um aumento da respiração, causada pelo estresse térmico. Ainda, relatam que o aumento de 2 horas na temperatura noturna, de 27°C e 30°C, aumentou a taxa respiratória das plantas de algodão em 49% e 56%, tendo um efeito na redução de ATP nas plantas. Este fato foi atribuído às altas taxas de respiração, causadas pelas altas temperaturas noturnas, que resultaram em uma drenagem no pool de ATP das folhas (LOKA; OOSTERHUIS, 2010).

Os danos por estresse térmico no algodoeiro variam desde a germinação até seu percentual produtivo. Plantas de algodoeiro submetidas a altas temperaturas, tiveram danos no seu sistema reprodutivo, no qual, houve uma queda significativa no número de botões florais e, posterior diminuição da retenção dos capulhos (ZHAO *et al.*, 2005). Ainda, Crafts-Brandner e Salvucci (2000) e Hejník *et al.* (2015) relataram que a folha de algodão diminuiu sua taxa fotossintética (PN) quando a temperatura excedeu 35-40 °C. Ainda, Hejník *et al.* (2015) relatam uma queda do crescimento de acordo com o acúmulo de matéria seca do algodoeiro, tendo um decréscimo de 64%, comparada ao tratamento controle.

Quando submetido a alta temperatura na fase reprodutiva, a planta do algodoeiro pode ter reflexos na sua produtividade final. Em seu estudo Conaty *et al.* (2015) concluíram uma redução na produção de algodão quando a temperatura média da copa, durante o período de floração, excedeu os 28°C. Ainda, observou redução no comprimento da fibra e micronaire, quando as temperaturas do dossel excederam 31°C e 32°C. Devido ao estresse térmico, Zhao *et al.* (2005) aferiu uma relação entre a taxa de abscisão dos botões florais com a queda do teor de carboidratos nos botões, ocasionados pelo aumento de temperatura. Ainda, Reddy *et al.* (1992) observou uma queda na retenção de frutos de plantas de algodão quando submetidas a altas temperaturas.

O bom desenvolvimento das estruturas reprodutivas, levará a uma consequente formação das sementes e, posterior desenvolvimento das fibras, sendo estes os principais componentes de produção da cultura (ECHER, 2014). Desta forma, é de grande relevância a tentativa de minimizar e estudar os efeitos danosos das altas temperaturas no cultivo do algodoeiro.

2.2 Resposta metabólica por alta temperatura

Os estresses abióticos, como alta temperatura além de afetar crescimento e desenvolvimento das plantas, desencadeia diversas alterações bioquímica e moleculares (BHATNAGAR-MATHUR *et al.*, 2008; HASANUZZAMAN *et al.*, 2012). Uma das principais consequências desse tipo de perturbação é a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (HASANUZZAMAN *et al.*, 2012).

As EROs são radicais livres, como as hidroxilas (OH⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o superóxido (O₂⁻), que são formados e acumulados em resposta ao estresse (MILLER *et al.*, 2008). As espécies reativas de oxigênio desempenham, em baixas concentrações, a função de sinalização, para a ativação de defesa ao estresse. Porém, quando presentes em altas concentrações, as EROs causam diversos danos aos componentes celulares (HASANUZZAMAN *et al.*, 2012). A formação e acúmulo de EROs causam perturbações nas plantas, alterando a homeostase redox (SRIVASTAVA *et al.*, 2016). Essas alterações são consequência de danos oxidativos a biomoléculas como ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos e DNA (SRIVASTAVA *et al.*, 2016; MILLER *et al.*, 2008).

Ainda, segundo estudos, as espécies reativas de oxigênio podem afetar diretamente pigmentos fotossintéticos, ocasionando inibição fotossintética (KRASENSKY *et al.*, 2012). Ocasionalmente ainda disfunção metabólica, danos na estrutura de membranas e proteínas, e ainda, dano na estrutura celular, fertilidade reduzida e senescência prematura (BOR *et al.*, 2003; REDDY *et al.*, 2004; KRASENSKY *et al.*, 2012; HASSANPOUR *et al.*, 2012; SRIVASTAVA *et al.*, 2016).

Em contrapartida, em respostas ao estresse oxidativo, as plantas modificam seu metabolismo, produzindo metabólitos para que haja o restabelecimento do equilíbrio redox celular e a homeostase (HASANUZZAMAN *et al.*, 2013; VALLIYODAN *et al.*, 2006; JANSKA *et al.*, 2010). Tais modificações são relatadas por Chinnusamy *et al.* (2007) e Shinozaki *et al.* (2007), que afirmam que as plantas

alteram a expressão de genes envolvidos na proteção direta ao estresse, produzindo então, osmoprotetores, enzimas antioxidantes e biorreguladores (KRASENSKY *et al.*, 2012).

No mecanismo de defesa das plantas, contra os estresses oxidativos, podem ser dividido em dois grandes grupos, antioxidantes enzimáticos e os não enzimáticos (HASANUZZAMAN *et al.*, 2012). Ainda, Hasanuzzaman *et al.* (2012) afirma que sob condições estáveis, o sistema antioxidante fornece a proteção necessária contra as EROs. Entretanto, em situações estressantes, na qual os níveis de EROs são elevados, o equilíbrio do sistema de defesa, entre a produção e eliminação das espécies reativas de oxigênio podem ser alterados, levando a uma baixa resposta do sistema antioxidante nas plantas (ASADA, 1992; GILL; TUTEJA, 2010).

Localizadas em diferentes compartimentos celulares, as enzimas antioxidantes trabalham em conjunto para desintoxicar as EROs. As principais enzimas antioxidantes são as enzimas do ciclo da superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPX), glutathione-S-transferase (GST) e catalase (CAT) (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014; HASANUZZAMAN *et al.*, 2012). A SOD é colocada como a principal enzima que defende a primeira linha contra EROs, ela catalisa o processo de dismutação de O_2 para H_2O_2 (HASANUZZAMAN *et al.*, 2012). A CAT e a APX, em seguida, retiram H_2O_2 convertendo-o em O_2 e H_2O (MILLER *et al.*, 2008). Ainda, em resposta as EROs, o sistema de defesa não enzimáticos, contem compostos como o ácido ascórbico (AA), glutathione reduzida (GSH), α -tocoferol, carotenóides, fenólicos, flavonóides e prolina (GILL; TUTEJA, 2010; MILLER *et al.*, 2010; GILL *et al.*, 2011).

Outra linha de defesa ao estresse por alta temperatura é a ativação das proteínas de choque térmico, conhecidas como HSP (heat shock proteins). As HSP funcionam como chaperonas moleculares, onde são distribuídas em cinco principais famílias, sendo as HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 e HSP20, divididas pelo seu peso molecular (DE, 1999; SABLE *et al.*, 2018). Em destaque as HSP70 interagem diretamente com fatores de choque, onde são induzidas por altas temperaturas e são importantes para a resposta ao calor (HAHN *et al.*, 2011). As HSP70 também desempenham o papel de proteção das membranas, síntese, reparo, dobramento e translocação de outras proteínas, desta forma realizando papel importante na homeostase celular, quando submetida a altas temperaturas (HAHN *et al.*, 2017;

RODZIEWICZ *et al.*, 2014; OHAMA *et al.*, 2017). Clément *et al.* (2011) relata, que o grupo de proteínas HSP70 e HSP90 desempenham papel sobre o fechamento estomático e na modulação de ácido abscísico em *Arabidopsis*.

Ainda na linha de defesa aos efeitos danosos das EROs, as plantas sintetizam substâncias que auxiliam em sua defesa e recuperação. Os biorreguladores, são encontrados naturalmente nas plantas, e também, podem ser aplicados nas mesmas para mitigação dos efeitos nocivos dos estresses (PASALA *et al.*, 2016; SRIVASTAVA *et al.*, 2016).

2.3 Biorreguladores e seus efeitos em plantas

Os biorreguladores auxiliam no desempenho em diversos aspectos das plantas, eles tornam as plantas mais tolerantes aos fatores de estresse e, conseqüentemente, podem se desenvolver vigorosamente em condições não ideais. Sua ação é relatada na sinalização para aumentar a eficiência do sistema antioxidante, na expressão de genes que são produzidos no momento de estresse, e na regulação de osmólitos (SRIVASTAVA *et al.*, 2016).

Atuantes na estruturação do crescimento das plantas, os biorreguladores mantêm o vigor vegetativo, atua sobre a floração, dentre outros aspectos (TAN *et al.*, 2012; SZAFRANSKA *et al.*, 2012, 2013). Quando aplicados nos níveis adequados, os biorreguladores além de mitigar os efeitos danosos do estresse, podem potencializar o desempenho produtivo das plantas (VLOT *et al.*, 2009; RIVAS-SAN VICENTE *et al.*, 2011). Em seu estudo, Milic *et al.* (2018), relata melhoras no tamanho dos frutos, rendimento e desenvolvimento de plantas de mirtilo, submetidas a aplicação de biorreguladores. Resultados semelhantes foram encontrados por Rehman *et al.* (2018), no qual obteve uma maior qualidade de maçãs, em seu peso, tamanho e rendimento, com aplicação de diferentes biorreguladores.

Diante da vasta gama de biorreguladores, a melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) se destaca em diversos estudos. A melatonina (mel) é produzida pelas plantas e também pode ser aplicada nas mesmas para um maior desempenho (TAN *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2015; KANG *et al.*, 2010; KANG *et al.*, 2011). Estudos revelam que plantas com níveis adequados de melatonina tem um melhor desempenho perante a situações adversas de estresses bióticos e abióticos (ZHANG *et al.*, 2014). Ainda, quando submetida a deficiência endógena da

melatonina, as plantas apresentam diversos estresses oxidativos, como aumento de compostos oxidantes e diminuição da ação de enzimas antioxidantes (AHAMMED, *et al.*, 2019).

2.4 Melatonina e sua ação sob estresses em planta

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), chamada também como mel, é uma molécula do grupo da indolamina sintetizada em todo o reino vegetal (ERLAND *et al.*, 2019). Segundo Murch *et al.* (2001) o L-triptofano (Trp) é precursor de vários compostos em plantas, dentre eles a serotonina, os ácidos indol-3-acético (AIA) e a melatonina. A mel é uma molécula de pequeno porte, solúvel em água e lipídeos, agindo como antioxidantes hidrofílico e hidrofóbico (JANA *et al.*, 2013). Deste modo, a melatonina tem uma maior facilidade de percorrer dentre os compartimentos intracelulares, e agir sobre espécies reativas de oxigênio (EROs).

A mel é uma molécula biorreguladora natural que ocorre em quase todas as espécies vegetais (ERLAND *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2017; ARNAO; HERNANDEZ-RUIZ, 2019). A biossíntese da melatonina ocorre quando o Trp é descarboxilado para triptamina (Trm) seguida por hidroxilação da serotonina (5HT) em reações catalisadas por Trp descarboxilase (TDC). A 5HT é convertida em mel via N-acetilserotonina (NAS) através de uma acetilação por N-acetiltransferase de serotonina (SNAT) seguido por uma reação catalisada por N-acetilserotonina-O-metiltransferase (ASMT) (ERLAND *et al.*, 2019; ERLAND *et al.*, 2015; MURCH *et al.*, 2001), demonstrado na Figura 1. Evidências apontam que a biossíntese da melatonina ocorra nas organelas da mitocôndria e cloroplasto, dando a eles a capacidade de sintetizar e metabolizar a melatonina em plantas. (ERLAND *et al.*, 2019; TAN *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2017). Tan *et al.* (2013), afirma que altos níveis de melatonina produzida pelas mitocôndrias e cloroplastos são usados para proteger estas organelas celulares contra o estresse oxidativo por sua direta interação com radicais livres, preservando as funções fisiológicas das plantas.

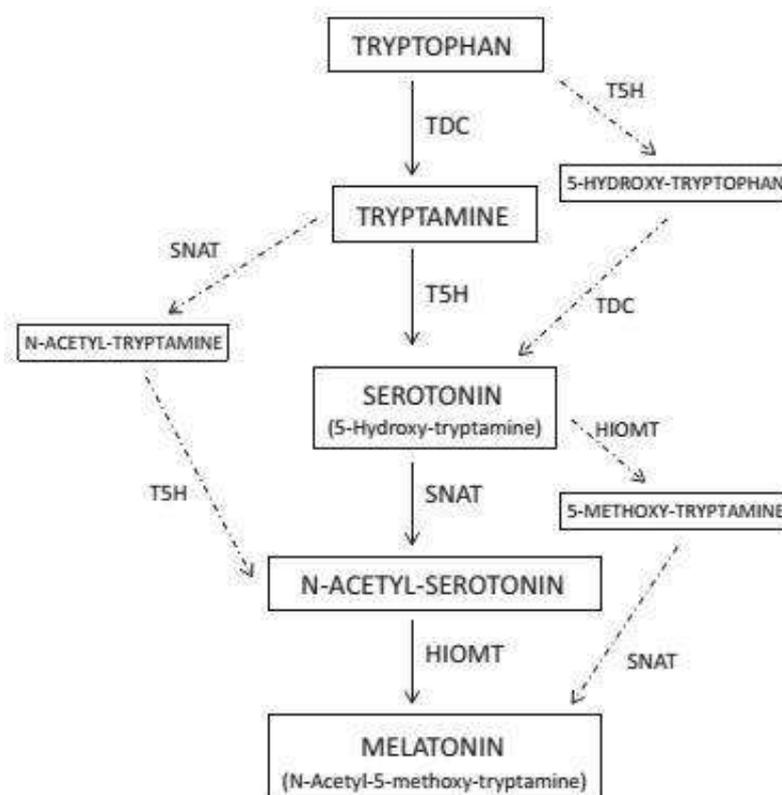


Figura 1 - Biossíntese da melatonina a partir do triptofano em plantas. A reação enzimática ocorre da seguinte forma: T5H, triptofano 5-hidroxilase; CDT, triptofano descarboxilase; SNAT, N-acetiltransferase de serotonina; e HIOMT, hidroxindole-O-metiltransferase. Linhas pontilhadas representam reações alternativas descritas em casos particulares (ARNAO; HERNÁNDEZ-RUIZ, 2015).

Vários estudos corroboram que a melatonina age como uma promotora de crescimento e de enraizamento primário e secundário, fator essencial para prevenção de possíveis estresses (CHEN *et al.*, 2009; HERNÁNDEZ-RUIZ *et al.*, 2004; SARROU *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2014; ERLAND *et al.*, 2019, CHEN *et al.*, 2020). Ainda, a mel atua na regulação da germinação de sementes, otimizando o percentual de germinação, promovendo um maior desenvolvimento radicular e peso fresco final (HERNADEZ-RUIZ *et al.*, 2010; WEI *et al.*, 2014; XIAO *et al.*, 2019). Em seu trabalho Xiao *et al.* (2019), relata melhoras na germinação de sementes de algodão, submetidas a diferentes doses de melatonina. Além de impulsionar o desempenho e desenvolvimento germinativo de sementes de algodão, Chen *et al.* (2020), relata que o biorregulador atenuou os efeitos adversos do estresse salino em sementes de algodão. O pré tratamento com diferentes concentrações de mel reduziu o conteúdo de H₂O₂ e MDA, e ainda aumentou os níveis de açúcar solúvel, proteínas solúveis e prolina (CHEN *et al.*, 2020).

Estudos mostram que a melatonina desempenha um papel importante na defesa contra alguns estresses. O tratamento exógeno desta molécula atua contra estresses, incluindo déficit hídrico, salinidade, estresses químicos, e estresse por altas temperaturas, que levam à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (WANG *et al.*, 2017; AHAMMED, *et al.*, 2019; XIAO *et al.*, 2019, CHEN *et al.*, 2020). A melatonina também está envolvida em transições de desenvolvimento afetadas pelo estresse, incluindo floração, frutificação e senescência (ANTONIOU *et al.*, 2017; MENG *et al.*, 2014; WEI *et al.*, 2014; ZHANG, *et al.*, 2015).

Um processo que já está lúcido é a interação da mel com as EROs. Evidências comprovam que plantas contêm isômero desta indolamina, que também podem ser interceptoras de EROs (VITALINI *et al.*, 2013). Em seu trabalho Tan *et al.* (2010), afirma que a mel tem ação crucial na redução do dano oxidativo de moléculas. Ainda sua atividade antioxidante atua na captura direta de radicais livres, eleva atividade de enzimas antioxidantes, protege essas mesmas enzimas de danos oxidativo e aumenta a eficiência da cadeia de transporte mitocondrial (TAN *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2017; AHAMMED, *et al.*, 2019).

A melatonina ainda atua em uma melhor eficiência quântica do fotossistema (PSII), que é a razão de fluorescência variável (Fv) sobre o valor máximo de fluorescência (Fm) para folhas adaptadas à escuridão. Em estudo, Wang *et al.* (2013), afirma que a melatonina aferiu uma máxima eficiência potencial do fotossistema II (F_v / F_m), ainda a mel atrasou a redução no teor de clorofila. Sugerindo que a melatonina pode atrasar a senescência das folhas, relacionando ao seu efeito antioxidante. Resultados semelhantes foram relatados em cevada (ARNAO; HERNÁNDEZ-RUIZ, 2009) e maçã (WANG *et al.*, 2012).

Outra prioridade a ser relatada é sua capacidade de proteção contínua, em cascata sequestradora de radicais livres com seus metabólitos primários, secundários, terciários e quaternários (ERLAND *et al.* 2009; GALANO *et al.*, 2013; ERLAND *et al.*, 2019). Assim a mel tem uma capacidade de eficiência na ação antioxidante, mesmo em pequenas quantidades, em relação a outros antioxidantes convencionais (ARNAO *et al.*, 2019). Além disso, a mel apresenta um efeito de relação sinérgica com outros compostos antioxidantes, como a glutathione, ácido ascórbico, e regulação de atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD) catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-

PX), glutationa redutase (GSSG-R) (GITTO *et al.*, 2001; RODRIQUEZ *et al.*, 2004; FISCHER *et al.*, 2013; XIAO *et al.*, 2019; ARNAO *et al.*, 2019).

O ácido abscísico (ABA) é um hormônio vegetal de grande importância existente nas plantas, este que regula a dormência, induzindo ou a mantendo ativa, inibe germinação de sementes e regula o crescimento e desenvolvimento de planta (FINKELSTEIN *et al.*, 2002). Já as giberelinas (AGs) atuam diretamente na quebra de dormência de sementes e, conseqüentemente, promovem a germinação (HAUVERMALE *et al.*, 2015). O equilíbrio dinâmico de síntese e catabolismo de ABA e GA é a chave para obtenção da germinação de sementes. Quando sementes são submetidas a perturbações, o conteúdo de abscísico (ABA) aumenta em resposta ao estresse. Já a giberelina (GA3) regula o crescimento e desenvolvimento das sementes. Em estudo recente, Xiao *et al.* (2019) relata uma relação entre a ação significativa da melatonina com a diminuição do conteúdo de ácido abscísico (ABA) e um aumento de giberelina (GA3), com doses de 20 µM de melatonina, em sementes de algodão.

Além de atuar no sistema de defesa antioxidante, a melatonina age em expressão genética perante estresses (WEI *et al.*, 2014; ARNAO *et al.*, 2019; ERLAND *et al.*, 2019; AHAMMED *et al.*, 2019). Wei *et al.* (2014) documenta que a melatonina promoveu na soja um aumento dos genes envolvidos na divisão celular, fotossíntese, metabolismo de carboidratos, biossíntese de ácidos graxos e metabolismo de ascorbato. Essa capacidade de ação genômica, na qual, regula a expressão de vários genes de defesa antioxidante, no aparato fotossintético, em processo de atraso de senescência foliar, em indução de genes de divisão celular, dentre outros aspectos, são observados em vários estudos (GRAHAM, 2005; WANG *et al.*, 2012; SZAFRAŃSKA *et al.*, 2013). Esses efeitos podem ser alcançados através de ativação da replicação de DNA e divisão celular relacionada a alguns genes (WEI *et al.*, 2015).

O estudo da ação da melatonina sob plantas submetidas a estresse por alta temperatura também tem ganhado amplitude (TIRYAKI *et al.*, 2012; BYEON *et al.*, 2014; HERNÁNDEZ *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2016; AHAMMED *et al.*, 2019). Em seu trabalho Ahammed *et al.* (2019) evidência que, quando a melatonina é silenciada, sua deficiência agrava o estresse oxidativo, aferido por alta temperatura em plantas de tomate. Ainda, relata um aumento das atividades das enzimas SOD e APX, em 90% e 20%, respectivamente, quando aplicou melatonina combinado a alta

temperatura, comparado as plantas controles (AHAMMED *et al.*, 2019). Ainda, Byeon *et al.* (2014) demonstraram que os níveis de melatonina endógeno aumentaram conforme mudas de arroz eram expostas a diferentes temperaturas por 1 hora. Ainda, relata que os níveis mais altos de mel foram em plantas submetidas a alta temperatura (BYEON *et al.*, 2014).

Sementes de *Phacelia tanacetifolia*, com diferentes doses de melatonina, foram submetidas a diferentes temperaturas, na presença e ausência de luz (TIRYAKI *et al.*, 2012). O maior percentual de germinação foi obtido por doses mais baixas de melatonina, no escuro. Ainda, a mel aplicada nas sementes, reverteu significativamente os efeitos inibitórios da luz e da alta temperatura, comparadas ao controle (TIRYAKI *et al.*, 2012). Segundo Xu *et al* (2016) a mel pode estar envolvida na termotolerância de plantas e revela o envolvimento da proteção de proteínas celulares na termotolerância induzida por melatonina. Ainda, afirma que a aplicação exógena de melatonina na concentração de 10 $\mu\text{mol} / \text{L}$ de melatonina reduziu o nível de vazamento relativo de eletrólitos através das membranas celulares (XU *et al.*, 2016).

Hernández *et al.* (2015), relata que sementes submetidas a aplicação exógena de melatonina aumentou a germinação em até 60% quando comparado ao tratamento controle. Ainda relata, que por meio de teste de tetrazolio, aferiu uma maior viabilidade nas sementes submetidas a melatonina, diferente das sementes sem o tratamento, que perderam sua viabilidade quando submetidas a alta temperatura (HERNÁNDEZ *et al.*, 2015). Estes resultados demonstram que a mel age mantendo uma alta viabilidade e germinação de sementes, submetidas a altas temperaturas. Esta interação demonstra a sua capacidade antioxidante. Resultados semelhantes foram relatados por Tiryaki *et al.* (2012), no qual, em seu estudo, a germinação em *Phacelia tanacetifolia* foi elevada de 2,5% para 52%, com a aplicação de melatonina, comparada as sementes não tratadas.

A melatonina demonstra ser eficiente na sua ação promotora de mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares, diante de situações perturbadoras abióticas. Fortalecendo assim, respostas de mecanismos fisiológicos e bioquímicos (sistema antioxidante) conferindo tolerância as plantas quando submetidas a estresses abióticos como altas temperaturas (TIRYAKI *et al.*, 2012; AHAMMED *et al.*, 2019).

3 AÇÃO DA MELATONINA NO DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES DE ALGODÃO SOB ALTA TEMPERATURA

3.1 Objetivo

3.1.1 Objetivo geral

Avaliar os potenciais efeitos da aplicação exógena de melatonina no processo germinativo de sementes de algodoeiro sob regime de alta temperatura.

3.1.2 Objetivo específico

Em condições normais, identificar a melhor dose e se há efeito estimulante na germinação das sementes;

Em condição de estresse, identificar a melhor dose e verificar o efeito mitigador de estresse nos parâmetros.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Condução do experimento

O experimento foi desenvolvido nas dependências do Centro de Estudos em Ecofisiologia Vegetal do Oeste Paulista - CEVOP da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE, em Presidente Prudente – SP, Brasil, de fevereiro à junho de 2020. O experimento foi realizado com plantas de algodão (*Gossypium hirsutum*), cultivar TMG 44B2RF (Tropical Melhoramento e Genética, Cambé, PR – Brasil). O experimento foi composto por fatorial duplo (3 doses de melatonina x 2 temperatura alta e ideal), com seis tratamentos e quatro repetições, que foram representados pelas doses contendo mel nas seguintes concentrações: 0,0; 50 e 100 μM . A parcela experimental foi constituída de cinquenta sementes por repetição.

O experimento foi realizado em germinadora do tipo Mangelsdorf (ELETROLAB, São Paulo, BR) com fotoperíodo de 12 h. Sementes de algodão foram lavadas com água destilada e tratadas com o fungicida sistêmico Vitavax (0,5 mL para 200 g de sementes). Foram utilizadas cinquenta sementes por tratamento,

dispostas em placas de Petri (15 × 15 cm) contendo papel de filtro duplo (Sementes Brasil, 2009), úmido com 52 ml das diferentes soluções de mel e incubadas a 30/20°C (diurna/noturna) e em alta temperatura com 38/28°C.

3.2.2 Teste de germinação

O teste de germinação foi realizado segundo as Regras para Análise de Sementes Brasil (2009). Foi realizada a leitura da germinação no quarto e décimo segundo dia segundo as Regras de Análise para Sementes (2009). No quarto dia de embebição das sementes, as plântulas foram classificadas em plântulas normais fortes (NPFT, morfologicamente perfeito), normais fracas (NPFR), anormais (PA, com pequenos defeitos) e mortas (BRASIL, 2009). A germinação foi considerada como a soma das porcentagens de plântulas normais fortes e fracas (% G). O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado segundo Maguire (1962). Para classificação de vigor foi considerada apenas a porcentagem de plântulas normais fortes (NAKAGAWA, 1999). Após o 12º dia foram avaliados os comprimentos das raízes através de Winrhizo (CR), parte aérea (CPA) e total (CT = CR + CPA), as massas secas da parte aérea (MSPA), raiz (MSR), massa seca total (MST = MSPA + MSR) e área de raiz (cm²). A avaliação de massa seca foi realizada por meio de secagem em estufa sob temperatura de 100°C por 48h (NAKAGAWA, 1999).

3.2.3 Análise estatística

Os resultados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA, $p < 0,05$). A média dos valores foi comparada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) com o programa SISVAR (5.1, Universidade Federal de Lavras).

3.3 Resultado

De acordo com o percentual de germinação, nenhuma dose de melatonina (50 e 100 μM) apresentou diferença comparado ao tratamento controle, de plantas sem estresse térmico (Figura 2). Todas as doses de melatonina proporcionaram um aumento no percentual de germinação, comparado ao tratamento controle, quando submetidas ao aumento de temperatura (Figura 2).

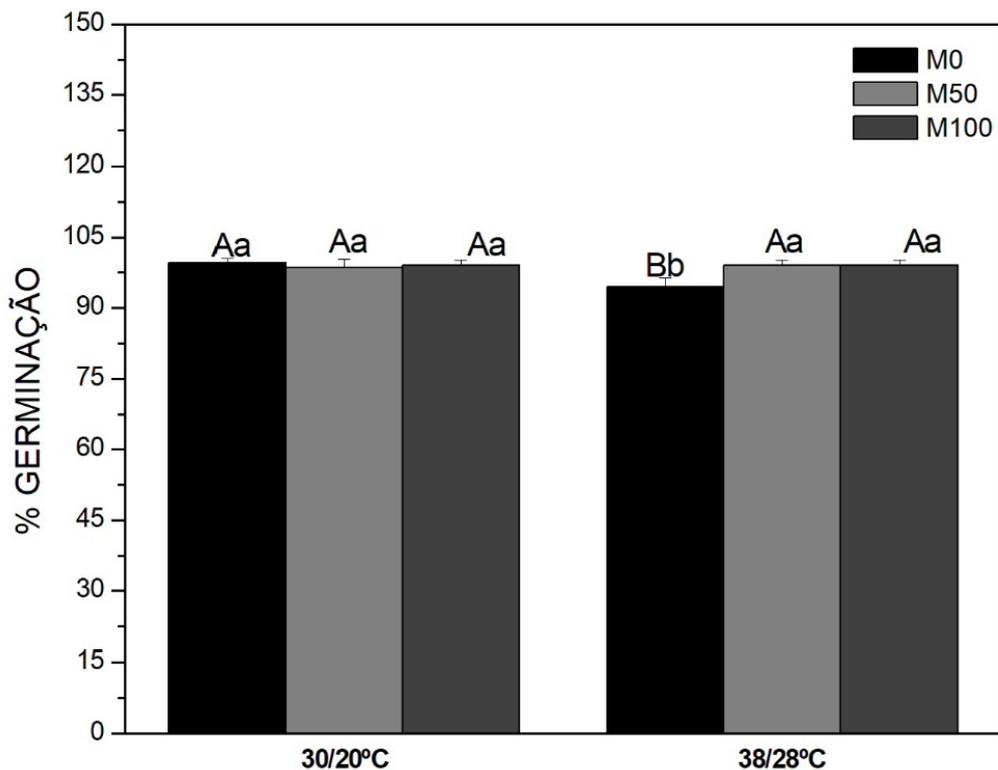


Figura 2 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μMol) na % de germinação (B), em sementes de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal. Letras maiúsculas comparam as doses e minúsculas o tratamento térmico.

O índice de velocidade de germinação (IVG) aumentou em plântulas sem estresse térmico com aplicação de 50 μMol mel, em relação ao tratamento controle (Figura 3). Na mesma condição térmica, a dose de 100 μMol , reduziu o IVG. Em plantas submetidas ao estresse térmico, o tratamento com 50 μMol obteve o melhor desempenho, comparado ao tratamento controle (Figura 3).

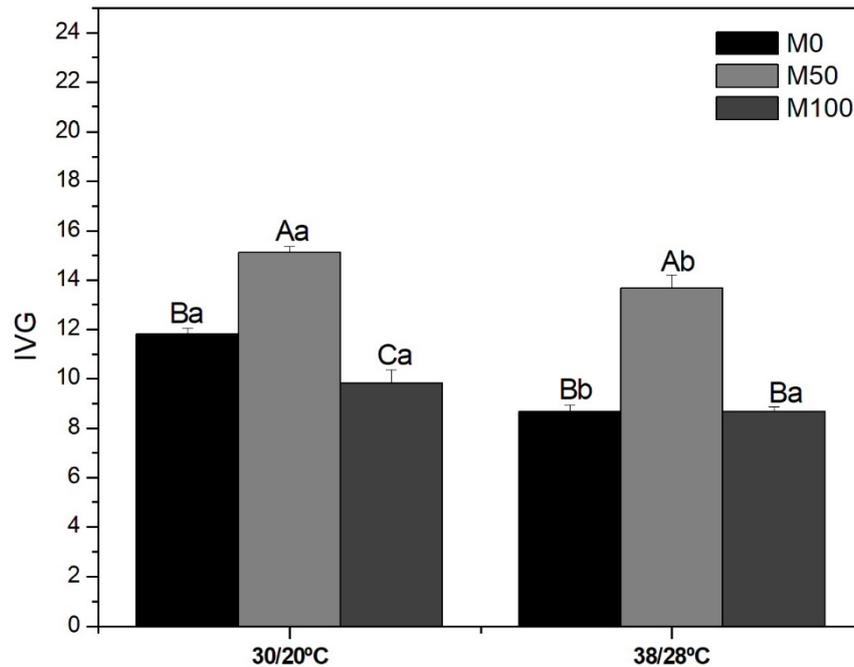


Figura 3 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μMol) no índice de velocidade de germinação (IVG) e na % de germinação (B), em sementes de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal. Letras maiúsculas comparam as doses e minúsculas o tratamento térmico.

Em comparação com o tratamento com 0 μMol de melatonina, o comprimento de parte aérea não teve diferença significativa em nenhuma das doses de melatonina, em plantas sem estresse térmico (Figura 4). Plantas submetidas ao tratamento de 50 μMol em condição de temperatura normal, apresentaram um melhor desempenho, comparado as demais doses (Figura 4).

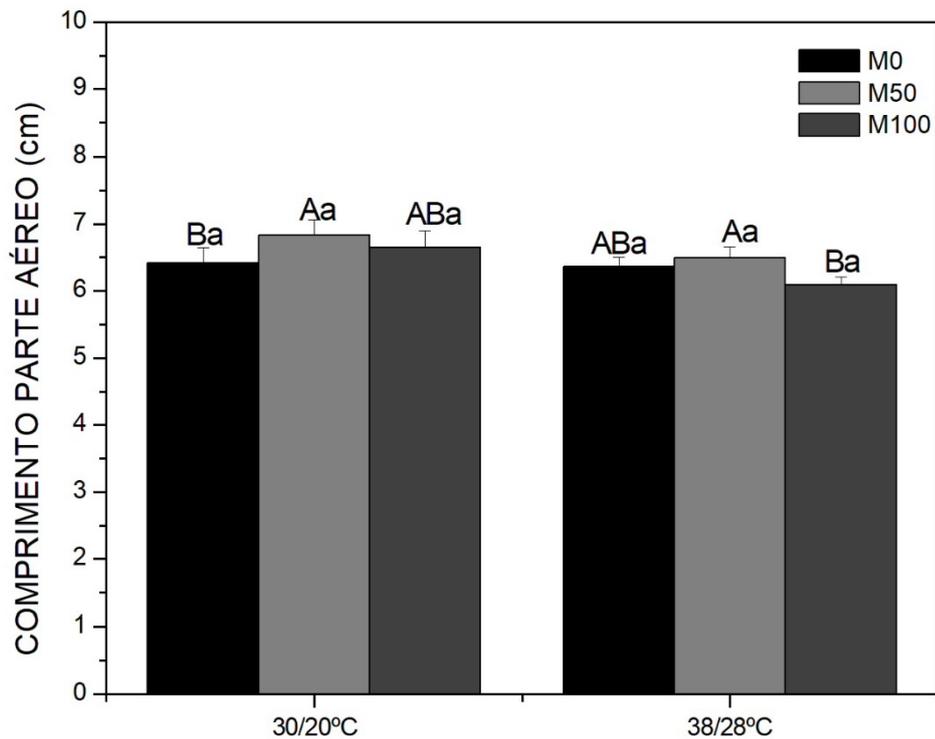


Figura 4 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μMol) no comprimento de parte aérea, em sementes de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal. Letras maiúsculas comparam as doses e minúsculas o tratamento térmico.

A aplicação de 100 μMol de mel proporcionou uma queda no comprimento de raiz, em plântulas sem o estresse térmico, comparado ao tratamento controle (Figura 5). A dose 50 μMol ocasionou um aumento no comprimento de raiz, em plantas submetidas ao estresse térmico (Figura 5).

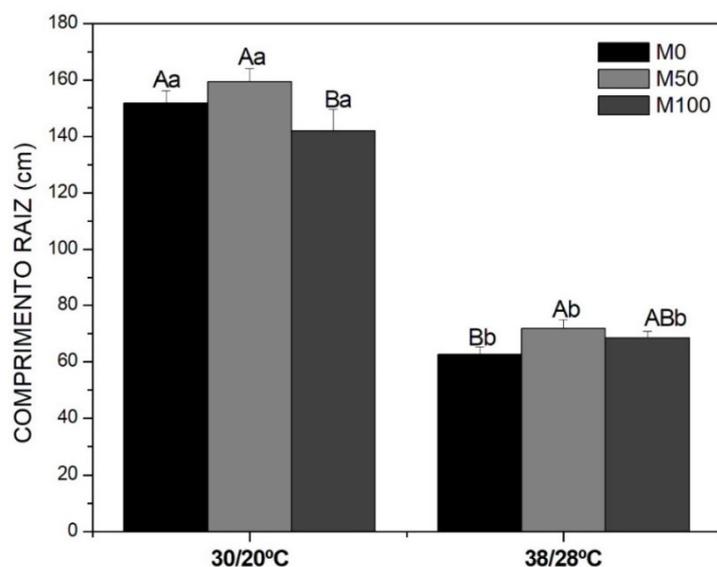


Figura 5 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μMol) no comprimento de raiz, em sementes de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal. Letras maiúsculas comparam as doses e minúsculas o tratamento térmico.

Conseqüentemente, a dose de 100 μMol ocasionou uma diminuição do comprimento total de plântulas, sem o estresse térmico (Figura 6). Em plântulas estressadas o tratamento com 50 μMol de mel, proporcionou um aumento no comprimento total de plântulas, comparadas ao tratamento de 0 μMol (Figura 6).

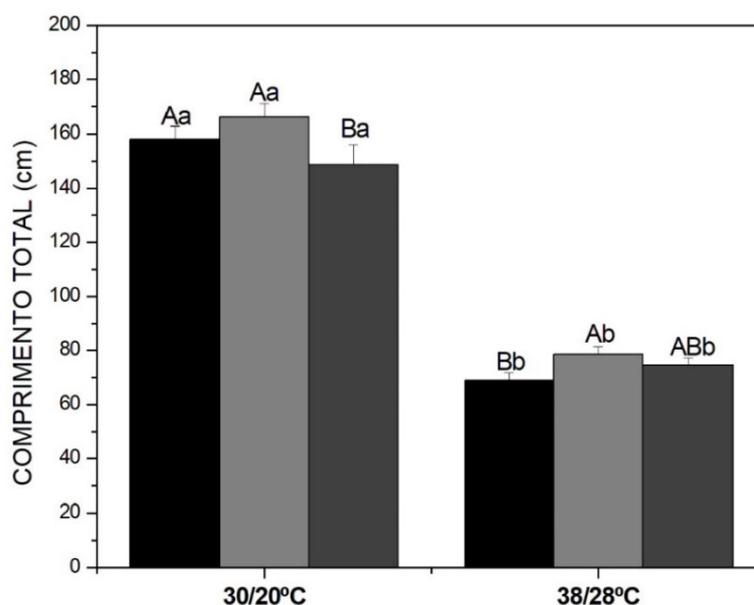


Figura 6 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μMol) no comprimento total, em sementes de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal. Letras maiúsculas comparam as doses e minúsculas o tratamento térmico.

Na massa seca de parte aérea de plântulas sem o estresse térmico, não houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 7). Em plântulas estressadas, tratadas com 100 μMol ocorreu uma queda na massa seca de parte aérea, comparada ao tratamento controle (Figura 7).

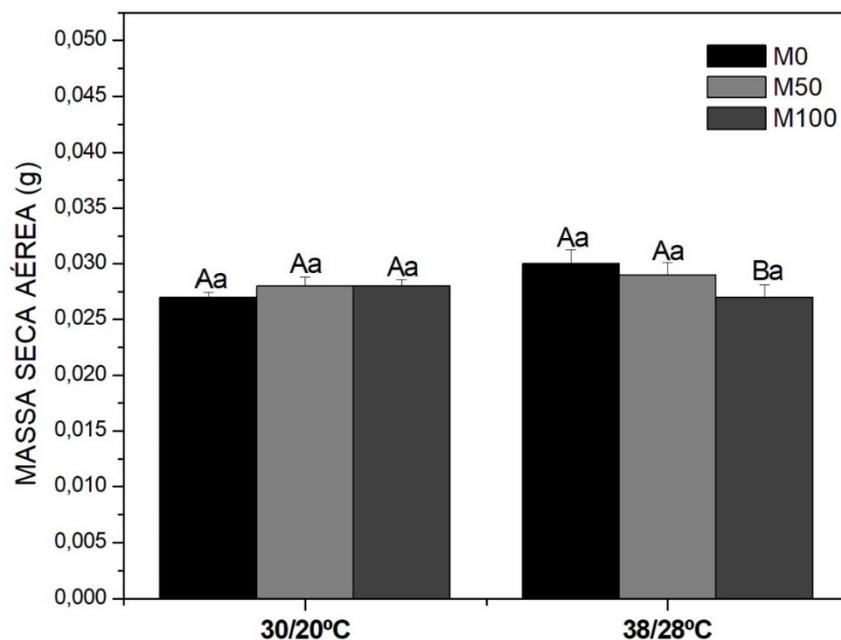


Figura 7 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μMol) na massa seca de parte aérea, em sementes de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal. Letras maiúsculas comparam as doses e minúsculas o tratamento térmico.

Na massa seca de raiz, não houve diferença significativa, em plantas sem o estresse térmico (Figura 8). A dose de 50 e 100 μMol proporcionaram uma elevação na massa seca de raiz, em plântulas submetidas ao estresse térmico (Figura 8).

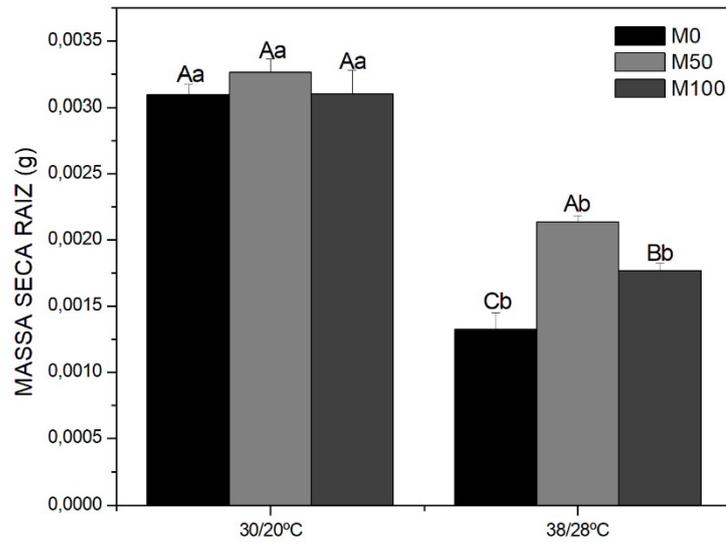


Figura 8 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μMol) na massa seca de raiz, em sementes de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal. Letras maiúsculas comparam as doses e minúsculas o tratamento térmico.

Na massa seca total, de plântulas sem o estresse térmico, não houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 9). Em plântulas estressadas, tratadas com 100 μMol ocorreu uma queda na massa seca total, comparada ao tratamento controle (Figura 9).

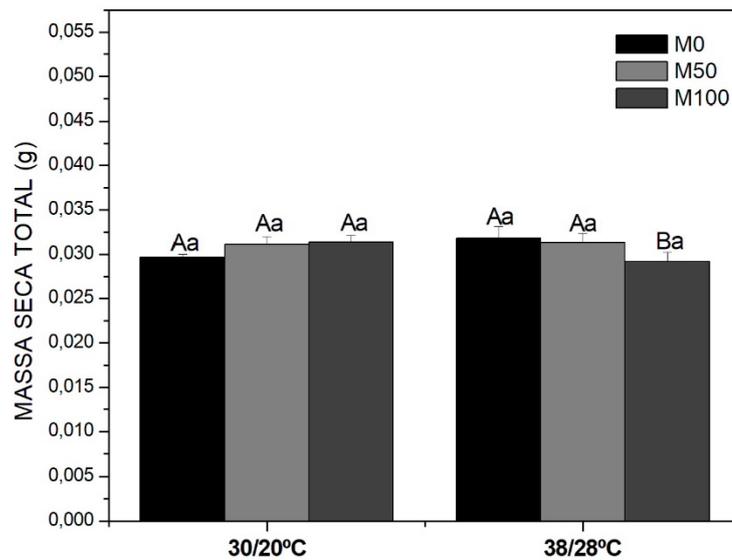


Figura 9 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μMol) na massa seca total, em sementes de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal. Letras maiúsculas comparam as doses e minúsculas o tratamento térmico.

Na área de raiz, ocorreu uma diminuição com a aplicação de 50 μMol de mel de plântulas sem o estresse térmico (Figura 10). Em plântulas submetidas ao estresse, ocorreu um aumento da área de raiz, quando tratadas com 50 e 100 μMol de mel, comparadas ao tratamento controle (Figura 10). O número de raiz foi elevado, quando tratado com 50 μMol de mel, em plântulas sem o estresse térmico (Figura 11). Não houve diferença entre os tratamentos, em plântulas com estresse térmico (Figura 11).

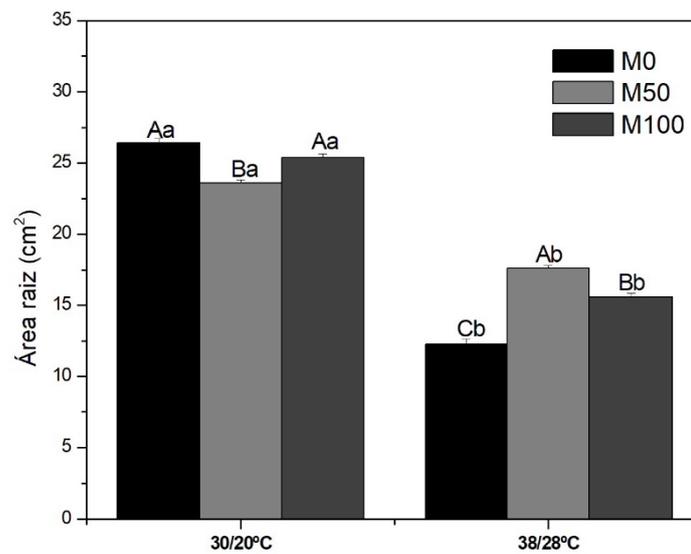


Figura 10 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μMol) na área de raiz, em sementes de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal. Letras maiúsculas comparam as doses e minúsculas o tratamento térmico.

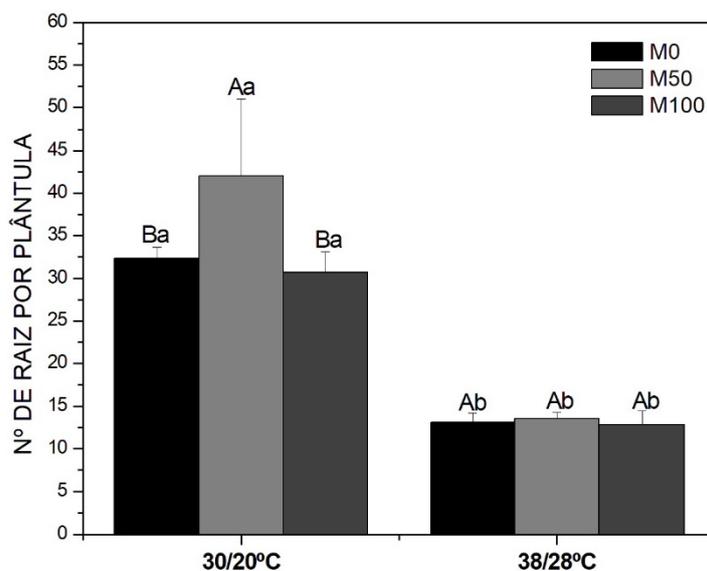


Figura 11 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μMol) no número de raiz, em sementes de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal. Letras maiúsculas comparam as doses e minúsculas o tratamento térmico.

3.4 Discussão

Cultivado em larga escala, o algodoeiro é a principal cultura para a produção de fibra. Suas sementes são usadas como fonte de alimento para animais e para a produção de óleo. Porém, o algodoeiro apresenta grande sensibilidade as temperaturas elevadas (REDDY *et al.*, 1991; SINGH *et al.*, 2007; LOKA; OOSTERHUIS, 2010). Tal fator pode afetar sua fisiologia, bioquímica e até mesmo sua morfologia. Mesmo com diferentes respostas fisiológicas e metabólicas para sobreviver ao estresse, as plantas são altamente responsivas a tratamentos exógenos de diferentes compostos, que auxiliam neste processo. A biomolécula melatonina (mel) pode aumentar a tolerância de plantas submetidas ao estresse por alta temperatura. Promotora de crescimento, a biomolécula está envolvida em diversas respostas metabólicas em plantas, em condições favoráveis ou de estresse (ERLAND *et al.*, 2019). O pré-tratamento com melatonina não só promove a germinação, mas também melhora significativamente o crescimento e desenvolvimento de raízes e o acúmulo de nutrientes (ZHANG *et al.*, 2017).

No estudo atual foi demonstrado que a mel promoveu incremento no crescimento e desenvolvimento em sementes de algodão, tanto em condições de

estresse térmico, como em condições normais. A biomolécula demonstrou uma interferência positiva na tolerância de sementes submetidas ao estresse, ocasionando um efeito mitigador, fase mais sensível perante fatores ambientais estressantes, durante o processo de crescimento e desenvolvimento das plantas (WEITBRECH *et al.*, 2011).

Os resultados demonstram que a alta temperatura acarretou em uma diminuição no percentual germinativo das sementes, queda no vigor e crescimento das plântulas (Figura 2, 3, 5 e 6). No entanto, o tratamento exógeno de mel na dose de 50 μmol , em diferentes doses, proporcionou uma redução na severidade dos danos causados pelo estresse (Figura 2, 3, 4 e 5), mitigando os efeitos do estresse auxiliando em um maior crescimento radicular e acúmulo de biomassa (LIANG *et al.*, 2018). A melatonina promoveu um aumento na taxa de germinação e no índice de velocidade de germinação, acarretando em uma melhora em seu desenvolvimento sobre estresse térmico (Figura 1 e 2). Da mesma forma, estudo demonstrou que a aplicação de mel promoveu a germinação de sementes de algodão, sob estresse salino, agindo como uma mitigadora de estresse (CHEN *et al.*, 2021). Este mecanismo pode estar relacionado a regulação pela melatonina a expressão dos genes para biossíntese do ABA e GA, na via de transdução de sinal da planta, induzindo o desenvolvimento da raiz do embrião e germinação de sementes, e reduzindo a dormência (CHEN *et al.*, 2021). Alguns estudos demonstram esse efeito nos processos germinativos, como em cerejas (SARROPOULOU *et al.*, 2012), em pepinos submetidos a condições de estresse hídrico (ZHANG *et al.*, 2013), assim como, induziu o ganho de comprimento e diâmetro de raiz, em mudas de colza sob estresse por salinidade (ZENG *et al.*, 2018).

Por meio de processos de hidrólise, gerados por enzimas α -amilase, o amido é disponibilizado e fornece energia suficiente para a germinação e desenvolvimento das sementes (YUE *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2021). O amido disponibiliza energia para a germinação das sementes e é a principal fonte de armazenamento de carboidratos para o crescimento das mesmas. A melatonina pode estar ligada a este processo, o qual por meio do seu tratamento, há o aumento da quantidade relativa de α -amilase, promovendo assim uma maior disponibilidade de amido para o meio (ZHANG *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2021). Em nossos estudos a melatonina promoveu uma maior área superficial de raiz bem como um maior comprimento. Em estudo Zhang *et al.* (2012) observou que o tratamento com mel em sementes de

pepino proporcionou um fortalecimento radicular, durante estresse hídrico, através de uma melhora no diâmetro da raiz. Segundo estudos de Chen *et al.* (2021), o pré-tratamento de melatonina, em sementes de algodão estressadas por sal, regularam positivamente a disponibilidade de amido, resultando em melhoras nos processos germinativos e no desenvolvimento das mesmas.

Outros processos fisiológicos regulam o crescimento radicular induzido por melatonina, tal como a modulação dos níveis de alguns hormônios, como a auxina, que interfere positivamente na absorção de água, na qual inicia a promoção de expansão celular (BLEISS; EHWALD, 1993). A melatonina induz o crescimento de raízes por meio da indução de auxina, o qual afeta a absorção de água e causa extensão irreversível da parede celular (BLEISS; EHWALD, 1993). Neste contexto o aumento radicular pode estar ligado a capacidade de modulação e adaptação da melatonina, para que as plantas absorvam água de forma mais eficiente, mesmo em condições estressantes (AHMAD *et al.*, 2019).

A similaridade estrutural da via biossintética comum entre IAA e melatonina levaram a sugestões de possíveis funcionais semelhanças entre essas duas moléculas (MURCH *et al.*, 2002). Desta forma, a mel tem forte capacidade de promoção do sistema radicular, o qual proporciona um aumento de raízes primárias e secundárias, bem como um aumento em seu diâmetro (WEI *et al.*, 2014; XIAO *et al.*, 2019, AHAMAD *et al.*, 2019). Este fato é confirmado em nossos resultados, o qual todas as doses de melatonina proporcionaram um aumento na massa seca de raiz, comparado a dose controle, em ambas condições térmicas (Figura 8). A dose de 50 μmol proporcionou um aumento no comprimento radicular, em plântulas estressadas, e também, no número de raiz de plântulas sem o estresse. De forma similar, Sarropoulou *et al.* (2021) e Chen *et al.* (2021), relatam que doses intermediárias de melatonina promoveram um aumento no comprimento de raiz e peso fresco de raiz, corroborando com nossos resultados.

3.5 Conclusão

A aplicação de melatonina reduziu os efeitos negativos da alta temperatura na germinação e desenvolvimento de sementes, proporcionando um maior acúmulo de biomassa de raiz. A dose de 50 μMol proporcionou uma melhor resposta fisiológicas, em condição de estresse. Esses resultados sugerem que os efeitos adversos do

estresse térmico podem ser minimizados pela aplicação da melatonina em sementes de algodão.

4 DESEMPENHO FISIOLÓGICO DA APLICAÇÃO DE MELATONINA EM PLANTAS DE ALGODÃO SUBMETIDAS A REGIME DE ALTA TEMPERATURA

4.1 Objetivo

4.1.1 Objetivo geral

Avaliar os potenciais efeitos da aplicação exógena de melatonina no processo vegetativo e reprodutivo, em plantas de algodoeiro sob regime de alta temperatura.

4.1.2 Objetivo específico

Verificar os efeitos da aplicação exógena de melatonina sobre parâmetros fisiológicos e bioquímicos do algodoeiro sob alta temperatura;

Avaliar os efeitos da melatonina na produção e biomassa.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Condução do experimento

O experimento foi desenvolvido nas dependências do Centro de Estudos em Ecofisiologia Vegetal do Oeste Paulista - CEVOP da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE, em Presidente Prudente – SP, Brasil, de junho à agosto de 2020. O experimento foi realizado com plantas de algodão (*Gossypium hirsutum*), cultivar TMG 44B2RF (Tropical Melhoramento e Genética, Cambé, PR – Brasil).

O experimento foi composto de um fatorial duplo 2 x 2 (sem e com melatonina x temperatura alta e ideal), com dez repetições cada tratamento. Foram utilizados vasos com capacidade de 3 litros, contendo 3 kg de terra vegetal. Foram semeadas 5 sementes por vaso e realizado o desbaste após sete dias, mantendo uma planta por vaso, com irrigação diária constante. O estresse térmico foi realizado com temperatura diurna de 38° C e noturna de 28° C; e as plantas controle: 30° C diurna e 20° C noturna. As doses de melatonina foram de 0 (M0) e 100 µM (M100). As plantas foram mantidas em câmara climatizada tipo Fitotron (Eletrolab, modelo EL

011) por 78 dias (fase de formação de capulho), com as condições ambientais monitoradas e controladas.

A primeira aplicação de melatonina foi realizada na fase fenológica B1 (primeiro botão floral visível (32 DAE) (sem imposição de estresse térmico). A segunda aplicação foi realizada na fase F1 (flor branca de primeira posição no primeiro ramo reprodutivo (55 DAE). A imposição do estresse térmico (38°/28° C) foi realizada após 24 horas da aplicação de melatonina em F1. A alta temperatura foi mantido por sete dias a partir do início aumento de temperatura. A temperatura normal foi retomada após o sétimo dia de estresse. Após retomada da temperatura normal, as plantas foram mantidas em condições normais por mais 15 dias.

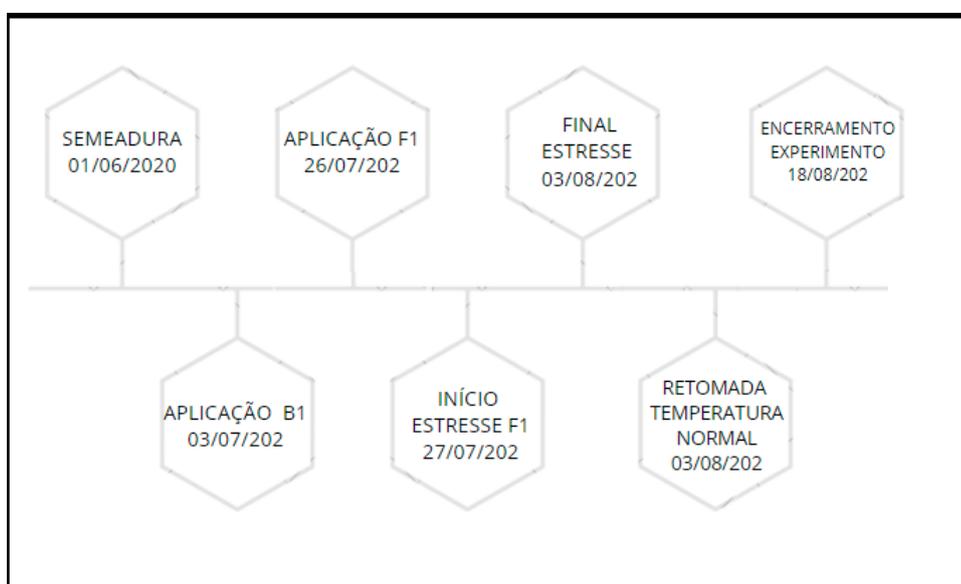


Figura 12 - Esquema cronológico de aplicação de melatonina e imposição do estresse térmico.

Foram realizadas medidas pontuais de trocas gasosas no 2º, 5º e 7º dia após submissão do estresse e 24h após a retomada da temperatura ideal. Foram realizados três momentos de coleta vegetal, 3 horas após início do estresse (coleta para expressão gênica da Hsp70), no 7º dia de estresse térmico (coleta para enzimas antioxidantes, MDA, espécies reativas de oxigênio, carboidratos, amidos e grão de pólen) e coleta após 24h após retomada da temperatura normal (quantificação carboidratos e amido). O material coletado foi armazenado no

ultrafreezer – 80°C para a realização das análises bioquímicas. Contagem dos componentes de produção (botão, flor e capulho) foi realizada durante todo o ciclo.

4.2.2 Medidas de trocas gasosas

Medidas instantâneas de trocas gasosas, foram obtidas utilizando um analisador de gases por infra-vermelho (Li-6400XTR, LiCor, EUA) com o fluorômetro de luz modulada (LI-6400-40) acoplado à câmara de amostragem do Li-6400XTR.

As medidas foram realizadas em folhas saudáveis e completamente expandidas, sob irradiância de 1500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, com uma concentração de CO_2 na câmara de amostragem de 400 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ de ar. Foram analisados os seguintes parâmetros de trocas gasosas: assimilação líquida de CO_2 (P_n), condutância estomática (G_s), concentração intercelular de CO_2 (C_i), e transpiração (E).

4.2.3 Taxa de transporte de elétrons

As medidas da fluorescência da clorofila *a* foi realizada simultaneamente às medidas de trocas gasosas, utilizando um medidor óptico de fluorescência (FluorPen FP100, Photo Systems Instruments). Os parâmetros determinados para análise do Fotossistema II foram segundo Kotakis (2013) com modificações: a taxa de transporte de elétrons ($\text{ETR} = \text{DFFF} \cdot \Delta F / F_m' \cdot 0,5 \cdot 0,84$) (BILGUER *et al.*, 1995). Os valores de F_m e F_v indicam, respectivamente, as fluorescências máxima e variável, determinadas após 30 minutos de adaptação ao escuro, e F_m' é a fluorescência máxima na presença de luz

4.2.4 Análises bioquímicas

Análises de parâmetros bioquímicos ocorrerão por meio de uma série de enzimas que possuem um mecanismo de inativação de EROs, antioxidante enzimático (SOD, POD e APX), determinação de O_2^- , H_2O_2 e peroxidação lipídica, assim como, o conteúdo de carboidratos e amido em botões florais.

4.2.5 Atividade da Superóxido dismutase (SOD)

A determinação da atividade da Superóxido dismutase (SOD) considera a capacidade da enzima em inibir a fotorredução do NBT (Azul de nitrotetrazólio cloreto). A atividade foi determinada pela adição de 50 μL de extrato bruto a uma solução contendo 13 mM de metionina, 75 μM de NBT, 100 nM de EDTA e 2 μM de riboflavina em 3,0 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7.8.

A reação foi iniciada pela iluminação dos tubos, em câmara composta por tubos fluorescentes (15 W), a 25 °C. Após 5 min de incubação, o final da catálise foi determinado pela interrupção da luz (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). O composto azul formado pela fotorredução do NBT, determinado pelo incremento na absorção a 560 nm. Os tubos considerados brancos para a análise receberam os mesmos reagentes, porém foram mantidos cobertos com papel alumínio. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para a inibição de 50% da fotorredução do NBT. Para o cálculo da atividade específica da enzima, considerou-se a percentagem de inibição obtida, o volume da amostra e a concentração de proteína na amostra ($\mu\text{g} / \mu\text{L}$).

4.2.6 Atividade da peroxidase (POD)

A atividade da enzima Peroxidase (POD) foi determinada a partir da diluição (1:25) de 100 μL de extrato bruto e adicionados a 4,9 mL de solução tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8 contendo 20 mM de pyrogallol e 20 mM H_2O_2 . Após incubação por 1 min a reação foi paralisada com 0,5 mL de H_2SO_4 e a leitura da absorbância feita a 420 nm. Para o cálculo da atividade específica ($\mu\text{Kat} \mu\text{g}^{-1}$ de proteína) da enzima POD foi utilizado um coeficiente de extinção molar de 2,47 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (PEIXOTO *et al.*, 1999).

4.2.7 Atividade da enzima Ascorbato Peroxidase (APX)

A enzima Ascorbato Peroxidase (APX) foi determinada inicialmente preparando-se uma solução de trabalho contendo uma alíquota de 100 μL de extrato bruto com 2,9 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0 (volume final de 3,0 mL). A esta solução acrescenta-se ascorbato e peróxido de hidrogênio, em

concentração final de 0,8 e 1,0 mM, respectivamente. A determinação da variação da extinção (-) é efetuada a 290 nm, sendo que a atividade específica da enzima ($\mu\text{Kat } \mu\text{g Prot-1}$) foi calculada a partir de um coeficiente de extinção molar de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (KOSHIBA, 1993).

4.2.8 Determinação de O_2^- , H_2O_2 e peroxidação lipídica

O radical superóxido (O_2^-) foi determinado de acordo com Li *et al.* (2010). Os tecidos foliares (200 mg) foram homogenizados em 1,8 mL de tampão de fosfato 65 mM (pH 7,8) e centrifugados a 5000rpm durante 10 min. Ao sobrenadante, 1,5 mL de tampão de fosfato 130 mM (pH 7,8) e 50 μL de cloridrato de hidroxilamina 10 mM e subsequentemente incubados a 25°C durante 20 min. Então, 100 μL de 17 mM de sulfanilamida e 100 μL de 7 mM de α -naftilamina foram adicionados à mistura reacional. A absorvância da solução foi medida a 530 nm após a espera de 20 min a 25°C . Uma curva padrão com radical nitrito (NO_2) foi utilizado para calcular a taxa de geração de O_2^- .

A concentração de H_2O_2 , uma molécula capaz de gerar radicais livres, foi determinado como proposto por Velikova *et al.* (2000). As amostras de folhas (200 mg) foram maceradas e homogeneizado em 2,0 mL de ácido tricloroacético (TCA)(0,1% p / v) e centrifugadas a 12000g durante 15 min. Ao sobrenadante, 0,8 mL de tampão de fosfato de potássio 10 mM (pH 7,0) e 1,0 mL de iodeto de potássio 1 M. As leituras do espectrofotômetro foram realizadas a 390 nm e a concentração de H_2O_2 foi calculada por comparação com as leituras de curva padrão obtidas de diferentes concentrações de H_2O_2 e expressas em μmol de $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1}$ de peso fresco.

A peroxidação lipídica foi determinada estimando a teor de malondialdeído (MDA), de acordo com o método de Heath e Packer (1968). Aproximadamente 200 mg de folhas frescas foram moídas em 2,0 mL de TCA (0,1% p / v) e centrifugadas a 12 000g durante 15 min. Ao sobrenadante, ácido tiobarbitúrico (TBA) (0,5% m / v) e TCA (10% p / v) foram adicionados e aquecidos num banho de água 95°C por 30 min em tubos fechados, e a reação paralisada por meio de resfriamento rápido em banho de gelo durante 10 min. A absorvância do substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico resultantes (TBA- RS) foi determinado em um espectrofotômetro a 535 e 600 nm. A concentração do malondialdeído (MDA) –TBA O complexo foi calculado

pela equação: $[MDA] = (A535 - A600) / (n \cdot B)$, onde: n (coeficiente de extinção = $1,56 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-1}$) e b: (comprimento óptico = 1 cm). A peroxidação foi expressa em nmol de MDA g⁻¹ de fresco peso.

4.2.9 Quantificação de carboidrato e amido em botões florais e taxa de germinação do grão de pólen

No final do período de estresse, flores brancas da primeira posição de simpodial frutificação entre o sétimo e nono nós do caule principal e décimo terceiro e décimo quarto nó do caule principal para o estágio de floração e suas folhas adjacentes foram coletadas para análise de carboidratos não estruturais e amido. O material vegetal utilizado nas análises de carboidratos e amido (ovário e estilete de flores brancas) foi separado e seco em estufa a 35 ° C por 7 dias e depois moído antes da extração realizada de acordo com o método de Zhao *et al* (2008). Pólen de flores do primeiro fruto na posição entre o sétimo e o nono nós do caule principal, foram coletadas no final de cada período de estresse para avaliar sua viabilidade de acordo com Burke *et al* (2004). Posteriormente, os números de viáveis e não viáveis de grãos de pólen foram contados em cada imagem e os resultados das duas imagens replicadas foram calculadas as médias. Os grãos de pólen que demonstraram um comprimento de tubo de pólen igual ou maior que o diâmetro do grão de pólen foi considerado germinado e os resultados foram expressos em porcentagens.

4.2.10 Componentes de produção

A quantidade de estruturas frutíferas retidas e abortadas foi avaliada diariamente pela contagem de botões/flores abortados a partir da imposição do estresse até 15 dias após o fim do período de calor. Ao final, foi avaliado o acúmulo de massa de matéria seca da parte aérea (frutos, folhas, caule) e do sistema radicular. O comprimento, diâmetro médio e volume foram avaliados no Winrhizo.

4.2.11 Seleção de genes

Foi avaliado o perfil transcricional do gene codificador da proteína de choque térmico (Heat Shock Protein - HSP70). A busca da sequência do gene foi realizada no genoma do algodão (*Gossypium hirsutum*) depositada no NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A identidade da sequência foi checada por homologia via ferramenta BLASTN com a HSP70 de *Arabidopsis thaliana* (<http://www.arabidopsis.org/>).

4.2.12 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

Para o desenho foi utilizado o programa Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) (UNTERGASSER *et al.*, 2007) com os parâmetros: iniciadores com temperatura de anelamento de 57 a 60°C, amplicons de 80 a 120 pares de bases, comprimento de 20 a 23 pares de bases e conteúdo GC de 40 a 80%. Os pares de iniciadores foram confrontados com sequências de *Gossypium hirsutum* depositadas no NCBI para confirmar sua especificidade através do programa PrimerBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Os iniciadores foram avaliados utilizando o Multiple Primer Analyzer (<https://www.thermofisher.com/multiple-primer-analyzer.html>) para verificar a formação de dímeros e hairpins (Tabela 1).

4.2.13 Extração de RNA

O RNA total foi extraído a partir de 100 mg de tecido foliar, retirados da folha adjacente ao fruto, e macerados com nitrogênio líquido em almofariz com auxílio de pistilo, utilizando o reagente PureLink Plant RNA Reagent (Invitrogen) conforme protocolo da empresa fabricante. Adicionou-se 0,5 mL do reagente gelado (4°C) em um microtubo com o macerado e a amostra foi agitada incubando-se por 5 min a temperatura ambiente. Centrifugou-se a amostra por 15 min a 12.000 g em temperatura ambiente e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. Em seguida, acrescentou-se 0,1 mL de NaCl (5 M) e 0,3 mL de clorofórmio ao extrato, misturando por inversão. As amostras foram centrifugadas por 10 min a 12.000 g a 4°C para separar as fases, sendo que a fase superior (aquosa) foi transferida para

outro microtubo logo após a centrifugação e adicionou-se igual volume de álcool isopropílico.

A mistura foi mantida em repouso por 10 min a temperatura ambiente. Novamente foi realizada uma centrifugação seguindo as mesmas condições descritas anteriormente. O sobrenadante foi descartado, tomando cuidado para não perder o pellet, e adicionou-se 1 mL de etanol 75%. Centrifugou-se a temperatura ambiente por 1 min a 12.000 g e retirou-se o líquido, seguindo de uma breve centrifugação (spin) para retirar o líquido residual com auxílio da micropipeta. Adicionou-se 20 µL de água tratada com DEPC (0,1%) para ressuspender o RNA total extraído.

As amostras foram tratadas com a enzima Turbo DNase (Ambion) para eliminar contaminação com DNA genômico que possa ter restado da extração, seguindo o protocolo do fabricante. Para tanto, adicionou-se em cada amostra 2 µL do 10X Turbo DNase Buffer (1 vez a concentração da amostra) e 1 µL da enzima Turbo DNase (2 U), incubando a 37°C por 30 min. Para inativação da enzima, acrescentou-se 3 µL de EDTA (15 mM), incubando a 75°C por 10 min.

A concentração do RNA total extraído foi mensurada por espectrofotometria por meio de análise de absorvância no comprimento de onda de 260 nm e sua qualidade estimada na razão 260/280 nm. Após a quantificação, foi analisada a qualidade (integridade) do RNA total por eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v) contendo tampão TBE 0,5X e 4 µL de brometo de etídio (1 mg/mL).

4.2.14 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada seguindo o protocolo do kit ReadyScript cDNA Synthesis Mix (Sigma-Aldrich) partindo de 1 µg de RNA total extraído das folhas, utilizando 4 µL do mix, completando o volume final de cada amostra com água DEPC para 20 µL. Os componentes foram agitados brevemente com o auxílio do vortex e incubados a 25°C por 5 min, 42°C por 30 min e 85°C por 5 min.

Este cDNA foi submetido a duas reações de PCR: uma com o gene de referência UBQ7 (WANG *et al.*, 2016) para verificar se todas as amostras de cDNA amplificavam este gene, e outra com os iniciadores específicos de cada gene para verificar se estes amplificavam unicamente o fragmento esperado para cada gene. Para as reações de PCR seguiu-se o protocolo do kit GoTaq Green Master Mix

(Promega) utilizando 12,5 μL do mix, 1 μL de cDNA, 1 μL do iniciador senso (10 μM), 1 μL do iniciador antisense (10 μM), completando o volume final com água Milli-Q autoclavada para 20 μL , além de uma amostra de controle negativo (sem iniciadores). Em seguida, a reação seguiu as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 s, anelamento a 58°C por 30 s, extensão a 72°C por 45 s e extensão final a 72°C por 5 min. Para a segunda PCR, foi utilizado um pool de todas as amostras de cDNA. Ao final, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) utilizando o marcador molecular DNA Ladder 100 pb (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

4.2.15 PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR)

As reações de RT-qPCR foram realizadas em placas, em triplicata, utilizando o reagente PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) e analisadas pelo equipamento StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Primeiramente foi analisada a eficiência de amplificação dos iniciadores, utilizando 5 μL de SYBR Green, 0,4 μL do iniciador senso (5 μM), 0,4 μL do iniciador antisense (5 μM), 1 μL do pool de cDNA (diluído 1:5), completando o volume final para 10 μL com água Milli-Q autoclavada. A reação seguiu as seguintes condições: 95°C por 2 min, 95°C por 30 s e 58°C por 30 s, ciclo este repetido 40 vezes. Ao término da reação, a curva de melting foi determinada para cada par de iniciadores visando verificar a presença de somente um pico gene-específico e ausência de dímeros, e a eficiência de amplificação foi calculada utilizando o programa LinRegPCR (RAMAKERS *et al.*, 2003).

Para a análise da expressão gênica utilizou-se 5 μL de SYBR Green, 0,4 μL do iniciador senso (5 μM), 0,4 μL do iniciador antisense (5 μM), 1 μL de cDNA 1:5 (v/v), completando o volume final para 10 μL com água Milli-Q autoclavada. A amplificação foi conduzida seguindo as seguintes condições: 40 ciclos a 95°C por 2 min, 95°C por 30 s e 58°C por 30 s. Para os cálculos da quantificação relativa da expressão de cada gene foi utilizado o método $(1+E)^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Como normalizador foi utilizado o gene UBQ7 (WANG *et al.*, 2016) e como calibrador as plantas de algodão cultivadas em condições normais de temperatura e sem aplicação de melatonina.

Tabela 1 - Descrição dos genes e sequências dos iniciadores utilizados para o RT-qPCR.

nome do gene	escrção	ESTs G <i>ossypium hirsutum</i>	Locus A <i>Arabidopsis thaliana</i>	Iniciador senso (5'-3')	Iniciador antisenso (5'-3')	mplicon (pb)	eficiência (%)
SP70	eat shock protein 70	J415196. 1 ¹	T3G12580. 1 ²	CGAAACTGC TGGTGGTGTTA	CAAGACACC GGGTTGGTTAT	09	8,0
BQ7	biquitina	Q116441. 1 ¹	-	AGAAGGTCA AGCTCGCTGTC	CGCATTAGG GCACTCTTTTC	6	7,5

1(NCBI); 2(<http://www.arabidopsis.org/>).

4.2.16 Análise estatística

Os resultados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA, $p < 0,05$). A média dos valores foi comparada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) com o programa SISVAR (5.1, Universidade Federal de Lavras).

4.3 Resultado

4.3.1 Avaliações fisiológicas

De acordo com os valores de assimilação líquida de CO₂ (PN), dois dias após o início do estresse térmico, plantas tratadas com 100 μmol de mel, obtiveram um aumento, em comparação ao tratamento com 0 μmol de mel (Figura 13 – A), em plantas sem estresse térmico. Na condutância estomática (GS) de plantas estressadas, dois dias após a imposição da alta temperatura, houve aumento das doses de 100 μmol de mel comparadas ao tratamento com 0 μmol de melatonina (Figura 13 – B). Plantas estressadas apresentaram um aumento na concentração intracelular de CO₂ (Ci) e na transpiração (E), comparadas as plantas sem estresse, independente da dose (Figura 13 – C e D).

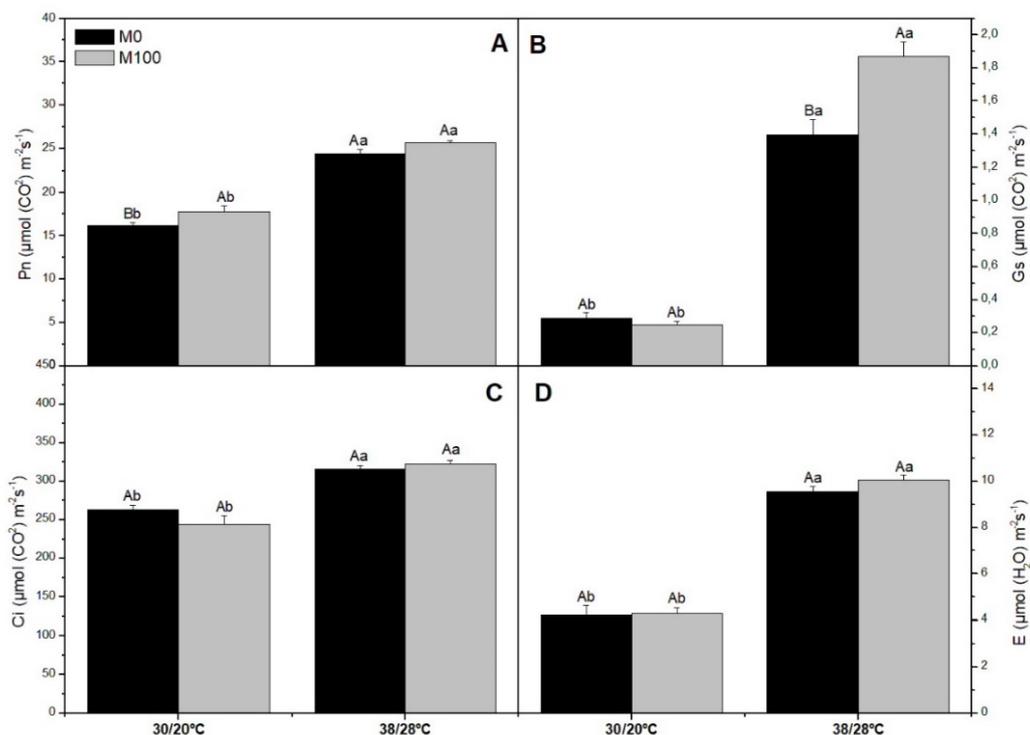


Figura 13 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μM) na taxa de assimilação de CO₂ (PN) (A), na condutância estomática (GS) (B), na concentração intercelular de CO₂ (Ci) (C) e na transpiração (E) (D), em plantas de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal, dois dias após submissão do estresse. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa (p < 0.05) entre as doses na mesma condição térmica. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições térmicas dentro da mesma dose

Após cinco dias de alta temperatura, plantas submetidas a aplicação de 100 μmol obtiveram redução da Pn, comparadas as plantas controle, em condição de estresse térmico (Figura 14 – A). Com aplicação de melatonina, plantas submetidas a estresse térmico, tiveram uma diminuição de GS, comparada ao tratamento controle (Figura 14 – B). Plantas sem e com o estresse térmico, não obtiveram diferenças significativa em Ci, comparadas ao tratamento controle (Figura 14 - C). A aplicação de 100 μmol de melatonina promoveu redução na E, em ambas condições térmicas, comparadas ao tratamento de 0 μmol de mel (Figura 14 – D).

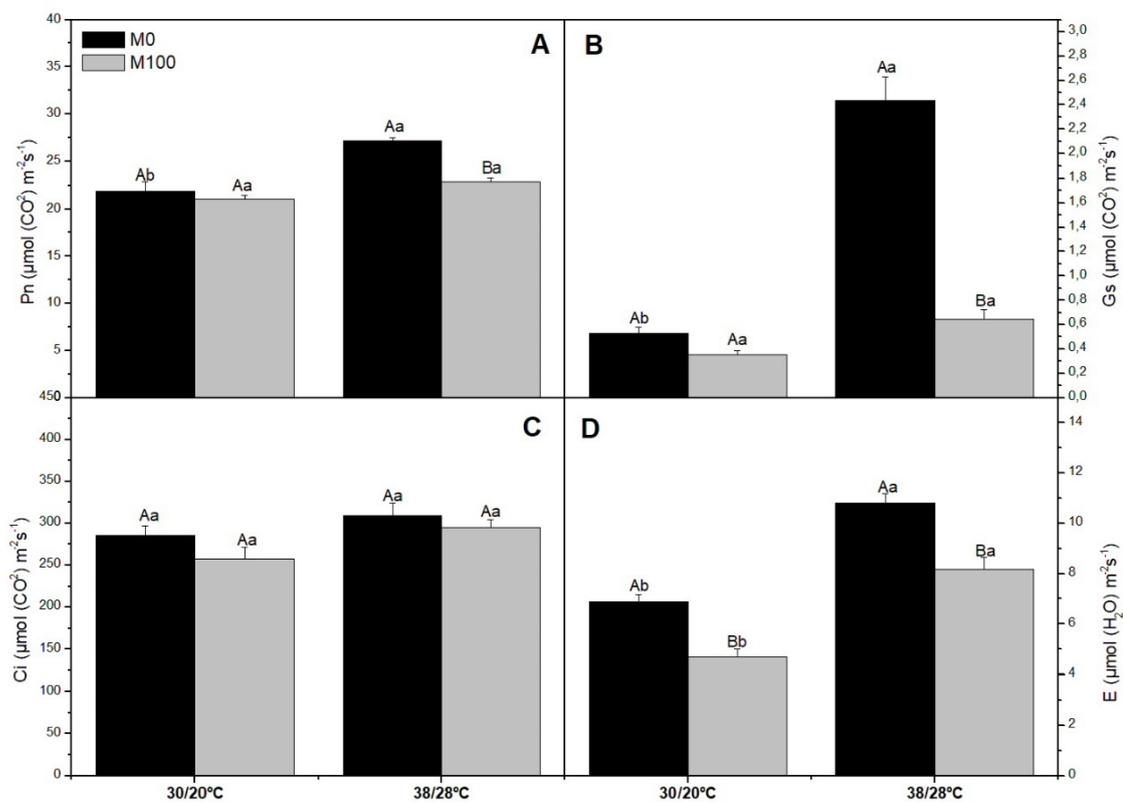


Figura 14 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μM) na taxa de assimilação de CO_2 (PN) (A), na condutância estomática (GS) (B), na concentração intercelular de CO_2 (Ci) (C) e na transpiração (E) (D), em plantas de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal, cinco dias após submissão do estresse. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição térmica. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições térmicas dentro da mesma dose.

Sete dias após o aumento da temperatura, a PN de plantas tratadas com 100 μmol foi superior a plantas tratadas com 0 μmol de mel (Figura 15 – A). Plantas

submetidas ao estresse térmico obtiveram um aumento na PN, comparado com 0 μmol de mel (Figura 15 – A). A GS, de plantas com aplicação de 100 μmol de melatonina, sem a imposição do estresse térmico, obteve um aumento comparado as plantas com 0 μmol de mel (Figura 15 – B). Plantas estressadas, em ambas doses de mel, houve um aumento da GS, comparada as plantas sem estresse térmico (Figura 15 – B). Plantas sem o estresse térmico obtiveram um aumento na Ci, com aplicação de mel na dose de 100 μmol , comparado com o tratamento de 0 μmol de mel (Figura 15 – C). Plantas sem estresse térmico obtiveram um aumento na E, quando submetidas ao tratamento de 100 μmol de melatonina, comparadas aos tratamentos de 0 μmol (Figura 15 - D). Plantas estressadas apresentaram um aumento em Ci e E, comparadas ao tratamento sem estresse, independente da dose de mel (Figura 15 – D).

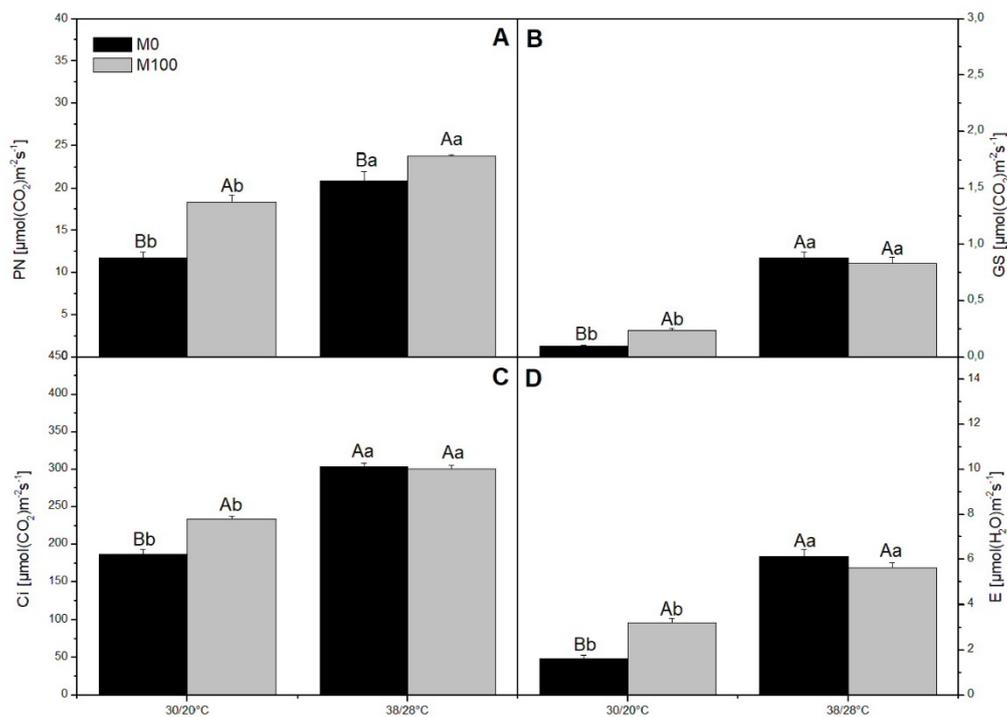


Figura 15 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μM) na taxa de assimilação de CO_2 (PN) (A), na condutância estomática (GS) (B), na concentração intercelular de CO_2 (Ci) (C) e na transpiração (E) (D), em plantas de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal, sete dias após submissão do estresse. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição térmica. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições térmicas dentro da mesma dose.

Um dia após a retomada da temperatura normal, a PN de plantas tratadas com 100 μmol foi superior a plantas tratadas com 0 μmol de mel, em ambas condições térmicas (Figura 16 – A). Em GS, de plantas com aplicação de 100 μmol de melatonina, sem a imposição do estresse térmico, houve um aumento comparado as plantas com 0 μmol de mel (Figura 16 – B). Na Ci de plantas controles e plantas submetidas ao estresse térmico, um dia após a retomada da temperatura normal, não houve aumento entre os tratamentos de 0 e 100 μmol de mel (Figura 16 – C). Na E, de plantas com aplicação de 100 μmol de melatonina, sem a imposição do estresse térmico, houve um aumento comparado as plantas com 0 μmol de mel (Figura 16 – B).

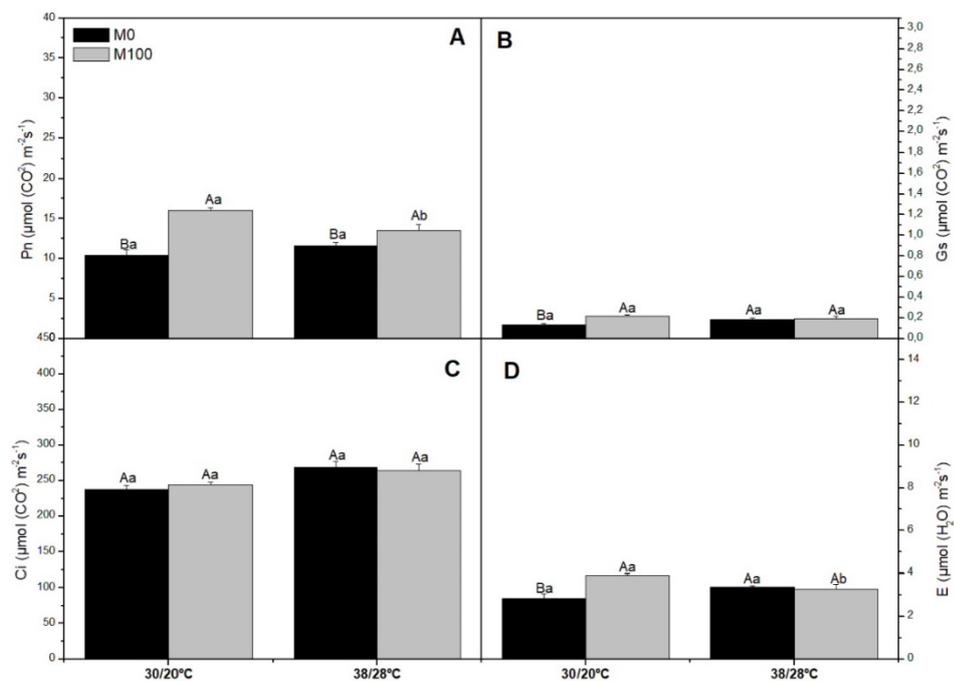


Figura 16 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μM) na taxa de assimilação de CO_2 (PN) (A), na condutância estomática (GS) (B), na concentração intercelular de CO_2 (Ci) (C) e na transpiração (E) (D), em plantas de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal, 24h após retomada da temperatura normal. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição térmica. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições térmicas dentro da mesma dose.

De acordo com os valores da taxa de transporte de elétrons (ETR), sete dias após o início do estresse térmico, plantas tratadas com 100 μmol de mel, não

obtiveram uma diferença, em comparação ao tratamento com 0 μmol de mel, em ambos regimes térmicos (Figura 17 – A). Plantas submetidas ao estresse térmico, sem aplicação de melatonina, obtiveram uma queda ($p < 0.05$) na ETR, comparado ao tratamento controle (Figura 17 – A). Da mesma forma, um dia após a retomada da temperatura normal, não houve diferença ($p < 0.05$) na ETR, em ambos regimes térmicos, quando aplicado 0 e 100 μmol de mel (Figura 17 – B). Plantas submetidas ao estresse térmico, sem aplicação de melatonina, obtiveram uma queda ($p < 0.05$) na ETR, comparado ao tratamento controle (Figura 17 – B).

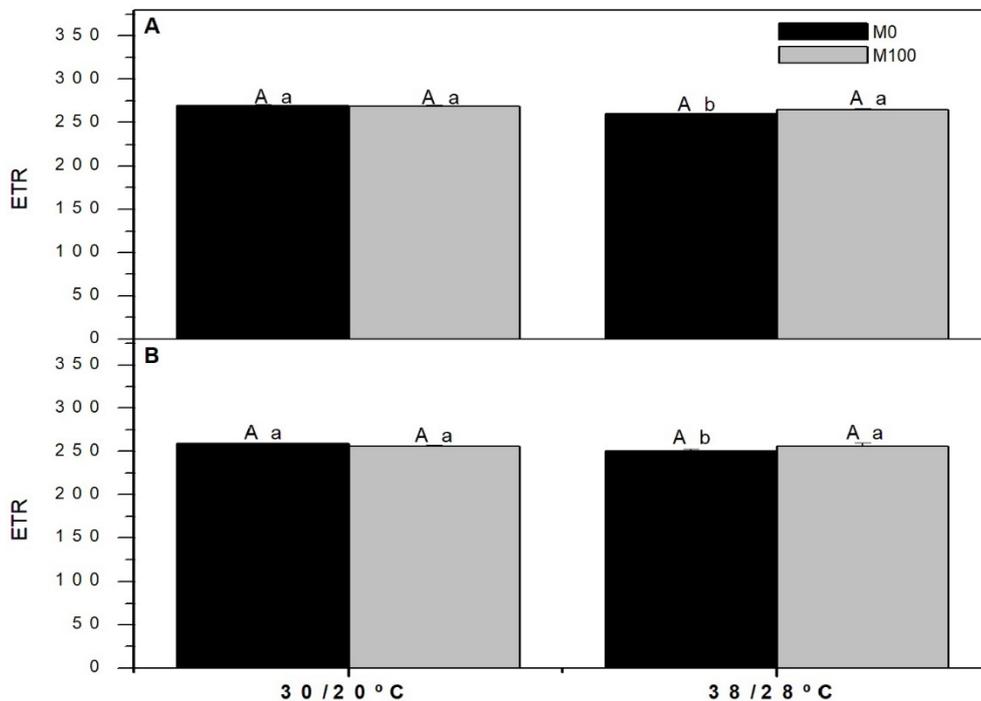


Figura 17 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μM) na taxa de transporte de elétrons (ETR), em plantas de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal, sete dias após submissão do estresse (A) e 24h após retomada da temperatura normal (B). Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição térmica. minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições térmicas dentro da mesma dose.

4.3.2 Avaliação biomassa

Em comparação ao tratamento 0 μmol de Mel, a adição de 100 μmol de mel diminuiu a área foliar, de plantas sem o estresse térmico (Figura 18 – A). De forma contrária, plantas tratadas com 100 μmol , obtiveram um aumento comparado ao

tratamento de 0 μmol de mel (Figura 18 - A). A altura de caule foi significadamente maior quando submetido a aplicação de 100 μmol de mel, de 4,0 e 2,3 cm, em plantas sem e com estresse, respectivamente (Figura 18 - B). Em plantas sem estresse térmico, houve uma queda na massa seca total, quando submetidas a aplicação de 100 μmol de mel, comparadas ao tratamento controle (Figura 18 - C). Não houve diferença entre as aplicações de melatonina, em ambas condições térmicas, na massa seca de raiz (Figura 18 - D).

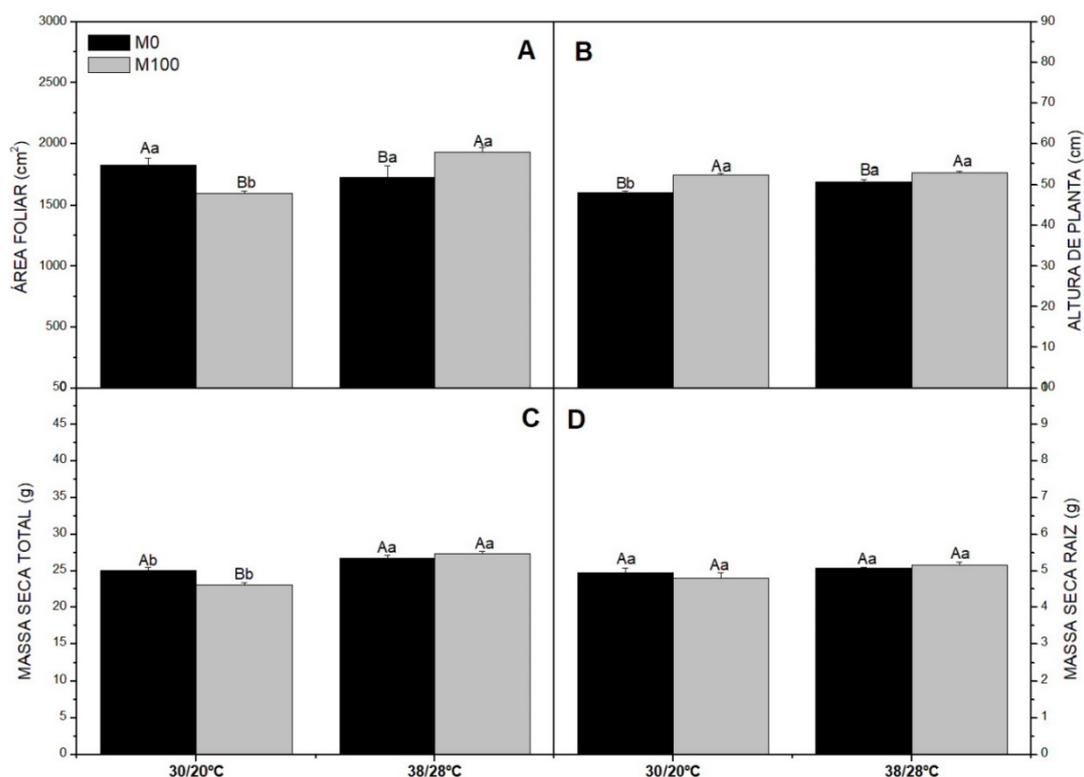


Figura 18 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μM) área foliar (A), no comprimento de caule (B), na massa seca total (C) e na massa seca de raiz (D), em plantas de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal, 15 dias após retomada da temperatura normal. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição térmica. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições térmicas dentro da mesma dose.

4.3.3 Avaliações bioquímicas

Em comparação ao tratamento 0 μmol de mel, a adição de 100 μmol de mel proporcionou uma queda ($p < 0.05$) na concentração do MDA, em plantas submetidas

ao estresse por alta temperatura, sete dias após o início do estresse térmico (Figura 19).

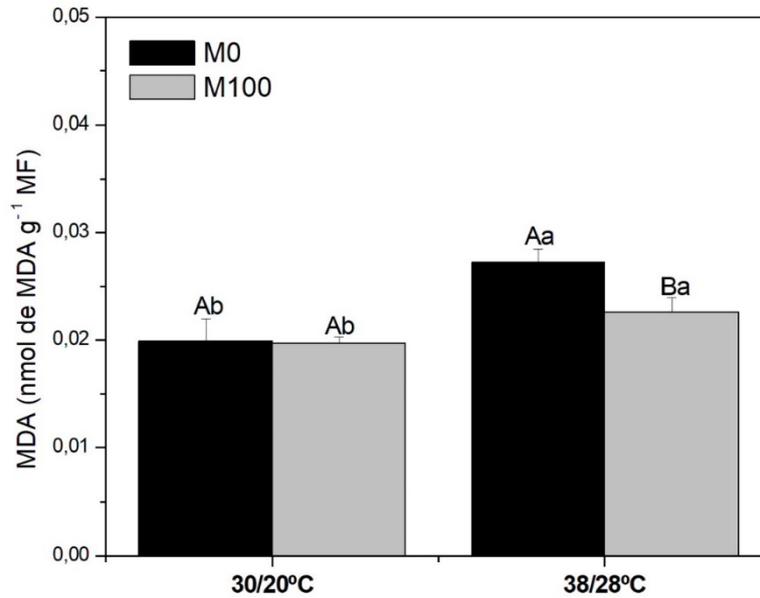


Figura 19- Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μM) concentração de MDA, em plantas de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal, sete dias após submissão do estresse. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição térmica. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições térmicas dentro da mesma dose.

A aplicação de 100 μmol de mel, proporcionou redução na concentração de superóxido de plantas submetidas ao estresse térmico, quando comparado ao tratamento controle (Figura 20 – A). Não houve diferença entre os tratamentos de 0 e 100 μmol de mel, em plantas controle (Figura 20 – A). Não houve diferença na concentração de peróxido, em ambas condições (Figura 20 – B).

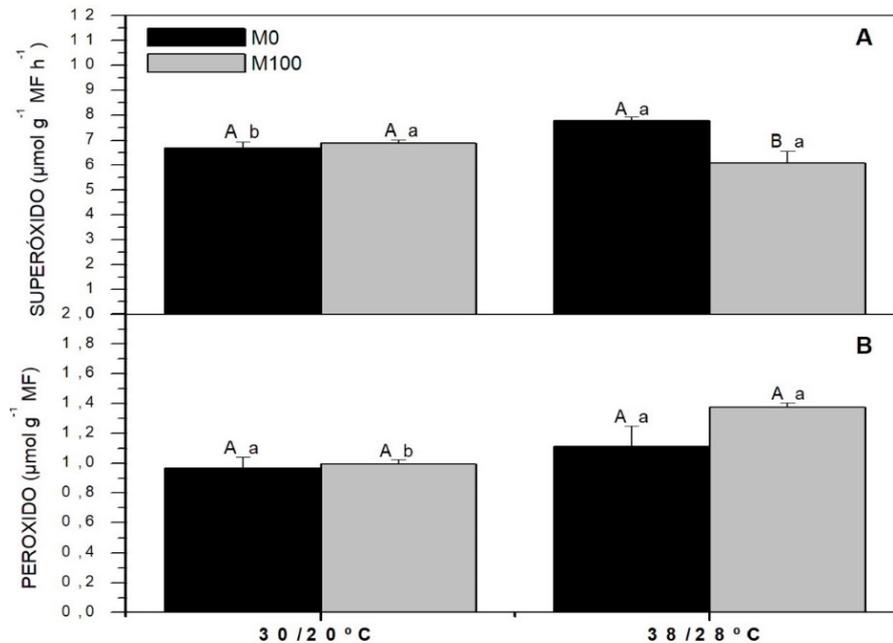


Figura 20 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μM) concentração de superóxido (A) e na concentração de peróxido (B), em plantas de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal, sete dias após submissão do estresse. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição térmica. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições térmicas dentro da mesma dose.

A atividade das enzimas antioxidantes APX, POD e SOD, sete dias após o início do estresse térmico, não foram diferidas quando tratadas com 100 μmol de mel, comparadas ao tratamento controle, em ambos os regimes térmicos (Figura 21 – A, B e C), respectivamente.

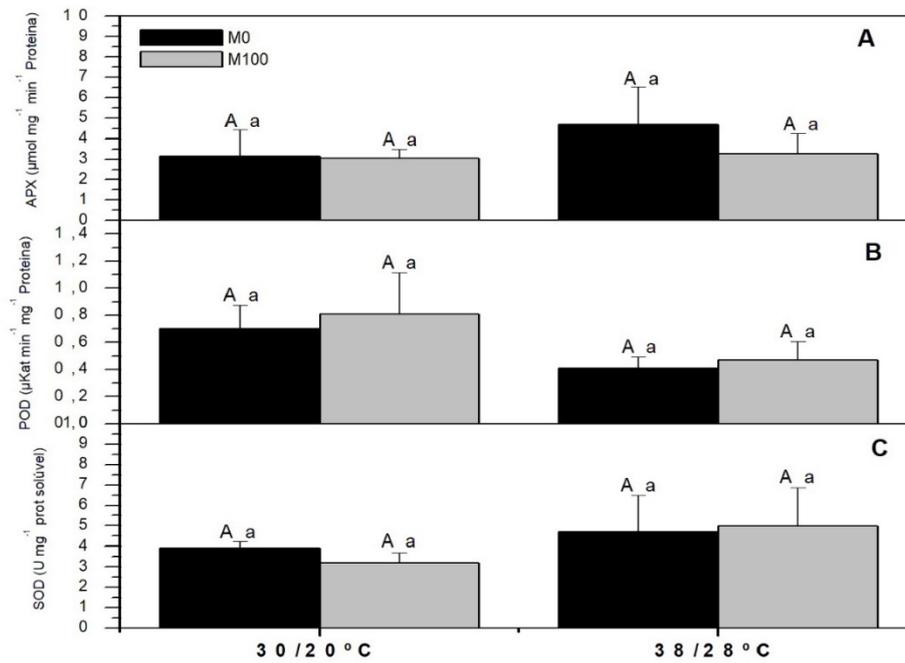


Figura 21 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μM) na concentração de ascorbato peroxidase (APX) (A), na concentração de peroxidase (POD) (B) e concentração de superóxido dismutase (SOD) (C) em plantas de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal, sete dias após submissão do estresse. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição térmica. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições térmicas dentro da mesma dose.

Na expressão relativa da HPS70, não houve diferença entre os tratamentos de 0 e 100 μM de mel, comparado ao calibrador (controle), em ambos regimes térmicos (Figura 22).

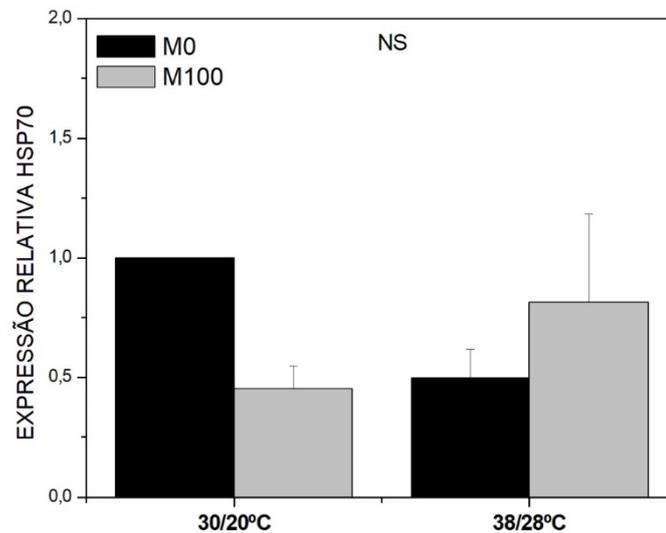


Figura 22 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μM) na expressão relativa da HSP70, em plantas de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal, 4 horas após submissão do estresse. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição térmica. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições térmicas dentro da mesma dose.

A concentração de sacarose em botões florais foi elevada com aplicação de 100 μmol de mel, em plantas sem estresse térmico, em comparação ao tratamento controle (Figura 23 – A). Plantas submetidas ao estresse térmico, em ambas as doses, houve um aumento significativo na concentração de sacarose, comparadas as plantas sem regime de alta temperatura (Figura 23 – A). A concentração de glicose e frutose nos botões florais não diferiu entre os tratamentos de 0 e 100 μmol de mel, em ambos regimes térmicos (Figura 23 – B e C).

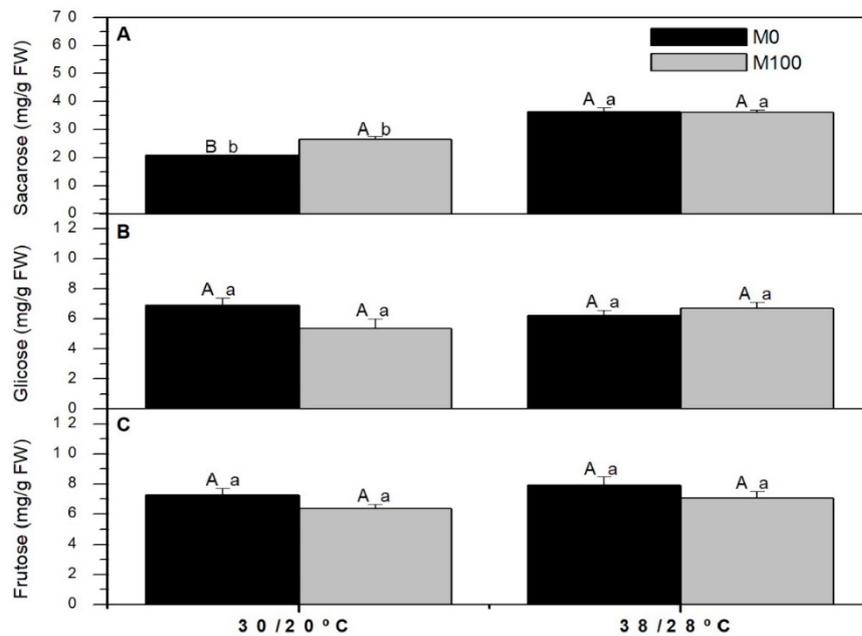


Figura 23 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μM) na concentração de sacarose (A), na concentração glicose (B) e concentração de frutose (C) em plantas de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal, sete dias após submissão do estresse. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição térmica. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições térmicas dentro da mesma dose.

A concentração de frutose, glicose, sacarose e sorbitol em botões florais, um dia após a retomada da temperatura normal, não diferiu entre plantas controle e plantas tratadas com mel, para ambas condições térmicas (Figura 24 – A, B, C e D).

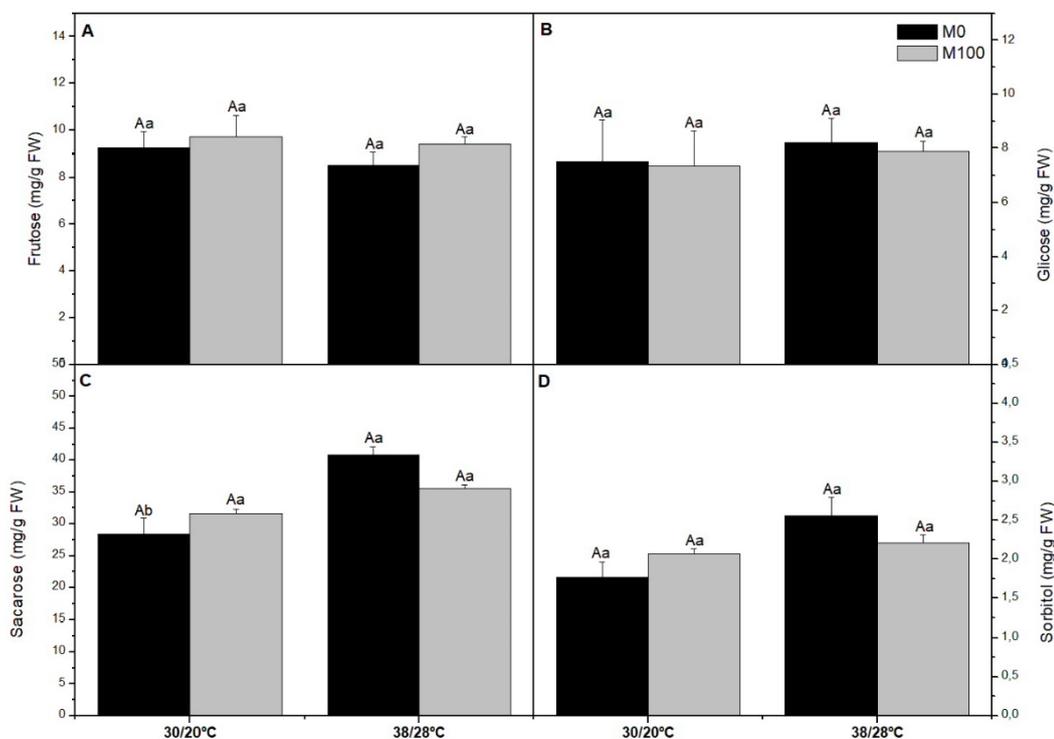


Figura 24- Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μM) na concentração de frutose (A), na concentração glicose (B), concentração de sacarose (C) e na concentração de sorbitol (D), em plantas de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal, um dia após a retomada da temperatura normal. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição térmica. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições térmicas dentro da mesma dose.

4.3.4 Avaliação produção

A % de germinação dos grãos de pólen foi incrementada em plantas submetidas ao estresse térmico, quando tratadas com 100 μmol de mel, comparada ao tratamento controle (Figura 25 – A). Não houve diferença na % de germinação dos grãos de pólen, em plantas sem estresse térmico (Figura 25 – A). O comprimento do tubo polínico, de plantas estressadas, obteve um aumento quando tratadas com 100 μmol de melatonina, comparadas ao tratamento de 0 μmol de mel (Figura 25 – B).

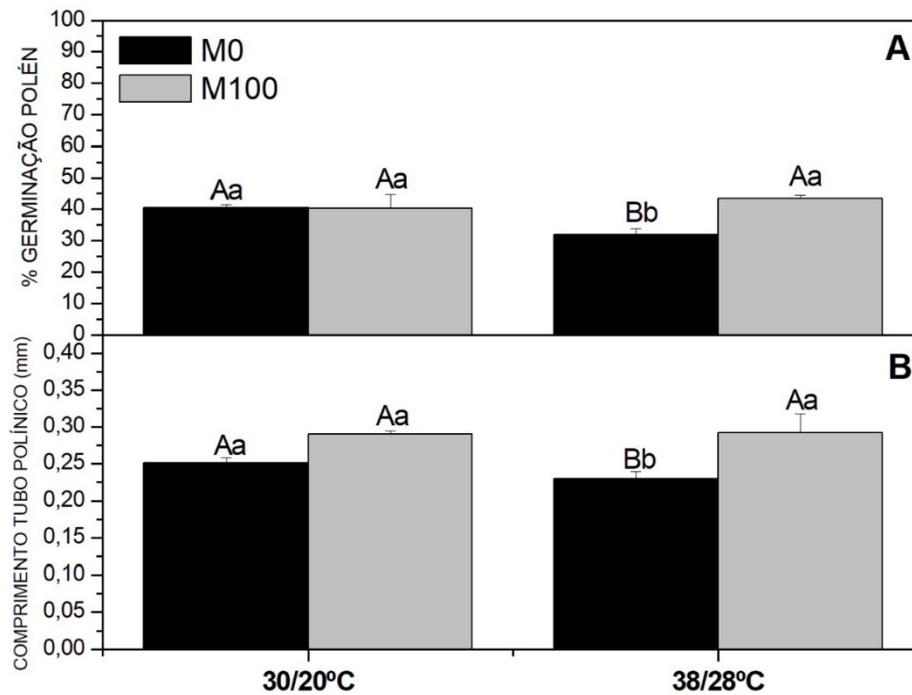


Figura 25 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μM) na % de germinação dos grãos de pólen (A) e no comprimento do tubo polínico (B), em plantas de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal, sete dias de estresse. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição térmica. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições térmicas dentro da mesma dose.

A % de abortamento de plantas submetidas ao estresse térmico reduziu 45% quando tratadas com 100 μmol de mel, comparadas ao tratamento controle (Figura 26 – A). Em comparação ao tratamento 0 μmol de mel, o tratamento de 100 μmol de mel aumentou em 45%, o número de estruturas retidas, de plantas submetidas ao estresse térmico (Figura 26 – B). Plantas submetidas ao estresse térmico, obtiveram um aumento de 45%, na % de retenção, quando tratadas com 100 μmol de mel, comparadas ao tratamento de 0 μmol de mel (Figura 26 – C).

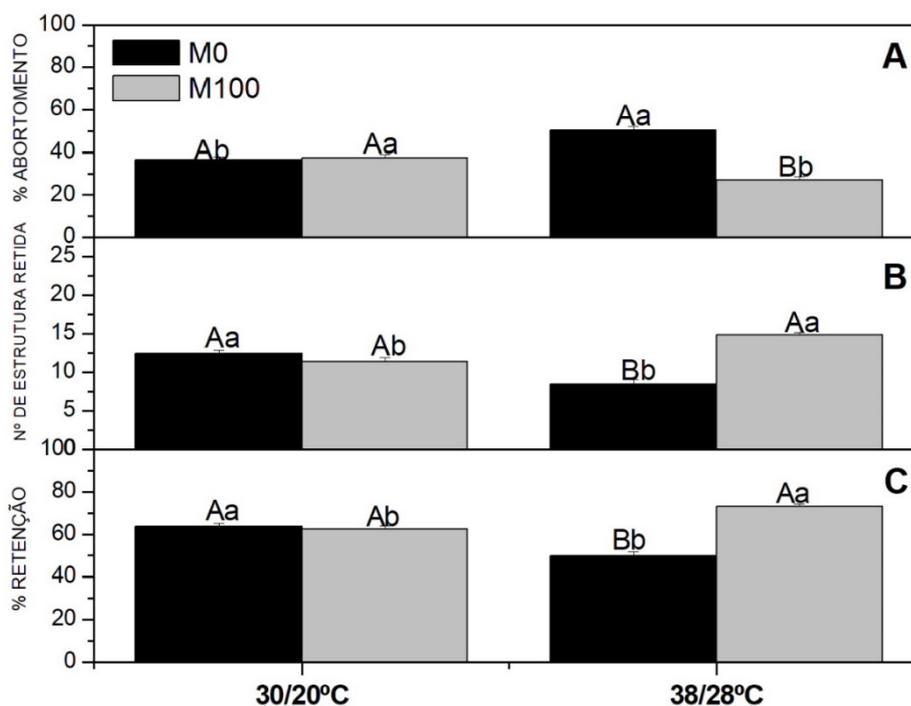


Figura 26 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μM) na % de abortamento (A), número de estruturas retidas (B) e na % de retenção (C), em plantas de algodão submetidas a estresse por alta temperatura e temperatura normal, 15 dias após retomada da temperatura normal. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição térmica. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições térmicas dentro da mesma dose.

4.4 Discussão

4.4.1 Melatonina e sua ação nas trocas gasosas e bioquímica de plantas submetidas a alta temperatura

A produtividade do algodão é fortemente influenciada por estresses bióticos, como a alta temperatura, sendo este um problema ambiental, incontornável, que diminui a produtividade do algodão e a qualidade da fibra nos campos (ABRO *et al.*, 2015). O período mais sensível as altas temperaturas no algodoeiro corresponde ao início do primeiro botão floral (entre 20 e 25 dias antes da antese) até a fase de florescimento, fase a qual o número potencial de óvulos por ovário, o número de anteras e a viabilidade do pólen são estabelecidos (STEWART 1986; ECHER *et al.*, 2014). Ainda, esta fase exige alta demanda do aparato fotossintético, para sintetizar

e alocar fotoassimilados para as novas estruturas reprodutivas, que necessitam de alta fonte energética para seus processos.

A fotossíntese é um processo essencial no metabolismo primário das plantas e desempenha um papel importante quando a mesma passa por estresse abióticos. O crescimento das plantas de algodão e as respostas fotossintéticas à temperatura têm sido vastamente estudadas, mas os resultados são muitas vezes contraditórios devido a uma série de condições experimentais. Diversos estudos afirmam que o aparato fotossintético, e como decorrência a fotossíntese, são afetados negativamente perante o aumento da temperatura no algodoeiro (HALL, 2004; WISE *et al.*, 2004; BIBI *et al.*, 2008).

Em nosso estudo foi observado diversas respostas dependentes das condições expostas a planta, de plantas sem e com estresse térmico ou com a presença ou não de melatonina. A temperatura elevada aumentou a assimilação de carbono, de plantas sem e com a adição de melatonina (Figura 13 e 15). Segundo estudos (BURKE *et al.* 1988; CONATY *et al.*, 2012) a temperatura ideal da cultura é de 28°C, variando entre 25 e 31°C. No entanto, as variedades modernas são comumente mais tolerantes a exposição a temperaturas extremas, de tal maneira que a Pn pode ser condicionada a temperaturas altas (ZHAO *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2020). O aumento de Pn pode estar parcialmente relacionado ao maior Gs das plantas sob a alta temperatura (Figura 13, 14 e 15), o que aliviou parte da limitação estomática da fotossíntese (LI *et al.*, 2020). Fator que se confirma quando o regime térmico é normalizado e plantas em recuperação tem seu Gs diminuído, consequentemente com a Pn sendo inferior as plantas sem o estresse (Figura 16). Esta resposta fisiológica, sob temperaturas mais quentes, também podem ser auxiliadas pela aclimação térmica da fotossíntese, tendo assim um retardo na resposta ao estresse (KUMARATHUNGE *et al.*, 2018). Podendo ser também correlacionada com ajustes bioquímicos da fotossíntese, como a carboxilação da rubisco e transporte de elétrons (LAW *et al.*, 2001; KUREK *et al.*, 2007). Em nossos estudos, a taxa de transporte de elétrons, foi levemente afetada nas plantas condicionadas ao calor, sem mel (Figura 17), demonstrando um possível dano no aparato transportador de elétrons, que se manteve durante a retomada da temperatura.

De forma contrária, plantas que receberam melatonina não obtiveram danos no seu transporte de elétrons, bem como mantiveram uma fotossíntese maior, em

comparação as plantas estressadas sem mel (Figura 13, 15, 16 e 17). No quinto dia de estresse, o uso da melatonina proporcionou uma maior eficiência no uso de CO², visto que, mesmo tendo uma limitação estomática, a Pn destas plantas não diferiu de plantas sem estresse (na mesma dose de mel), ainda, obteve uma pequena diferença compara a plantas estressadas sem mel (Figura 14). Já as plantas estressadas sem melatonina, obtiveram um alto valor de condutância estomática, e um pequeno ganho em sua Pn, comparado ao tratamento controle (Figura 14). A longo prazo, a aplicação de melatonina proporciona uma melhor capacidade de assimilação de CO₂ e regulação estomática, do que plantas sem a molécula (WANG *et al.*, 2012; REN *et al.*, 2021). Esta percepção, das plantas para a regulação do seu aparato fotossintético perante ao estresse, foi retardada, através da ação da melatonina, sendo efetiva no 5º dia de estresse até a retomada da temperatura normal, fato que não ocorreu em plantas sem a molécula (Figura 15 e 16).

A regulação estomática das plantas estressadas, tratadas com melatonina, pode estar atrelada com a regulação hormonal da melatonina sobre o ácido abscísico (ABA), hormônio ao qual regula a abertura e fechamento estomático, principalmente sobre estresse (WANG *et al.* 2012; Hu *et al.*, 2021). Antagonista ao hormônio, a melatonina regula genes específicos à síntese do ABA, reduzindo seu conteúdo em plantas estressadas (LI *et al.*, 2015). Segundo Li *et al.* (2015) a melatonina utiliza de dois meios para regular os estômatos e aumentar a tolerância ao estresse, primeiro aumentando a degradação de ABA e suprimindo sua síntese.

O teor de MDA é um índice importante para refletir a taxa e a intensidade da peroxidação lipídica nos tecidos vegetais (HU *et al.*, 2016). O estresse térmico promoveu um maior acúmulo de superóxido, conseqüentemente, ocasionando um aumento em peroxidação lipídica de membrana celular, assim, promovendo um aumento nas taxas de MDA, em plantas estressadas sem melatonina (Figura 19 e 20). A melatonina mitiga os danos oxidativos de espécies reativas de oxigênio (EROs), aliviando os efeitos causados pelo estresse térmico. A biomolécula tem capacidade antioxidante, neutralizando as EROs, limpando seu excesso no sistema (JAHAN *et al.*, 2021a; 2021b).

Em nossos resultados, foi observado que o tratamento com melatonina, proporcionou uma queda no superóxido em plantas submetidas ao estresse térmico (Figura 20). Conseqüentemente, proporcionando uma menor peroxidação lipídica, e redução na concentração de MDA (Figura 19), demonstrando que a melatonina

proporcionou um alívio no acúmulo de EROs e nos seus danos, em plantas estressadas. A mesma resposta foi relatada em diversas culturas e diversos tipos de estresses, incluindo por alta temperatura (WANG *et al.*, 2017; AHAMMED *et al.*, 2019; XIAO *et al.*, 2019, CHEN *et al.*, 2020 JAHAN *et al.*, 2021a; 2021b). Demonstrando que a aplicação de melatonina, em plantas submetidas ao calor, não somente alivia os efeitos danosos do estresse, como proporciona uma melhora nos mecanismos fisiológicos e bioquímicos da planta para sua sobrevivência e desenvolvimento.

4.4.2 Melatonina e sua ação na viabilidade de pólen e componentes de produção de plantas submetidas a alta temperatura

A viabilidade do grão de pólen também é determinante para os componentes de rendimento da cultura, visto que, quando germinado, este proporciona a fecundação dos óvulos, e assim, posterior desenvolvimento das maçãs do algodoeiro. Em contraste, o grão de pólen, tem alta sensibilidade a temperatura extrema, como consequência, a esterilidade do grão de pólen é fortemente causada pelo aumento de temperatura do ambiente (ZHAO *et al.*, 2005; ECHER *et al.*, 2014). Quando a viabilidade ou a germinação do grão de pólen é afetada, a qualidade e quantidade de estruturas frutíferas são afetadas negativamente. Como decorrência da temperatura elevada o comprimento do tubo polínico é reduzido, ocasionando queda no número de lóculos fecundados.

O percentual de germinação de pólen de algodão é significativamente inibido quando imposto à estresse (HU *et al.*, 2020). Todavia, mesmo os pólenes com sucesso na fecundação, as plantas ainda exibem um baixo estabelecimento dos frutos, sugestionando uma má formação dos óvulos, perante o estresse (ZHAO *et al.*, 2005). Em nossos resultados foi constatado que a germinação e viabilidade dos grãos de pólen foi afetada negativamente pelo aumento da temperatura (Figura 25). A baixa viabilidade do pólen foi constatada quando estes apresentaram uma queda no comprimento do tubo polínico, ou seja, mesmo que germinados estes não foram aptos para fecundar os óvulos. Com o aumento da temperatura ideal em dois cultivares de algodão, foram observadas diferenças significativas na germinação de pólen e crescimento do tubo de pólen (KAKANI *et al.*, 2005). Em ambas cultivares, a germinação de pólen e o crescimento do tubo de pólen foram severamente

reduzidas, demonstrando que mesmo cultivares tolerantes ao calor, sofreram danos por elevadas temperaturas prolongada (KAKANI *et al.*, 2005).

Por outro lado, o tratamento com melatonina proporcionou um aumento da germinação dos grãos de pólen, bem como no comprimento do tubo polínico (Figura 25). Este resultado demonstra que a biomolécula, proporcionou uma melhora na germinação e viabilidade dos grãos de pólen, promovendo uma maior fecundação dos óvulos, conseqüentemente taxa de retenção dos frutos, sob estresse (Figura 26). Resultados similares mostram que o pré-tratamento de melatonina promove uma atenuação dos efeitos danosos de estresse hídrico em pólen de algodão, proporcionando uma maior germinação e viabilidade dos pólen (Hu *et al.*, 2020).

O bom desenvolvimento do tudo polínico está intimamente ligado ao acúmulo de carboidrato direcionado ao botão floral (HU *et al.*, 2019). O aumento da assimilação de carbono (Pn) leva ao maior ganho de sacarose, este que é a primeira linha de fotoassimilados gerado. O uso de melatonina pode aumentar a capacidade fotossintética de folhas estressadas, ofertando suprimento para o desenvolvimento de órgãos florais (WANG *et al.*, 2013). Em nossos resultados, foi demonstrado que a melatonina proporcionou uma maior eficiência na assimilação de carbono (Figura 13, 14 e 15), acarretando em acúmulo de sacarose nos botões florais (Figura 23). A aplicação de mel regula positivamente a expressão de genes de transportadores de sacarose em anteras estressadas (GhSUT-1), ofertando maior acúmulo de sacarose nestes órgãos (HU *et al.*, 2020). Em estudo com plantas de algodão submetidos a regime de suspensão hídrica no florescimento, Khattak *et al.* (2022), relata que a melatonina melhorou os atributos fisiológicos das folhas de algodão, proporcionando melhora nas trocas gasosas, metabolismo de açúcares, além de controlar a taxa de abortamento, decorrendo em ganho de produção. Desta forma sugestionamos que a aplicação de melatonina aumentou a produção de fotoassimilados, que posteriormente foram direcionados para estruturas reprodutivas, proporcionando uma melhor condição de germinação e viabilidade do grão de pólen, conseqüentemente, maior taxa de retenção de frutos.

Plantas estressadas sem o tratamento de melatonina, também obtiveram um aumento significativo no teor de sacarose em botões florais (Figura 23), bem como uma maior assimilação de carbono comparadas as plantas não estressadas (Figura 13, 14 e 15). Todavia, essas mesmas plantas obtiveram uma queda na germinação

e comprimento do tubo polínico, bem como uma maior taxa de abortamento, resultando em menor taxa de retenção (Figura 25 e 26). Estudos afirmam que a assimilação de carbono de plantas de algodão é aumentada devido a danos ou perdas de flores por insetos (HOLMAN; OOSTERHUIS, 1999) ou remoção manual das mesmas (WELLS, 2001). Este fato pode estar atrelado a uma resposta adaptativa da cultura, a qual força seu mecanismo fotossintético, em resposta à perda de suas estruturas reprodutivas (ZHAO *et al.*, 2005). Respostas similares aos nossos resultados foram relatadas em plantas de algodão submetidas a combinação de estresse térmico e por luz (ZHAO *et al.*, 2005). Desta forma, mesmo havendo um acúmulo de sacarose, devido a um esforço no mecanismo fotossintético, estes não foram fatores suficientes para reter as estruturas produzidas, mediante o calor, sendo assim abortadas.

De forma contrária, plantas condicionadas as altas temperaturas e tratadas com melatonina obtiveram uma menor taxa de abortamento, bem como uma maior taxa de retenção de estruturas reprodutivas (Figura 26). Este fato pode estar ligado, em partes, ao acúmulo de sacarose, como citado anteriormente, devido a eficiência fotossintética (SNIDER *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2005). No qual demonstramos que a melatonina proporcionou uma maior assimilação de CO² e maior acúmulo de sacarose em botões florais (Figura 13, 15, 16 e 23). Outro fator que pode estar relacionada a promoção de retenção ocasionada pela melatonina, é a regulação hormonal entre citocina e ABA. O hormônio ABA, antagonista da melatonina e citocinina, está intimamente ligado com a indução de senescência (YANG *et al.*, 2002) de forma contrária da citocina, a qual proporciona ao retardamento da senescência (ZWACK *et al.*, 2013; MA *et al.*, 2016). Em estudo, Zhang *et al.* (2017) demonstra que a melatonina afetou a biossíntese e as vias de sinalização da citocinina, bem como do ABA, proporcionando uma queda na redução na senescência de folhas de centeio. Diversos trabalhos indicam a melatonina como um retardante de senescência (ZHANG *et al.*, 2017; MA *et al.*, 2018; YE *et al.*, 2020).

Portanto, sugestionamos que a retenção de estruturas em plantas estressadas e a queda na taxa de abortamento, estejam relacionadas ao mecanismo hormonal proporcionada pela melatonina. Ajustados com uma maior eficiência no aparato fotossintético, acarretando em um maior acúmulo de açúcares e um melhor desenvolvimento do tubo polínico, bem como um alívio nos danos oxidativos. Esta conjuntura de fatores positivos, através do uso da melatonina, alinhada com uma

estratégia adaptativa da planta em meio ao aumento de temperatura, proporcionou uma estratégia eficaz de sobrevivência e desenvolvimento. Assim, possibilitando uma melhor condição de vida durante e após o regime de estresse térmico e acarretando em ganho na produção final.

4.5 Conclusão

As aplicações foliares de melatonina reduziu os efeitos negativos da alta temperatura, na fisiologia, bioquímica e produção de plantas de algodão.

A melatonina proporcionou uma melhora na atividade fotossintética, esta que foi retardada e efetiva ao 5º dia de estresse. Mitigando os efeitos do estresse a longo prazo.

O tratamento com melatonina proporcionou um maior acúmulo de açúcares, redução nos danos oxidativos, melhora na germinação e desenvolvimento do grão de pólen, acarretando em uma melhora nas estruturas reprodutivas.

5 AÇÃO DA MELATONINA NO DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS DE ALGODÃO NO CAMPO

5.1 Objetivo

5.1.1 Objetivo geral

Avaliar os potenciais efeitos da aplicação exógena de melatonina na produção do algodoeiro.

5.1.2 Objetivo específico

Em condições de campo, avaliar o potencial efeito da melatonina na altura de planta, produtividade de caroço e fibra na cultura do algodoeiro

5.2 Materiais e Métodos

5.2.1 Caracterização da área de estudo

O experimento foi desenvolvido nas dependências da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), na Fazenda Experimental, localizada em Presidente Bernardes no estado de São Paulo, Brasil (22°11'53"S, 51°40'30"W, com altitude de 401m), no período de novembro / 2020 a maio /2021, totalizando 168 dias. O clima da região é tropical, com inverno seco (Aw – Köppen). O solo é classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo Distrófico de textura arenosa (SANTOS *et al.*, 2018). As características climáticas estão apresentadas na Figura 27, 28 e 29, e as características químicas do solo na Tabela 3. Foram registrados 40 dias com temperatura máxima acima de 35°C.

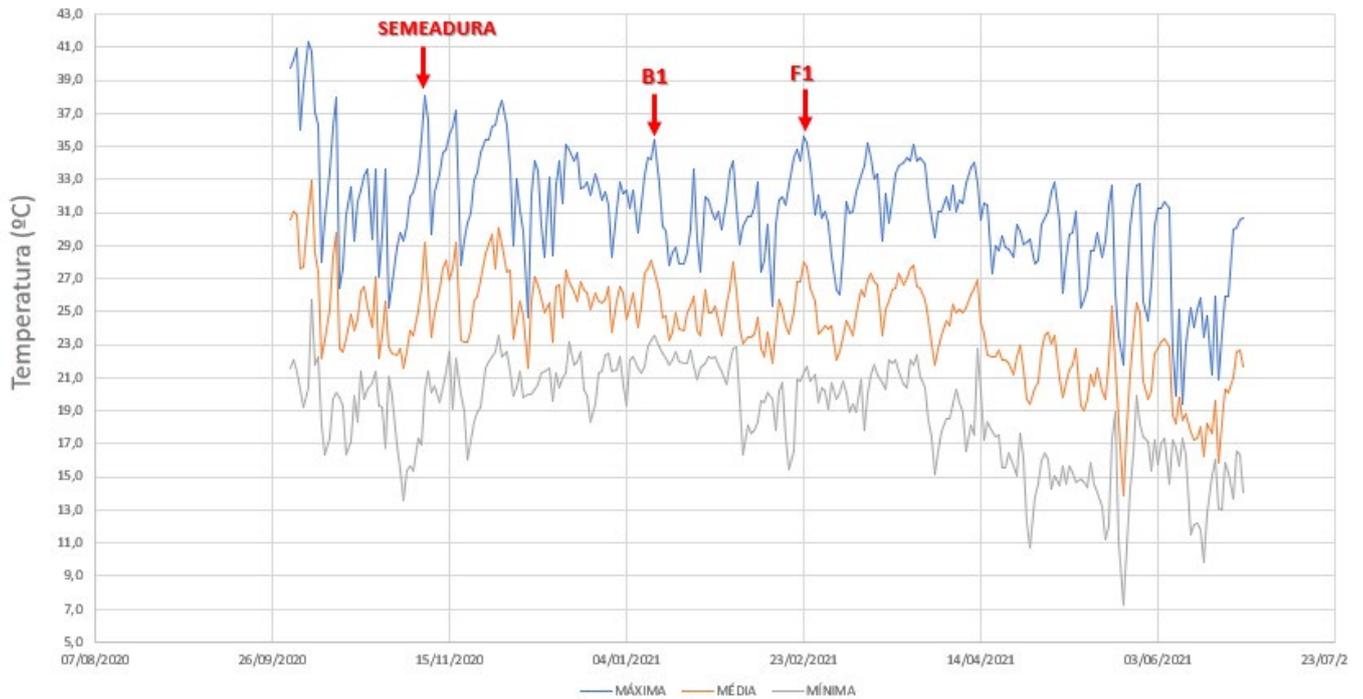


Figura 27 - Histórico da temperatura (°C) máxima, média e mínima durante condução do estudo. Presidente Bernardes, São Paulo, Brasil (Estação Meteorológica – Universidade do Oeste Paulista (Unoeste). 2020/2021.

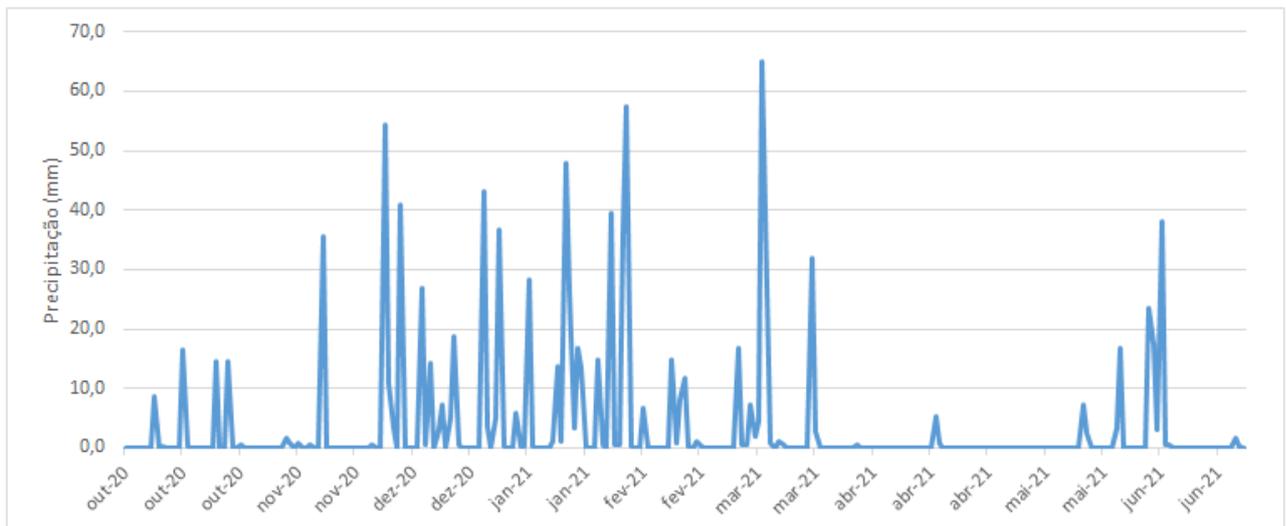


Figura 28 - Histórico precipitação (mm) durante condução do estudo. Presidente Bernardes, São Paulo, Brasil (Estação Meteorológica – Universidade do Oeste Paulista (Unoeste). 2020/2021

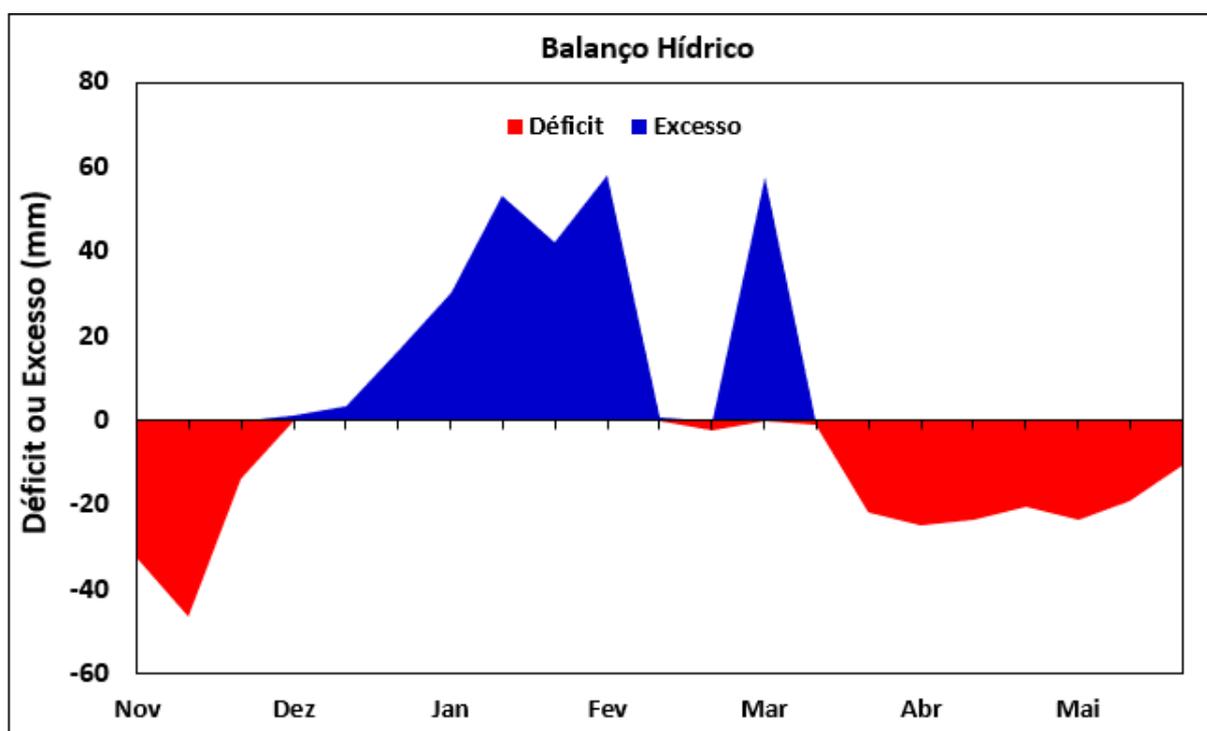


Figura 29 – Balanço hídrico (Déficit ou Excesso – (mm)) durante condução do estudo. Presidente Bernardes, São Paulo, Brasil (Estação Meteorológica – Universidade do Oeste Paulista (Unoeste). 2020/2021.

Tabela 2. Característica químicas do solo, antes da implantação da cultura.

Profundidade (cm)	pH (CaCl ₂)	M.O. g dm ⁻³	P (resina) mg dm ⁻³	S-SO ₄ ⁻² mg dm ⁻³	Al ³⁺ mmol _c dm ⁻³	(H+Al)	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	SB	CTC	V%
0-20	5,7	16,5	8,2	3,8	0	12,9	1,4	19,2	13,3	34	46,8	72,5
20-40	5,7	14,4	8,0	2,5	0	15,9	1,1	16,1	13,2	30,4	46,3	65,7
Profundidade (cm)	Boro	Cobre	Ferro	Manganês	Zinco							
	mg dm ⁻³											
0-20	0,17	0,5	21,5	1,7	0,4							
20-40	0,12	0,8	23,5	1,6	0,4							

5.2.2 Condução do experimento

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, sendo duas doses de melatonina (0 e 100 µM), com um cultivar de algodão (*Gossypium hirsutum*), TMG-44B2RF (Tropical Melhoramento e Genética, Cambé, PR – Brasil). Cada parcela foi composta por 4 linhas de algodão espaçadas em 0,8 m, com 7m de

comprimento, totalizando 22,4 m². Para as avaliações, foi considerado como área útil apenas as 2 linhas centrais, descartando 1m de bordadura de extremidade. Todos os manejos de correção e adubação de solo, de pragas, doenças e regulador de crescimento foram realizados de acordo com a necessidade da cultura, sendo o mesmo manejo para ambos tratamentos.

Foram realizadas aplicações de melatonina na fase fenológica B1 (primeiro botão floral visível 30 DAE). A segunda aplicação foi realizada na fase F1 (primeira flor branca). Foram realizadas coleta de plantas de algodão para determinação de altura de caule, número de capulhos, peso de capulho e massa seca de caule.

5.2.3 Avaliação biométrica e de produção

Foi realizada avaliação de altura de planta no seu estágio final, no dia da colheita. Por ocasião da colheita foram avaliados os componentes de produção (número de capulhos e peso médio do capulho) através da colheita e contagem de todos os capulhos da área útil. As amostras foram pesadas para obtenção do peso total, o qual foi dividido pelo número de capulhos, obtendo-se o peso médio do capulho. O peso total foi utilizado na estimativa da produtividade, em kg ha⁻¹ de algodão em caroço.

5.2.4 Análise estatística

Os resultados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA, p<0,05). A média dos valores foi comparada pelo teste de Tukey (p<0,05) com o programa SISVAR (5.1, Universidade Federal de Lavras).

5.3 Resultados

A avaliação da altura das plantas foi realizada ao final do ciclo da cultura, a qual, plantas submetidas ao tratamento de 100 µmol de melatonina obtiveram um aumento de 6cm, comparado ao tratamento de 0 µmol de melatonina (Figura 30).

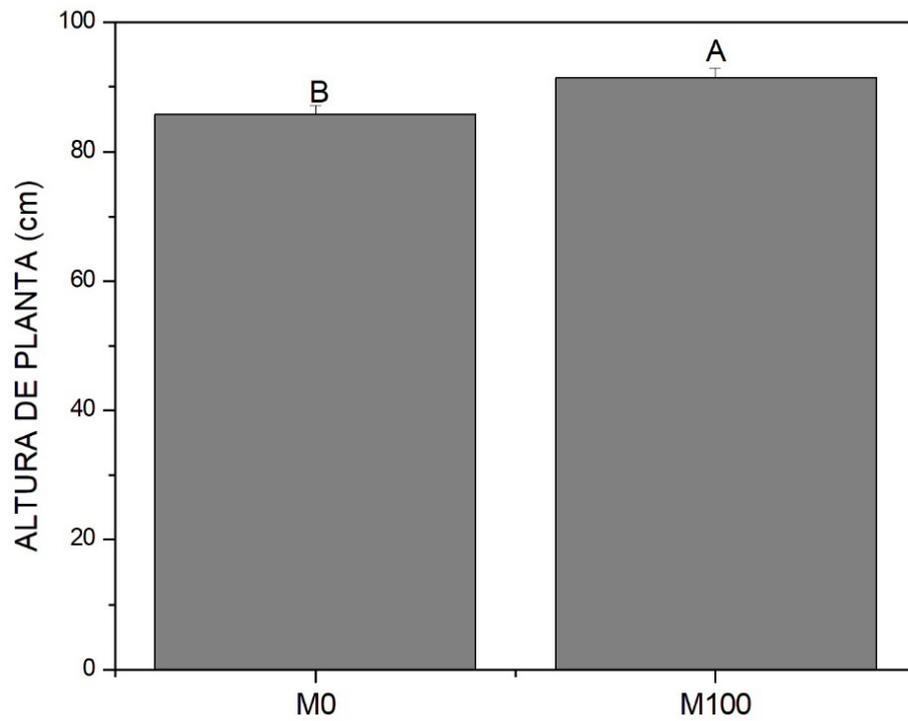


Figura 30 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μM) na altura de plantas de algodão. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses de melatonina.

O número de capulhos por metro quadrado (Figura 31 – A) aumentou 23% ($p < 0.05$), em plantas submetidas ao tratamento de 100 μmol de mel, comparadas ao tratamento controle. O peso médio de capulho não diferiu entre os tratamentos de 0 e 100 μmol de melatonina (Figura 31 – B).

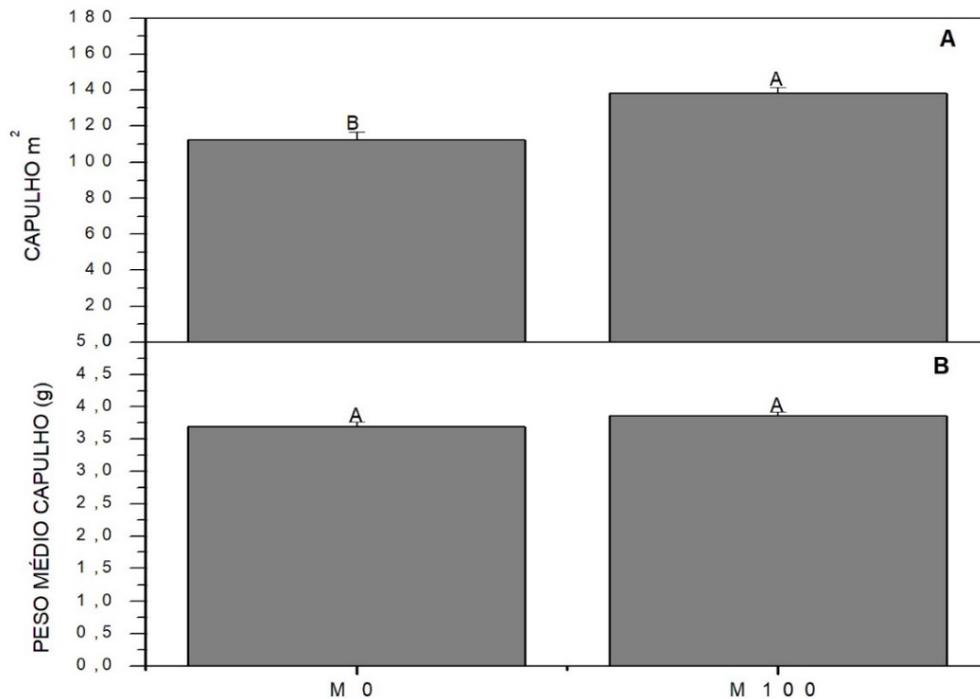


Figura 31 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μM) no número de capulho por metro quadrado (A) e no peso médio de capulho (B). Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses de melatonina.

O tratamento de 100 μmol de melatonina proporcionou um aumento de 17% na produtividade de fibra, comparadas ao tratamento de 0 μmol de mel (Figura 32 – A). Da mesma forma, a produtividade de caroço obteve um aumento de 18%, com o tratamento de 100 μmol de mel, comparada ao tratamento de 0 μmol de mel (Figura 32 – B).

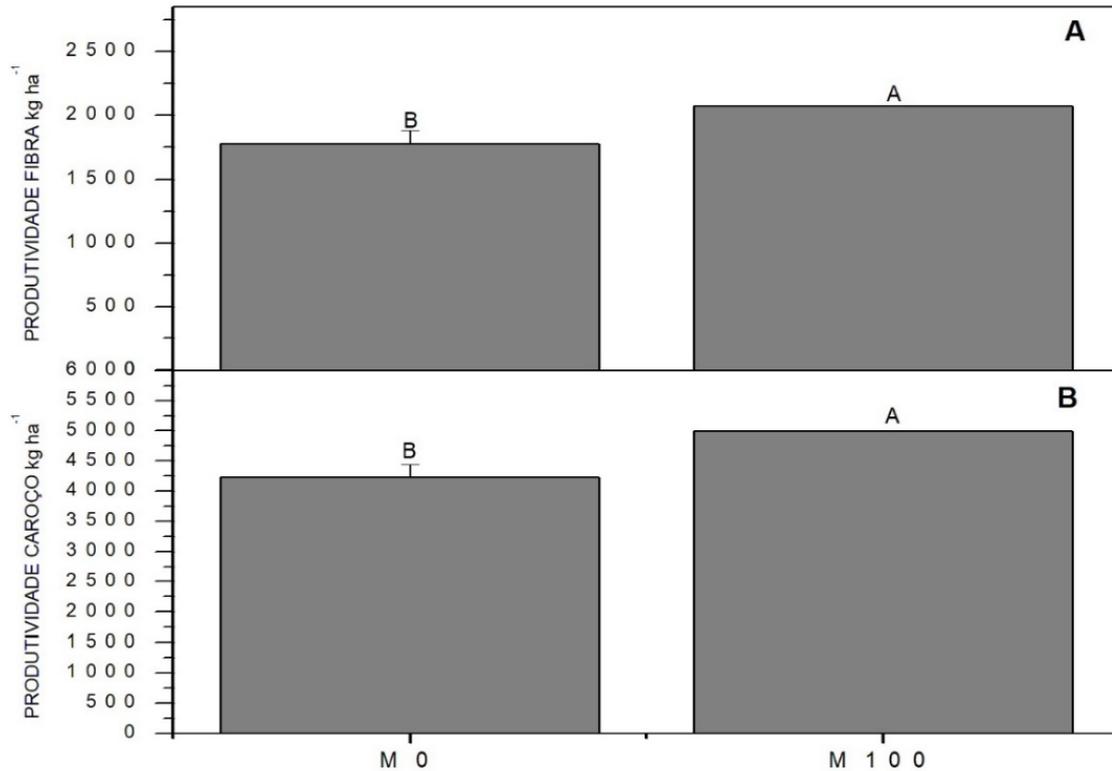


Figura 32 - Efeitos de diferentes concentrações de melatonina (μM) na produtividade de fibra (A) e na produtividade de caroço (B). Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses de melatonina.

5.4 Discussão

A cultura do algodão é cultivada em larga escala em diversas regiões com diferentes características climáticas. Grandes partes destas regiões apresentam picos de altas temperaturas, sendo 28°C considerado como temperatura ótima para a mesma. A produção do algodão é negativamente atingida por alta temperatura, sendo este um problema ambiental, incontrolável, que diminui a produtividade do algodão e a qualidade da fibra nos campos (ABRO *et al.*, 2015). Durante o desenvolvimento do estudo, foram registradas temperaturas acima dos 35°C , com duração de mais de 3 dias consecutivos, em diferentes estágios fenológicos. Este fator pode acarretar em perturbação no sistema fotossintético, danos em enzimas, produção de espécies reativas de oxigênio, levando ao abortamento de estruturas reprodutivas. Em nossos resultados, plantas sem o tratamento de melatonina obtiveram queda da produção de capulho (Figura 31) decorrendo em queda de produtividade (Figura 32), fator que pode estar atrelado a um aumento na taxa de

abortamento das mesmas, causadas por ondas de calor registradas no estudo (Figura 27).

A melatonina está intimamente ligada com a mitigação dos efeitos de estresse térmicos. Como relatado em nossos resultados anteriores, a mel tem uma melhor atuação sobre a retenção e abortamento, em plantas estressadas, no que plantas sem estresse (Figura 26). Através do metabolismo de açúcares, impulsionado pela eficiência fotossintética, a mel regula a distribuição de capulhos de algodão, bem como reduz a taxa de derramamento perante o estresse (KHATTAK *et al.*, 2021). Em nossos resultados foi possível observar que o uso da melatonina proporcionou regulação na altura da planta (Figura 30), aumento na produção de capulho (Figura 31), decorrendo em ganho na produtividade final (Figura 32), em condições de temperaturas acima da ideal (Figura 27). Em estudo similar, no qual foi realizada a aplicação foliar de 100 μ M em plantas de algodão com regime de suspensão hídrica, a mel proporcionou ganho na distribuição de capulho (KHATTAK *et al.*, 2021). Fato ocorrido através da regulação fisiológica por meio das trocas gasosas e aumento de expressão de genes reguladores de açúcares (KHATTAK *et al.*, 2021).

Também é claro que a melatonina pode se comportar como um regulador de crescimento, o qual melhora os processos fisiológicos das plantas, como melhora na eficiência fotossintética (WANG *et al.*, 2013), síntese de clorofila (WEEDA *et al.*, 2014), regulação de açúcares (HU *et al.*, 2020), promotora de enraizamento (ERLAND *et al.*, 2019), interação com outros hormônios (YE *et al.*, 2020; ARNAO *et al.*, 2021), dentre outros (XU *et al.*, 2016, CHEN *et al.*, 2020). Em nossos resultados foi possível observar que o tratamento com melatonina proporcionou um aumento na altura das plantas (Figura 30). Este fato pode estar atrelado ao efeito da melatonina sobre o aparato fotossintético (LI *et al.*, 2017), decorrendo em maior acúmulo de fotoassimilados que, possivelmente, foram direcionados para o crescimento e desenvolvimento das plantas.

É sabido que a produção mundial é dependente de boas condições climáticas, alinhadas com bom manejo. O bom desenvolvimento das plantas, mesmo em condições hostis, acarreta em maior ganho produtivo. A melatonina pode ser um novo meio para ser utilizado nas lavouras, promovendo a mitigação dos efeitos negativos das adversidades climáticas, bem como impulsionar a produção final. Os resultados deste trabalho sugerem que a aplicação da melatonina foliar durante a

fase de botão floral e iniciação da floração, melhorou o desempenho geral das plantas, acarretando em ganho de produtividade das culturas de algodão.

5.5 Conclusão

A melatonina, em condição de campo, promove maior produção de capulhos, bem como aumento na produtividade e de fibra e caroço de algodão, comparadas a plantas em mesma condição em aplicação.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em nossos estudos foi possível concluir que a utilização da melatonina possibilita melhora no crescimento e desenvolvimento de sementes e plantas de algodão, submetidas a alta temperatura. As doses ideais de melatonina se diferem perante o estágio fenológico, sendo doses intermediárias para sementes e doses mais altas para plantas. A aplicação de melatonina na fase de desenvolvimento floral, é crucial para o bom desenvolvimento das estruturas reprodutivas. De forma geral a mel proporciona maior acúmulo de biomassa, melhora nas trocas gasosas, age sobre a síntese e acúmulo de açúcares e reduz danos oxidativos. A melatonina tem forte ação sobre as condições de estresse térmico, promovendo redução no abortamento de estruturas reprodutivas, proporcionando ganho de produtividade. O estresse térmico afeta negativamente a fisiologia e bioquímica das plantas, nossos dados sugerem que a melatonina atua como um mitigador, diante do estresse térmico. Contudo, continuidade nos estudos da ação da melatonina nos parâmetros de crescimento e elucidação dos mecanismos desencadeados atenuadores de estresses são necessários.

REFERÊNCIAS

- ABRAPA. **Algodão no Brasil - Safra 2018/2019**. Disponível em: <https://www.abrapa.com.br/Paginas/dados/algodao-no-brasil.aspx>. Acesso em: 20 set. 2021.
- SAIFULLAH, A. *et al.* Screening of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) genotypes for heat tolerance. **Pakistan Journal of Botany**, v. 47, n. 6, p. 2085-2091, 2015.
- AHAMMED, G.J. *et al.* Endogenous melatonin deficiency aggravates high temperature-induced oxidative stress in *Solanum lycopersicum* L. **Environmental and Experimental Botany**, v. 161, p. 303-311, 2019.
- AHMAD, S. *et al.* Exogenous melatonin confers drought stress by promoting plant growth, photosynthetic capacity and antioxidant defense system of maize seedlings. **Peer Journals**, v. 7, p. e7793, 2019.
- ANTONIOU, C. *et al.* Melatonin systemically ameliorates drought stress-induced damage in *Medicago sativa* plants by modulating nitro-oxidative homeostasis and proline metabolism. **Journal of Pineal Research**, v. 62, n. 4, p. e12401, 2017.
- ARNAO, M.B.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J. Protective effect of melatonin against chlorophyll degradation during the senescence of barley leaves. **Journal of Pineal Research**, v. 46, n. 1, p. 58-63, 2009.
- ARNAO, M.B.; HERNANDEZ-RUIZ, J. Melatonin and its relationship to plant hormones. **Annals of Botany**, v. 121, n. 2, p. 195-207, 2017.
- ARNAO, M.B.; HERNANDEZ-RUIZ, J. Melatonin and reactive oxygen and nitrogen species: a model for the plant redox network. **Melatonin Research**, v. 2, n. 3, p. 152-168, 2019.
- ARNAO, M.B.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J. Melatonin as a regulatory hub of plant hormone levels and action in stress situations. **Plant Biology**, v. 23, p. 7-19, 2021.
- ASADA, K. Production and scavenging of active oxygen in chloroplasts. **Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems**, p.173-192, 1992.
- BHATNAGAR-MATHUR, P.; VADEZ, V.; SHARMA, K.K. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 3, p. 411-424, 2008.
- BLEISS, W.; EHWALD, R. Transient changes in length and growth of wheat coleoptile segments following treatments with osmotica and auxin. **Plant Physiology**, v. 88, n. 4, p. 541-548, 1993.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009.

BIBI, A.C.; OOSTERHUIS, D.M.; GONIAS, E.D. Photosynthesis, quantum yield of photosystem II and membrane leakage as affected by high temperatures in cotton genotypes. **Journal of Cotton Science**, v.12, p. 150-159, 2008.

BOR, M.; ÖZDEMİR, F.; TURKAN, I. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. **Journal of Plant Sciences**, v. 164, p. 77–84, 2003.

BURKE, J.J.; MAHAN, J.R.; HATFIELD, J.L. Crop-specific thermal kinetic windows in relation to wheat and cotton biomass production. **Agronomy Journal**, v. 80, n. 4, p. 553-556, 1988.

BURKE, J.J. Variation among species in the temperature dependence of the reappearance of variable fluorescence following illumination. **Plant Physiology**, v. 93, n. 2, p. 652-656, 1990.

BURKE, J.J.; VELTEN, J.; OLIVER, M.J. In vitro analysis of cotton pollen germination. **Agronomy Journal**, v.96, n.2, p.359-368, 2004.

BYEON, Y.; BACK, K. Melatonin synthesis in rice seedlings in vivo is enhanced at high temperatures and under dark conditions due to increased serotonin N-acetyltransferase and N-acetylserotonin methyltransferase activities. **Journal of Pineal Research**, v.56, n.2, p.189-195, 2014.

CAO, L.; JIN, X. J.; ZHANG, Y.X. Melatonin confers drought stress tolerance in soybean (*Glycine max* L.) by modulating photosynthesis, osmolytes, and reactive oxygen metabolism. **Photosynthetica**, v.57, n.3, p.812-819, 2019.

CHEN, L.I. *et al.* Exogenous melatonin promotes seed germination and osmotic regulation under salt stress in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plos One**, v.15, n.1, p.e0228241, 2020.

CHEN, Q. *et al.* Exogenously applied melatonin stimulates root growth and raises endogenous indoleacetic acid in roots of etiolated seedlings of *Brassica juncea*. **Journal Plant Physiology**, v. 166, p. 324–328, 2009.

CHINNUSAMY, V. *et al.* Small RNAs: big role in abiotic stress tolerance of plants. *In: Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant Crops*. Dordrecht: Springer, 2007. p. 223-260.

CHIAVEGATO, E.J.; SALVATIERRA, D.K.; GOTTARDO, L.C.B. **Agrometeorologia dos cultivos**: o fator meteorológico na produção agrícola. Brasília: INMET, 2009.

CLÉMENT, M. *et al.* The cytosolic/nuclear HSC70 and HSP90 molecular chaperones are important for stomatal closure and modulate abscisic acid-dependent physiological responses in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 156, n. 3, p. 1481-1492, 2011.

CONAB. **Acompanhamento safra brasileira de grãos – Safra 2018/2019**. Brasília, 2022. v. 6, p.11-26.

CONATY, W.C. *et al.* Determining the optimum plant temperature of cotton physiology and yield to improve plant-based irrigation scheduling. **Crop Science**, v.52, n.4, p.1828- 1836, 2012.

CONATY, W.C. *et al.* The relationship between cotton canopy temperature and yield, fibre quality and water-use efficiency. **Field Crops Research**, v. 183, p. 329- 341, 2015.

CRAFTS-BRANDNER, S. J.; SALVUCCI, M. E. Rubisco activase constrains the photosynthetic potential of leaves at high temperature and CO₂. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 24, p. 13430-13435, 2000.

CUI, G. *et al.* Beneficial effects of melatonin in overcoming drought stress in wheat seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 118, p. 138-149, 2017.

DEEBA, F. *et al.* Physiological and proteomic responses of cotton (*Gossypium herbaceum* L.) to drought stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 53, p. 6-18, 2012.

DE MAIO, A. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. **Shock**, v.11, n.1, p.1-12, 1999.

ECHER, F. R. **O algodoeiro e os estresses abióticos**: temperatura, luz, água e nutrientes. Embrapa Agropecuária Oeste-Outras publicações científicas (ALICE), 2014.

ERLAND, L. A.; SAXENA, P. K.; MURCH, S. J. Melatonin in plant signalling and behaviour. **Functional Plant Biology**, v. 45, n. 2, p. 58-69, 2019.

ERLAND, L.A. *et al.* A new balancing act: the many roles of melatonin and serotonin in plant growth and development. **Plant Signal Behav**, v. 10, p. 11, 2015.

FINKELSTEIN, R. R.; GAMPALA, S. S.; ROCK, C. D. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. **The Plant Cell**, v.14, n.(suppl 1), p.S15-S45, 2002.

FISCHER, T.W. *et al.* Melatonin enhances antioxidative enzyme gene expression (CAT, GPx, SOD), prevents their UVR-induced depletion and protects against the formation of DNA damage (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in ex vivo human skin. **Journal of Pineal Research**, v. 54, p. 303–312, 2013.

GALANO, A.; TAN, D.X.; REITER, R.J. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. **Journal of Pineal Research**, v. 54, p. 245–257, 2013

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide Dismutases II. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in Seedlings. **Plant Physiology**, n. 59, p. 315-318, 1977.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 5, n. 1, p. 26-33, 2010.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GILL, S. S. *et al.* Amelioration of cadmium stress in crop plants by nutrients management: morphological, physiological and biochemical aspects. **Plant Stress**, v.5, n.1, p.1-23, 2011.

GITTO, E. *et al.* Individual and synergistic antioxidative actions of melatonin: studies with vitamin E, vitamin C, glutathione and desferrioxamine (desferoxamine) in rat liver homogenates. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, p. 1393– 401, 2001.

GRAHAM, M. Y. The diphenylether herbicide lactofen induces cell death and expression of defense-related genes in soybean. **Plant Physiology**, v. 130, p. 1784-1794, 2005.

HASANUZZAMAN, M. *et al.* Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 5, p. 9643-9684, 2013.

HATFIELD, J. L.; BURKE, J. J. Energy exchange and leaf temperature behavior of three plant species. **Environmental and Experimental Botany**, v. 31, n. 3, p. 295-302, 1991.

HAHN, A. *et al.* Crosstalk between Hsp90 and Hsp70 chaperones and heat stress transcription factors in tomato. **The Plant Cell**, v. 23, n. 2, p. 741-755, 2011.

HASANUZZAMAN, M. *et al.* Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defense is a key factor. *In*: **Crop stress and its management: Perspectives and strategies**. Dordrecht: Springer, 2012. p.261-315.

HASSANPOUR, H. *et al.* Effects of penconazole and water deficit stress on physiological and antioxidative responses in pennyroyal (*Mentha pulegium* L.). **Acta Physiol Plant**, v. 34, p. 1537–1549, 2012.

HALL, A.E. **Heat stress and its impact (online)**. Riverside: Department Botany and plant science, University of California, 2004.

HAUVERMALE, A. L. *et al.* Loss of *Arabidopsis thaliana* seed dormancy is associated with increased accumulation of the GID1 GA hormone receptors. **Plant and Cell Physiology**, v. 56, n. 9, p. 1773-1785, 2015.

HEJNÁK, V. *et al.* Growth and photosynthesis of Upland and Pima cotton: response to drought and heat stress. **Plant, Soil and Environment**, v. 61, n. 11, p. 507-514, 2015.

HERNANDEZ-RUIZ, J.; CANO, A.; ARNAO, M. B. Melatonin: a growth-stimulating compound present in lupin tissues. **Planta**, v. 220, n. 1, p. 140-144, 2004.

HERNÁNDEZ, I. G. *et al.* Melatonin in *Arabidopsis thaliana* acts as plant growth regulator at low concentrations and preserves seed viability at high concentrations. **Plant physiology and Biochemistry**, v. 94, p. 191-196, 2015.

HU, W. *et al.* Exogenous melatonin improves cotton (*Gossypium hirsutum* L.) pollen fertility under drought by regulating carbohydrate metabolism in male tissues. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 151, p. 579-588, 2020.

HU, W. *et al.* Drought limits pollen tube growth rate by altering carbohydrate metabolism in cotton (*Gossypium hirsutum*) pistils. **Plant Science**, v. 286, p. 108-117, 2019.

HU, W. *et al.* Oosterhuis. Effects of potassium deficiency on antioxidant metabolism related to leaf senescence in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Field Crops Research**, v. 191, n. 2016, p. 139-149, 2016.

JANAS, K.; POSMYK, M. Melatonin, an underestimated natural substance with great potential for agricultural application. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, p. 3285–3292, 2013.

JAHAN, M. S. *et al.* Melatonin pretreatment confers heat tolerance and repression of heat-induced senescence in tomato through the modulation of ABA-and GA-mediated pathways. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 381, 2021.

JANSKÁ, A. *et al.* Cold stress and acclimation—what is important for metabolic adjustment?. **Plant Biology**, v. 12, n. 3, p. 395-405, 2010.

KANG, K. *et al.* A produção aumentada de melatonina por superexpressão ectópica da serotonina N-acetiltransferase humana desempenha um papel na resistência ao frio em mudas de arroz transgênico. **Journal of Pineal Research**, v. 49, n. 2, p. 176-182, 2010.

KANG, K. *et al.* Molecular cloning of a plant N-acetylserotonin methyltransferase and its expression characteristics in rice. **Journal of Pineal Research**, v. 50, n. 3, p. 304-309, 2011.

KAKANI, V. G. *et al.* Differences in in vitro pollen germination and pollen tube growth of cotton cultivars in response to high temperature. **Annals of Botany**, v. 96, n. 1, p. 59-67, 2005.

KHATTAK, W. A. *et al.* Foliar melatonin stimulates cotton boll distribution characteristics by modifying leaf sugar metabolism and antioxidant activities during drought conditions. **Physiologia Plantarum**, v. 174, n. 1, p. e13526, 2022.

KUMARATHUNGE, D. P. *et al.* Acclimation and adaptation components of the temperature dependence of plant photosynthesis at the global scale. **New Phytologist**, v. 222, n. 2, p. 768-784, 2019.

KOSHIBA, T.; MATSUYAMA, H. An in vitro system of indole-3-acetic acid formation from tryptophan in maize (*Zea mays*) coleoptile extracts. **Plant Physiology**, v. 102, n. 4, p. 1319-1324, 1993

KRASENSKY, J.; JONAK, C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 4, p. 1593-1608, 2012.

KUREK, I. *et al.* Enhanced thermostability of Arabidopsis Rubisco activase improves photosynthesis and growth rates under moderate heat stress. **The Plant Cell**, v. 19, n. 10, p. 3230-3241, 2007.

LAW, D.R.; LAW, S.J.; CRAFTS-BRANDNER, M.E. Salvucci Heat stress induces the synthesis of a new form of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase in cotton leaves. **Planta**, v. 214, 2001.

LI, C. *et al.* Hypoxia tolerance and adaptation of anaerobic respiration to hypoxia stress in two *Malus* species. **Scientia Horticulturae**, v.124, p. 274–279, 2009.

LI, C. *et al.* Melatonin mediates the regulation of ABA metabolism, free-radical scavenging, and stomatal behaviour in two *Malus* species under drought stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 3, p. 669-680, 2015.

LI, H. *et al.* Exogenous melatonin confers salt stress tolerance to watermelon by improving photosynthesis and redox homeostasis. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 295, 2017.

LIANG, D. *et al.* Exogenous melatonin promotes biomass accumulation and photosynthesis of kiwifruit seedlings under drought stress. **Scientia Horticulturae**, v. 246, p. 34-43, 2019.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec. 2001.

LOKA, D. A.; D. M. OOSTERHUIS. Effect of high night temperatures on cotton respiration, ATP levels and carbohydrate content. **Environmental and Experimental Botany**, v. 68, p. 258–263, 2010.

LOBELL, D. B.; FIELD, C. B. Global scale climate–crop yield relationships and the impacts of recent warming. **Environmental Research Letters**, v. 2, n. 1, p. 014002, 2007.

MAGUIRE, J. D. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Cropping Science**, v. 2, p. 176-7, 1962.

MA, X.; ZHANG, J.; HUANG, B. A mitigação da citocina da senescência da folha induzida pelo sal na grama perene envolvendo a ativação de sistemas antioxidantes e equilíbrio iônico. **Botânica Ambiental e Experimental**, v. 125, p. 1-11, 2016.

MA, X. *et al.* Interactive effects of melatonin and cytokinin on alleviating drought-induced leaf senescence in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*).

Environmental and Experimental Botany, v. 145, p. 1-11, 2018.

MAHAN, J. R. *et al.* Irrigation scheduling using biologically-based optimal temperature and continuous monitoring of canopy temperature. **Acta Horticulturae**, v. 537, n. 1, p. 375- 381, 2000.

MENG, J. F. *et al.* The ameliorative effects of exogenous melatonin on grape cuttins under waterdeficient stress: antioxidant metabolites, leaf anatomy, and chloroplast morphology. **Journal of Pineal Research**, v. 57, p. 200-212, 2014.

MILIĆ, B. *et al.* Bioregulators can improve fruit size, yield and plant growth of northern highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 235, p. 214-220, 2018.

MILLER, G.; SHULAEV, V.; MITTLER, R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. **Physiologia Plantarum**, v. 133, n. 3, p. 481-489, 2008.

MILLER, G. A. D. *et al.* Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. **Plant, Cell & Environment**, v. 33, n. 4, p. 453-467, 2010.

MURCH, S. J.; CAMPBELL, S. S.; SAXENA, P. K. The role of serotonin and melatonin in plant morphogenesis: regulation of auxin-induced root organogenesis in in vitro-cultured explants of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 37, n. 6, p. 786-793, 2001.

MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. Melatonin: a potential regulator of plant growth and development? **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 38, n. 6, p. 531-536, 2002.

NAKAGAWA, J. Teste de vigor baseados no desempenho das plântulas. *In*: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J.B. (eds.) **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999.

OHAMA, N. *et al.* Transcriptional regulatory network of plant heat stress response. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 1, p. 53-65, 2017.

OSANAI, Y. *et al.* Plant-soil interactions and nutrient availability determine the impact of elevated CO₂ and temperature on cotton productivity. **Plant and Soil**, v. 410, n. 1-2, p. 87-102, 2017.

PASALA, R. K. *et al.* Can plant bio-regulators minimize crop productivity losses caused by drought, heat and salinity stress? An integrated review. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 89, 2016.

POWELL, R. D. Effect of temperature on boll set and development of *Gossypium hirsutum*. **Cotton Growing Review**, v. 46, p. 29–36, 1969.

- RAMAKERS, C. *et al.* Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, n. 1, p. 62-66, mar. 2003.
- REHMAN, M. U. *et al.* Effect of some plant bioregulators on fruit yield and quality characteristics of apple cv. Red Delicious. *International Journal of Minor Fruits, Medicinal and Aromatic Plants*, v. 4, n. 1, p. 33-39, 2018.
- REDDY, V. R.; BAKER, D. N.; HODGES, H. F. Temperature effects on cotton canopy growth, photosynthesis, and respiration. **Agronomy Journal**, v. 83, n. 4, p. 699-704, 1991.
- REDDY, A. R.; CHAITANYA, K. V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, n. 11, p. 1189-1202, 2004.
- REDDY, K. R.; HODGES, H. F.; REDDY, V. R. Temperature effects on cotton fruit retention. **Agronomy Journal**, v. 84, n. 1, p. 26-30, 1992.
- RIVAS-SAN VICENTE, M.; PLASENCIA, J. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 10, p. 3321-3338, 2011.
- RODRIQUEZ, C. *et al.* Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. **Journal of Pineal Research**, v. 36, p. 1-9, 2004.
- RODZIEWICZ, P. *et al.* Influence of abiotic stresses on plant proteome and metabolome changes. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, n. 1, p. 1-19, 2014.
- SABLE, A. *et al.* Inhibition of Heat Shock proteins HSP90 and HSP70 induce oxidative stress, suppressing cotton fiber development. **Scientific Eports**, v. 8, n. 1, p. 3620, 2018.
- SANTOS, H.G. *et al.* **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 5. ed. Revista e Ampliada. Brasília: EMBRAPA, 2018.
- SARROU, E.; THERIOS, I.; DIMASSI-THERIOU, K. Melatonin and other factors that promote rooting and sprouting of shoot cuttings in *Punica granatum* cv. Wonderful. Turkish. **Journal of Botany**, v. 38, p. 293–301, 2014.
- SINGH, R. P. *et al.* Influence of high temperature and breeding for heat tolerance in cotton: a review. **Advances in Agronomy**, v. 93, p. 313-385, 2007.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 2, p. 221-227, 2007.
- SNIDER, J. L. *et al.* Heat stress-induced limitations to reproductive success in *Gossypium hirsutum*. **Physiologia Plantarum**, v. 137, n. 2, p. 125-138, 2009.

SONG, Y. *et al.* Target of Rapamycin (TOR) regulates the expression of lncRNAs in response to abiotic stresses in cotton. **Frontiers in Genetics**, v. 9, p. 690, 2019.

STEWART, J.M.C.D. Integrated events in the flower and fruit. *In*: MAUNEY, J. R.; STEWART, J.M.C.D. (eds). **Cotton physiology**. Memphis, USA: The Cotton Foundation, 1986. p. 261–300.

SRIVASTAVA, A. K. *et al.* Plant bioregulators for sustainable agriculture: integrating redox signaling as a possible unifying mechanism. *In*: **Advances in agronomy**. Academic Press, 2016. p. 237-278.

SZAFRANSKA, K.; GLINSKA, S.; JANAS, K. M. Ameliorative effect of melatonin on meristematic cells of chilled and re-warmed *Vigna radiata* roots. **Biologia Plantarum**, v. 57, p. 91–96, 2013.

SZAFRANSKA, K.; GLINSKA, S.; JANAS, K. M. Changes in the nature of phenolic deposits after re-warming as a result of melatonin pre-sowing treatment of *Vigna radiata* seeds. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, p. 34–40, 2012.

TAN, D. X. *et al.* One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? **Journal of Pineal Research**, v. 42, n. 1, p. 28-42, 2007.

TAN, D.-X. *et al.* The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 8, p. 607–623, 2010.

TAN, D.X. *et al.* Functional roles of melatonin in plants and perspectives in nutritional and agricultural science. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 577–597, 2012.

TAN, D.X. *et al.* Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: a hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes. **Journal of Pineal Research**, v. 54, p. 127–138, 2013.

TAVARES, L.C. *et al.* Desempenho de sementes de soja sob deficiência hídrica: rendimento e qualidade fisiológica da geração F1. **Ciência Rural**, v. 43, n. 8, p. 1357-1363, 2013.

TIRYAKI, I.; KELES, H. Reversal of the inhibitory effect of light and high temperature on germination of *Phacelia tanacetifolia* seeds by melatonin. **Journal of Pineal Research**, v. 52, n. 3, p. 332-339, 2012.

UNTERGASSER, A. *et al.* Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. 71-74, jul. 2007.

USDA-FAS. **Production, supply and distribution online**. Washington: USDA-FAS, 2019. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/advQuery> . Acesso em: set. 2019).

VALLIYODAN, B.; NGUYEN, H. T. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 2, p. 189-195, 2006.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, v. 151, n. 1, p. 59-66, 2000.

VLOT, A.C.; DEMPSEY, D.M.A.; KLESSIG, D.F. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Ann. Rev. Phytopathology*, v. 47, p. 177-206, 2009.

VITALINI, S. *et al.* Melatonin, melatonin isomers and stilbenes in Italian traditional grape products and their antiradical capacity. **Journal of Pineal Research**, v. 54, p. 322–333, 2013.

WANG, P. *et al.* Delayed senescence of apple leaves by exogenous melatonin treatment: toward regulating the ascorbate–glutathione cycle. **Journal of Pineal Research**, v. 53, n. 1, p. 11-20, 2012.

WANG, P. *et al.* Long-term exogenous application of melatonin delays drought-induced leaf senescence in apple. **Journal of Pineal Research**, v. 54, n. 3, p. 292-302, 2013.

WANG, L. *et al.* Plant mitochondria synthesize melatonin and enhance the tolerance of plants to drought stress. **Journal of Pineal Research**, v. 63, n. 3, p. e12429, 2017.

WANG, L. *et al.* Plant mitochondria synthesize melatonin and enhance the tolerance of plants to drought stress. **Journal of Pineal Research**, v. 63, n. 3, p. e12429, 2017.

WANG, Q. *et al.* Small RNA-mediated responses to low- and high-temperature stresses in cotton. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-14, 2016.

WANG, Y.; REITER, R. J.; CHAN, Z. Phytomelatonin: a universal abiotic stress regulator. **Journal of Experimental Botany**, v. 69, n. 5, p. 963-974, 2017.

WEEDA, S. *et al.* Arabidopsis transcriptome analysis reveals key roles of melatonin in plant defense systems. **PLoS one**, v. 9, n. 3, p. e93462, 2014.

WEI, W. *et al.* Melatonin enhances plant growth and abiotic stress tolerance in soybean plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 3, p. 695-707, 2014.

WEITBRECHT, K.; MÜLLER, K.; LEUBNER-METZGER, G. First off the mark: early seed germination. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 10, p. 3289-3309, 2011.

WEI, W. *et al.* Melatonin enhances plant growth and abiotic stress tolerance in soybean plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 3, p. 695-707, 2014.

WEI, W. *et al.* Melatonin enhances plant growth and abiotic stress tolerance in soybean plants. **Jornar of Experimental Botany**, v. 66, p. 695-707, 2015

WENDEL, J. F.; BRUBAKER, C. L.; SEELANAN, T. The origin and evolution of Gossypium. *In: Physiology of cotton*. Dordrecht: Springer, 2010. p. 1-18.

WISE, R. R. *et al.* Electron transport is the functional limitation of photosynthesis in field-grown Pima cotton plants at high temperature. **Plant, Cell & Environment**, v. 27, n. 6, p. 717-724, 2004.

XIAO, S. *et al.* Exogenous melatonin accelerates seed germination in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **PloS One**, v. 14, n. 6, p. e0216575, 2019.

XU, W. *et al.* Melatonin enhances thermotolerance by promoting cellular protein protection in tomato plants. **Journal of Pineal Research**, v. 61, n. 4, p. 457- 469, 2016.

YANG, J. *et al.* Abscisic acid and cytokinins in the root exudates and leaves and their relationship to senescence and remobilization of carbon reserves in rice subjected to water stress during grain filling. **Planta**, v. 215, n. 4, p. 645-652, 2002.

YANG, L. *et al.* Melatonin promotes Arabidopsis primary root growth in an IAA-dependent manner. **Journal of Experimental Botany**, v. 72, n. 15, p. 5599-5611, 2021.

YE, J. *et al.* Seed pre-soaking with melatonin improves wheat yield by delaying leaf senescence and promoting root development. **Agronomy**, v. 10, n. 1, p. 84, 2020.

YU, J. *et al.* CottonGen: a genomics, genetics and breeding database for cotton research. **Nucleic Acids Research**, v. 42, D1229-1236, 2014.

YUE, C. *et al.* Expression patterns of alpha-amylase and beta-amylase genes provide insights into the molecular mechanisms underlying the responses of tea plants (*Camellia sinensis*) to stress and postharvest processing treatments. **Planta**, v. 250, n. 1, p. 281-298, 2019.

ZHAO, C. *et al.* Temperature increase reduces global yields of major crops in four independent estimates. **ProceedinGs of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 35, p. 9326-9331, 2017.

ZHAO, D. *et al.* Physiological causes of cotton fruit abscission under conditions of high temperature and enhanced ultraviolet-B radiation. **Physiologia Plantarum**, v. 124, n. 2, p. 189-199, 2005.

ZHAO, H. *et al.* Unveiling the mechanism of melatonin impacts on maize seedling growth: sugar metabolism as a case. **Journal of Pineal Research**, v. 59, n. 2, p. 255-266, 2015.

ZHANG, T. *et al.* Sequencing of allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L. acc. TM-1) provides a resource for fiber improvement. **Nature Biotechnology**, v. 33, p. 531–537, 2015. doi: 10.1038/nbt.3207

ZHANG, L. *et al.* Production of transgenic *Nicotiana sylvestris* plants expressing melatonin synthetase genes and their effect on UV-B-induced DNA damage. **In Vitro Cellular and Developmental BiologyPlant**, v. 48, p. 275–282, 2012.

ZHANG, N.A. *et al.* Melatonin promotes water-stress tolerance, lateral root formation, and seed germination in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Journal of Pineal Research**, v. 54, n. 1, p. 15-23, 2013.

ZHANG, N. *et al.* Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 3, p. 647-656, 2015.

ZHANG, N. *et al.* The RNA-seq approach to discriminate gene expression profiles in response to melatonin on cucumber lateral root formation. **Journal of Pineal Research**, v. 56, p. 39–50, 2014.

ZHANG, J. *et al.* Melatonin suppression of heat-induced leaf senescence involves changes in abscisic acid and cytokinin biosynthesis and signaling pathways in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). **Environmental and Experimental Botany**, v. 138, p. 36-45, 2017.

ZOU, J. N. *et al.* Effects of melatonin on photosynthesis and soybean seed growth during grain filling under drought stress. **Photosynthetica**, v. 57, n. 2, p. 512-520, 2019.

ZWACK, P. J.; RASHOTTE, A. M. Cytokinin inhibition of leaf senescence. **Plant Signaling & Behavior**, v. 8, n. 7, p. e24737, 2013.