UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ- UESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

"Estudo funcional do gene *EucXET*, potencialmente envolvido na tolerância ao estresse abiótico, em plantas transformadas de *Nicotiana tabacum*"

MARIA TERESA AGUILAR QUISBERT

LHÉUS – BAHÍA – BRASIL
Marco 2020

MARIA TERESA AGUILAR QUISBERT

"Estudo funcional do gene *EucXET*, potencialmente envolvido na tolerância ao estresse abiótico, em plantas transformadas de *Nicotiana tabacum*"

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular.
Linha de pesquisa: Estudo funcional de genes.

Orientadora: Prof. Dra. Fátima Cerqueira Alvim

Co- Orientador: Prof. Dr. Carlos Priminho Pirovani

ILHÉUS – BAHÍA – BRASIL

Março 2020

MARIA TERESA AGUILAR QUISBERT

"Estudo funcional dogene *EucXET*, potencialmente envolvido na tolerância ao estresse abiótico, em plantas transformadas de *Nicotiana tabacum*"

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular.

APROVADA: 27 de março de 2020

Drª Bruna Carmo Regem
(IFBA)

Drª Virginia Fontes Soares
(UESC)

Drª Milena Amaral
(UESC)

Drª Fátima Cerqueira Alvim
(UESC – ORIENTADORA)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tantas oportunidades, pela vida, pelo amor que tem por mim, por mais uma etapa concluída e pela força e coragem concedida para finalizar esse trabalho.

A minha família por tanto amor e apoio. A meus pais Teresa e Wilfredo que são mia força. A meus irmãos Pablo, Gabriela, pela alegria e paciência.

As amizades tão importantes, que nos impulsionam e nos ajudam a ser melhor Flávio, Grazielle, Thaynara, saibam que sem vocês nada seria possível, serei eternamente grata!

A minha Família no Brasil, a meus irmãos estrangeiros Guisela, Ivanna, Jose Luis, Julio, Yuliana, obrigada pelo apoio e a paciência.

A minha orientadora Drª. Fátima Alvim por todas as oportunidades, suporte, confiança, orientação e paciência. E ao co-orientador, Dr. Carlos Priminho Pirovani, por me fornecer o suporte e por todo apoio concedido.

A todos os colegas do Laboratorio de Cultura de Tecidos (LCT) e Proteômicos, do Centro de Genética e Biotecnologia (CBG), por facilitar o desenvolvimento da pesquisa.

À OEA-CAPES, pela concessão da bolsa.

E a todos que fizeram parte dessa conquista. GRATIDÃO!

DEDICATORIA

Por brindarme el cariño, infinito amor y apoyo incondicional,
A mi papi Willy y a mi mami Teresa por ser el ejemplo de amor lealtad y compromiso.
A mis hermanos Pablo y Gabriela por su alegría, y confianza, por siempre creer en mí.
A Pinpon, por ser mi compañero incondicional y brindarme el amor y ternura gatuna que alegra mis días.

INDICE

EXTRATO..... vi
ABSTRACT..... vii

1. INTRODUÇÃO..... 1
2. REVISÃO DE LITERATURA..... 3
2.1. Estresse abiótico..... 3
2.2. Parede celular 4
2.2.1. Plasticidade e Remodelamento..... 5
2.2.2. Resposta ao estresse abiótico – osmótico 6
2.3. Genes de xyloglucan endo-transglycosylase/ hydrolase (XTH)..... 7
2.3.1. Enzimas Xiloglucan endotrasglicosilase/ hidrolase 8
2.3.2. EucXET..... 9
3. HIPOTESE 11
***4.* OBJETIVO** 11
4.1. Objetivo Geral..... 11
4.2. Objetivos específicos 11
5. MATERIAL E METODOS 12
5.1. Material vegetal 12
5.2. Verificação do estado transgênico das plantas Analise morfo-histológica..... 12
5.3. Avaliações em ausência de estresse..... 13
5.3.1. Alterações anatomorfológicas..... 13
5.3.1.1. Area Foliar..... 13
5.3.1.2. Tenacidade..... 14
5.3.1.3. Analise morfo-hidtologica 14
5.3.2. Atividade enzimática da Fenilalanina amônia-liase (PAL) e Tyrosina amônia-liase (TAL)..... 14
5.3.2.1. Obtenção do extrato bruto 15
5.3.2.2. Fenilalanina Amônia-liase (PAL)..... 15
5.3.2.3. Tyrosine Amônia-liase (TAL)..... 15
5.3.3. Trocas Gasosas 16
5.3.4. Analise Proteômica..... 17
5.3.4.1. Extração de Proteína..... 17
5.3.4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE 1D)..... 17
5.3.4.3.Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE 2-D)..... 18
5.3.5. Tratamento por indutores Osmóticos 19
5.4. Delineamento experimental e Análise Estatística 20
6. RESULTADOS 21
6.1. Confirmação molecular da integração do gene EucXET no genoma das plantas..... 21
6.2. Alterações anatomorfológicas na ausência de estresse 22
6.2.1. Area foliar..... 22
6.2.2. Tenacidade dos tecidos 23
6.2.3. Analise anatômica..... 25
6.3. Atividade Enzimática Fenilalanina Amônia-liase (PAL) e Tirosina Amônia-liase (TAL)..... 27

6.4. Aterações fisiológicas na ausência de estresse: Trocas gasosas foliares 29
6.5. Analises proteômica 32
6.5.1. Perfil Proteico SDS-PAGE, eficiência da extração de proteínas 32
6.5.2. Perfil Proteico SDS-2D, proteínas diferencialmente expressas 33
6.6. Plântulas de tabaco expressando EucXET apresentan tolerância ao estresse salino 35
6.6.1. Biomassa Seca 36
6.6.2. Conteúdo de Clorofila 38
6.6.3. Comprimento da Raiz 39
7. DISCUSSÃO 43
8. CONCLUSÃO 47

REFERENCIAS 48

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Gel de agarose mostrando confirmação do estado transgênico de plantas T2. Fragmentos amplificados através de PCR, para primers específicos *nptII* (Neomicina Fosfotransferase). Onde (M) é o marcador (Gene Ruler de 1kb Plus DNA Ladder, ThermoFisher Scientific), (CN) Controle negativo – reação sem DNA molde, (CP) Controle positivo – reação utilizando DNA plasmidial, (NT) DNA molde de planta não transformada e (L1, L2, L3, L4) linhagens transgênicas.....28

Fig. 2. Área foliar de Nicotiana tabacum expressando EucXET. Plantas não transformadas (NT) e transformadas com o gene EucXET (L1, L2, L3, L4). Colunas seguidas de mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey (p<0,01). Dados representativo de 4 plantas por tratamento, aos 55 dias de cultivo.....29

Fig. 3. Nicotiana tabacum transformadas com o gene EucXET e plantas não transformadas. Fotos ilustrativas de 3 clones de cada linhagen (L1, L2, L3, L4) e plantas NT após 30 días de cultivo em condições controladas.....30

Fig. 4. Tenacidade de tecidos vegetais (folha, pecíolo e caule) em plantas de tabaco em duas fases de crescimento. Plantas não transformadas (NT); Plantas transformadas com o gene EucXET (L1, L2, L3, L4). Resistência à perfuração de tecidos vegetais, em plantas jovens de 30 días de desenvolvimento, fase vegetativa (A), e plantas adultas de 55 días de desenvolvimento, fase floração (B). Meias representativos de 4 plantas. Colunas seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey (p<0,01).....25

Fig. 5. Micrografias, corte transversal da porção basal do caule de linhas transgênicas transformadas como gene EucXET (L2 e L3) e planta não transformada (NT), cultivadas por 55 dias em sala de crescimento. Cortes histológicos com dupla coloração evidenciando a presença de lignina (cor vermelho - safranina); e celulose (azul - azul de astra). X, secção lignificada do tecido xilemático: 1205,663 µm NT, 442,88 µm L2 e 364,86 µm L3. Ampliação 500 µm, objetiva 10X2.1. 26

Fig. 6. Micrografias corte transversal da porção basal do caule de linhas transgênicas transformadas como gene EucXET (L2 e L3) e planta não transformada (NT), cultivadas por 55 dias em sala de crescimento. Cortes histológicos corados com safranina, porção do xilema com deposição de lignina no tecido caulinar, objetiva 10X, ampliação 500 µm (A). Coloração vermelha com diferentes intensidades na parede das células, objetiva 20X, ampliação 200 µm (B).....27

Fig. 7. Atividade da fenilalanina amônialiase (PAL) em plantas de tabaco não transformadas (NT) e plantas transformadas com o gene EucXET (L1, L2, L3, L4). Condições controle sem indutores de estresse, colunas seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey (p<0,01).....28

Fig. 8. Atividade da Tirosina Amônialiase (TAL) em plantas de tabaco não transformadas (NT) e plantas transformadas com o gene EucXET (L1, L2, L3, L4). Condições controle sem indutores de estresse, colunas seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey (p<0,01).....29

Fig. 9. Trocas gasosas foliares de plantas não transformadas (NT) e palntas transformadas com o gene EucXET (L1, L2, L3, L4). Taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (B), taxa transpiratória (C), Razão entre concentrações de CO2 intra/extracelular (Ci /Ca) (D). Colunas seguidas da mesma letra, não diferem entre si, nível de significacia1 % pelo teste de Tukey (p<0,01).....30

Fig. 10. Eficiência de carboxilação (A/Ci) (A); Eficiência intrínseca (Ags) (B) e instantânea do uso da água (C). Experimento conduzido em triplicata. Colunas seguidas das mesmas letras não tem diferença ao nível de significância de 1% pelo teste de Tukey (p<0,01).....31

Fig. 11. SDS-PAGE, qualidade da proteína de Plantas de Tabaco. M – Marcador de peso molecular (14-97KDa) GE Healthcar; NT- extrato proteico foliar de plantas não transformadas; L1, L2, L3, L4 - extrato proteico foliar de 4 linhagens transgênicas; L2c, L3c - extrato proteico caulinar de plantas da linha trasgênica 2 e linha trasgenica 3. Extração de proteína foliar pelo método fenólico (PIROVANI et al., 2008).....32

Fig.12. Perfil protéico bidimensional de folhas de folhas Nicotiana tabacum. Amostras focalizadas em strips de 13cm e PH de 3.0 a 10.0 NL. Separadas em segunda dimensão em gel de poliacrilamida 12,5%. NT - Planta não transformada e L2 – linha transgênica, planta transformada com o gene EucXET; MW - valor massa molecular em kDa. As setas azuis sinalizam a faixa onde foi observado a maior quantidade de spots; as setas vermelhas sinalizam as diferenças mais contrastantes entre a linhagem L2 e plantas não transformadas NT.....33

Fig. 13. Frequência de distribuição de spots de acordo com o gradiente de pH (A). Distribuição de spots de acordo com a massa molecular (MW) (B). Amostras de proteína obtidas a patir de folhas de plantas transformadas com o gene EucXET linhagem L2 e plantas controle, não transformadas NT.....34

Fig. 14. Diagrama de Venn, mostrando a distribuição dos spots de amostras foliares, detectados nos géis bidimensionais. Spots exclusivos, comuns e diferencialmente expressos para a linhagem transgênica L2 e plantas não transformadas NT.....35

Fig. 15. Tolerância de planta expressando EucXET e controle a estresse osmótico. Plântulas não transformadas (NT) e transformadas com o gene EucXET (L1, L2, L3, L4) sob condições controle (MS0) e de estresse osmótico (-1MPa), induzido por NaCl e Manitol. Fotos ilustrativas das plântulas após 30 días nos meios de cultura.....36

Fig. 16. Peso seco de biomassa de plântulas de Nicotiana tabacum transformadas com o gene EucXET (L1, L2, L3, L4) e plântulas não transformadas (NT), sob estresse osmótico. Condições controle (MS0) e de estresse osmótico (-1MPa), induzido por NaCl e Manitol; valor médio de peso seco de biomassa. Colunas seguidas da mesma letra, não diferem entre si ao nível de significância de 1% pelo teste de Tukey (p<0,01).....37

Fig. 17. Conteúdo de clorofila, em plântulas de Nicotiana tabacum transformadas com o gene EucXET (L1, L2, L3, L4) e plântulas não transformadas (NT) sob estresse osmótico. Condições de estresse osmótico (-1MPa), induzido por NaCl e Manitol. Conteúdo de clorofila “a” (A); conteúdo de

clorofila “b” (B). Colunas seguidas de mesma letra, não diferem entre si ao nível de significância de 1% pelo teste de Tukey (p<0,01) 39

Fig. 18. Crescimento de raízes em plântulas de Nicotiana tabacum transgênicas (L1, L2, L3, L4) e controle (NT) sob estresse osmótico. Condições controle (MS0) e de estresse osmótico (-1MPa) induzido por NaCl e Manitol.Valor médio de comprimentos de raiz (27 plântulas por tratamento por linha). Colunas seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo Tukey p<0,01.....40

Fig. 19. Analise comparativa de raízes de plantulas de N. tabacum transgênicas e controle crescidas sob estresse salino. Plântulas de tabaco não transformadas (NT) e transformadas com o gene EucXET (L1, L2, L3, L4) sob condições controle (MS0) e de estresse osmótico (-1MPa), induzido por NaCl. Fotos ilustrativas das plântulas após 30 días nos meios de cultura.....41

EXTRATO

A remodelação da estrutura da parede celular é uma das estratégias adotada pelas plantas que permite a sua adaptação e/ou resistência ao estresse abiótico. Os genes da família das endotransglucosilases/hidrolases de xiloglucano codificam proteínas enzimáticas xiloglucano endotransglucosilase (XET) ou endo-hidrolase (XEH) que desempenham um papel fundamental na remodelagem da arquitetura tridimensional da parede celular. A enzima XET, cliva internamente polímeros de xiloglucano e liga as extremidades redutoras recém-geradas a outras cadeias de xiloglucano, gerando plasticidade na parede celular. Estudos previos em plantas de *Nicotiana tabacum* transformadas com o gene *EucXET* de (XET de *Eucaliptus grandis*), apresentaram aumento na atividade das enzimas peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase do guaiacol (GPX), sugerindo uma relação estreita com aumento na resistencia a estresse e melhoria na qualidade da madeira. Assim, o corrente trabalho teve como objetivo compreender as alterações morfofisiológicas, bioquímicas e moleculares promovidas nas plantas de fumo impostas devido a superexpressão do gene *EucXET*. Foram testadas plantas mantidas sob condição controle e sob estresse abiótico (osmótico e salino). Foram avaliadas quatro linhagens transgênicas (L1, L2, L3 e L4) e plantas não transformadas (controle). Nos experimentos conduzidos em plantas mantidas sob condições controladas de ausência de estresse, as linhagens transgênicas apresentaram, em comparação com as plantas NT, aumento na área foliar e aumento na resistência de diferentes tecidos a perfuração (maior tenacidade). As analises fisiológicas, utilizando IRGA, revelou que a condutância estomática e a eficiência no uso de CO_2 foram maiores nas linhagens transgênicas, em comparação com as NT. Sendo as linhagens L2 e L3 as melhores, em comparação com as demais linhagens transgênicas. Micrografias da parte basal do caule das linhagens L2 e L3, indicaram que o xilema dessas apresenta um tecido lignificado mais compacto e aparentemente com maior deposição de lignina nas paredes celulares comparado com o observado nas plantas não transformadas. A atividade das enzimas fenilalanina amônialiase (PAL) e Tirosina amônialiase (TAL), principais enzimas relacionadas com síntese de lignina, foram dosadas e mostraram-se aumentadas significativamente nas linhagens transgênicas. Experimentos conduzidos com plântulas *x* submetidas a estresse salino (NaCl) e osmótico (Manitol) demonstrou que as linhagens transgênicas apresentaram um aumento no comprimento das raízes e no peso seco da biomassa em comparação com as plântulas não transformadas (NT). Nesse mesmo experimento, evidenciou-se aumentó do conteúdo de clorofila “b” exclusivamente nas linhagens L2 e L3. Esses resultados sugerem uma vantagem fisiológica para as plantas transgênicas mantidas *in vitro* sob condições de estresse. A analise do perfil proteico bidimensional comparativo entre a linha transgênica L2 e plantas NT revelou maior quantidade de spots detectados nos géis das plantas L2. Esse dado sugere que o aumento no nível de XET, ou as mudanças anatômicas e fisiológicas devido as mudanças impostas por tal, induz a mudança no padrão de expressão de diversos genes. Em conjunto, os resultados sugerem que a expressão do gene *EucXET* induz a remodelação da parede celular, modificando a morfologia, fisiologia e metabolismo nas plantas, podendo proporcionar um nível basal de resistência ao estresse por salinidade.

Palavras chave: parede celular, XET, anatomorfológicos, linhagens transgênicas.

ABSTRACT

The remodeling of the cell wall structure is one of the strategies adopted by plants that allows adaptation and/or resistance to abiotic stress. The genes in the endotransglucosilase/xyloglucan hydrolase family encode enzyme proteins endotransglucosylase (XET) or endohydrolase (XEH), which play a key role in the remodeling of the three-dimensional cell wall architecture. The enzyme xyloglucan entransglucosilase (XET), internally cleaves xyloglucan polymers and binds the newly generated reducing ends to other xyloglucan chains, possibly generating plasticity in the cell wall. Previous studies on *Nicotiana tabacum* transformed with the *EucXET* gene (*Eucaliptus grandis* XET), showed overexpression of XET an increase in the activity of the enzymes of ascorbate peroxidase (APX) and guaiacol peroxidase (GPX), suggesting the *EucXET* gene as a likely target of stress tolerance and wood quality. In this sense, these results show the need to evaluate the expression of the gene, under normal and stress conditions. Thus, this project aimed to understand the possible morphophysiological, biochemical and molecular changes promoted by the overexpression of the *EucXET* gene, in plants kept under control and osmotic stress conditions. Four lines of transformed plants and untransformed plants (control) were evaluated. In experiments conducted on plants in vivo, it was observed that, under controlled conditions of absence of stress, the transgenic lines showed anatomical changes, with an increase in the leaf area, an increase in the resistance of the leaf, stem and petiole tissue to perforation (tenacity), compared to NT plants. The plants were analyzed physiologically via IRGA revealing that the stomatal conductance and efficiency in the use of CO2 in the cells of the transgenic plants were higher compared to the NT. The strains L2 and L3 were the best compared to the other transgenic strains. Micrographs of the basal part of the stem of lines L2 and L3, indicated that their xylem presents a more compact lignified tissue and probably with a greater deposition of lignin on the cell walls than the region of the lignified tissue of untransformed plants. The activity of phenylalanine ammonialiasis (PAL) and Tyrosine ammonialiasis (TAL), the main enzymes related to lignin synthesis, was measured and was shown to be significantly increased in transgenic strains. Likewise, the analysis of the electrophoretic profile of the transgenic L2 line showed a greater number of detected *spots* compared to the control. In addition, it was observed in seedlings *in vitro*, under the condition of osmotic pressure induced by NaCl, that all transgenic strains showed a significant increase in the length of the roots and in the dry weight of the biomass in comparison with the untransformed seedlings (NT). In the same experiment, there was an increase in the content of chlorophyll “b” exclusively in lines L2 and L3. These results suggest a physiological advantage for transgenic plants kept *in vitro* under stress conditions. Together, the results suggest that the expression of the *EucXET* gene induces cell wall remodeling, modifying the morphology, physiology and metabolism in plants, which may provide a basal level of resistance to salinity stress.

Keywords: cell wall, XET, anatomorphological, transgenic lines.

1. INTRODUÇÃO.

Nas análises conduzidas pelo projeto "GENOLYPTUS", foram identificados genes potencialmente envolvidos com a qualidade da madeira. A comparação de perfis transcricionais do xilema de duas espécies contrastantes: *E. grandis* e *E. globulus*, forneceu importantes informações sobre padrões de expressão diferencial de genes com possível potencial genético/biotecnológico. Entre eles o gene *EucXET* com maior expressão em *Eucaliptus grandis*. Esta sequência foi assim denominada por apresentar homología com o gene da xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase 9 [XP 010035630.1] (SOUSA, 2013; ASSIS, 2018), que codifica enzimas relacionadas ao metabolismo da parede celular. Linhagens transgênicas de *Nicotiana tabacum* contendo o gene *EucXET* e plantas não transformadas (controle) foram avaliadas em condições laboratoriais e casa de vegetação. O resultado dessas análises relacionou a expressão do gene *EucXET* com o acumulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), e aumento nos níveis basais de enzimas relacionadas à tolerância ao estresse como o aspartato e guaicol peroxidases (APX, GPX). Em conjunto, esses resultados sugeriram que o gene *EucXET* poderia estar potencialmente relacionado a mecanismos de ativação em resposta a diferentes tipos de estresse, entre eles o estresse osmótico (ASSIS, 2018).

Genes da família multigênica XTH (Xyloglucan-endotransglicosylase/hidrolase), codificam proteínas enzimáticas da classe XTHs (Xiloglucan-endotransgliyosylase/ hidrolase: XET/ XTHs). As XTHs podem apresentar ação catalítica com efeitos radicalmente diferentes sobre o polissacarídeo de xiloglucano: atividade trasferase (XET) com clivagem não hidrolitica de cadenas de xiloglucano e atividade endo-hidrolase, que produz encutamento irreversível da cadeia de xiloglucano (ROSE et al., 2002; EKLÖF, BRUMER 2010). Enzimas da classe XTHs são classificadas como a subfamília 16 de glicósideo hidrolase (GH16) e tem um papel importante no alargamento dos órgãos e regulação da extensibilidade da parede celular (PC) (SONG et al., 2018). Durante a expansão celular ou em resposta ao estresse biótico e abiótico, as ligações entre os polissacarídeos na PC devem ser quebradas e reformadas. As XTHs, são a classe de enzimas que desempenham esta função (ROSE et al., 2002; SEALE 2020).

Modelos contemporâneos da PC das plantas consideram aos polissacarídeos de xiloglucano molécula-chave de reticulação, responsávei de revestir e ligar fibrilas de celulose (PAULY et al., 1999; EKLÖF, BRUMER 2010), e por consiguente um dos

principais responsáveis do seu remodelamento. O remodelamento da PC permite modificações na estrutura e composição para equilibrar a resistência e a expansão da parede, possibilitando manter o desenvolvimento e expansão das células, resguardando sua integridade mecânica (SHAHZAD, 2016). Varios tipos de estresse abiótico, como seca e salinidade, afetam as forças físicas na interface da parede celular-membrana plasmática. Essas mudanças são detectadas pela célula e funcionan como indicadores de estresse abiótico (VAATHERA, SCHULZ e HAMANN, 2019). O mecanismo de sinalização da CWI (Integridade da Parede Celular) percebe e traduz os estímulos físicos em sinais químicos, que levam a modificações na parede celular e no metabolismo celular (HAMANN, 2015). Esses sinais podem ser integrados com sinais químicos derivados de cascatas de sinalização estabelecidas para controlar respostas adaptativas específicas durante a exposição a estresses bióticos e abióticos (VAATHERA, SCHULZ e HAMANN, 2019).

O papel das XTHs na regulação e promoção do crescimento das plantas, em resposta a fatores de estresse tão difundidos quanto a seca, a salinização e a hipotermia, ainda é pouco compreendido (BEREZHNEVA, MIKHAYLOVA, KULUEV, 2018). No entanto, estudo dos genes PvXTH9 e PvXTHb em feijão (*Phaseolus vulgaris*) (ZHANG et al., 2016), PtoXTH27 e PtoXTH34 em Populus (*Populus tomentosa*) (JIANG et al., 2020), OsXET9 em arroz (*Oryza sativa* L.) (DONG et al., 2013), tXET-B2 em tomate (*Solanum lycopersicum*) (BEREZHNEVA, MIKHAYLOVA, KULUEV, 2018), apresentaram modificações morfológicas bem como superexpressão sob condições de estresse osmótico, o que foi relacionado ao aumento na resistência.

Assim, esse projeto teve como objetivo compreender as possíveis alterações anatômicas e morfofisiológicas promovidas pela superexpressão do gene *EucXET*. Para tanto avaliou- se quatro linhagens de plantas de fumo transformadas e superexpressando *EucXET* submetidas ou não a estresse osmótico e salino. Hipotetizou-se que a superexpressao de *EucXET* confere resistencia a estresse abiotico por meio de alterações anatômicas e fisiológicas impostas nas plantas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1.Estresse abiótico

O estresse abiótico nas plantas refere-se a condições ambientais que são desfavoráveis ao crescimento ou produtividade das mesmas. Tradicionalmente, essas condições incluem estresse de temperatura (frio ou calor), bem como seca ou alagamento (estresse osmótico), salinidade e desequilíbrio de nutrientes no solo (VAN DAM, 2009; TENHAKEN, 2015; NOVAKOVI´C, et al., 2018). As plantas desenvolveram mecanismos de adaptação e defesa contra danos causados por condições ambientais. Esses mecanismos são regulados por uma grande diversidade de compostos químicos que atuam como: a) transdutores em rotas de sinalização, b) enzimas em reações bioquímicas e c) fatores de transcrição que regulam a expressão gênica (MENDEZ E VALLEJO, 2019).

Em geral, um estímulo ambiental que inicia uma ou mais respostas vegetais é referido como um sinal, e o componente químico que responde bioquimicamente ao sinal é designado como um receptor. Uma vez sentido seu sinal específico, os receptores precisam fazer a transdução dele, para desencadear a resposta celular mediante modificação da atividade proteínas ou empregando moléculas de sinalização intracelular denominados mensageiros secundários; essas moléculas, então, alteram processos, como a transcrição gênica. Assim, as rotas de transdução de sinal geralmente envolvem a seguinte cadeia de eventos: Sinal → receptor → transdução de sinal → resposta (TAIZ E ZEIGER, 2017). Os hormônios vegetais, por exemplo, estão envolvidos não apenas na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas, mas também na transdução de sinal para responder às condições ambientais (SREENIVASULU et al., 2012; MENDEZ E VALLEJO, 2019). Muitos dos eventos específicos e das etapas intermediárias envolvidas na transdução de sinal em vegetais têm sido identificados; esses intermediários constituem as rotas de transdução de sinal.

Estresses abióticos, como seca, calor e frio (congelamento), afetam o potencial hídrico da célula e, portanto, a pressão do turgor. Nas paredes primárias que são uma matriz do tipo gel altamente hidratada (60 a 80% do peso úmido é água), isso influenciará a organização e a interação dos polímeros da parede e também a ligação física entre a parede e a membrana plasmática. Além disso, no caso de toxicidade de metais/íons, como a de alta salinidade do solo, íons monovalentes como Na+ e K+ podem causar

deslocamento dos íons Ca2 + e rompimento da estrutura da matriz da pectina. Assim, as alterações induzidas pelo estresse do sal nas propriedades mecânicas da parede levam a uma mudança de integridade que é percebida pelos sensores CWI (NOVACOVIK et al., 2018).

O estresse por deficiência de agua desencadeia uma série de sinais iônicos, mecânicos e osmóticos reconhecidos por vários receptores. Em geral, desidratação celular, alteração da mitose, redução do metabolismo, volume celular e turgor são observados, bem como potencial hídrico negativo nos apoplastos e alta concentração iônica que pode ser citotóxica (TAIZ E ZEIGER, 2017). Um dos principais processos afetados pelo estresse hídrico é a fotossíntese, diminuição da produção de biomassa, redução da expansão foliar, ineficiência da função dos cloroplastos, baixa difusão de CO2, diminuição da fotossíntese líquida e condutância estomático. Redução da área foliar do número total de folhas, da transpiração, da concentração intercelular de CO2 e da eficiência de carboxilação (XU et al., 2008). O ácido abscisico (ABA) é considerado o principal sinal de resposta ao estresse, esse mecanismo de resposta induzido pelo ABA permite que as plantas explorem locais adjacentes para a água. Outras de suas funções é estimular o fechamento de estômatos para reduzir a perda de água através da transpiração. Os estômatos consistem em duas células protetoras que detectam altos níveis de ABA, reduzindo assim seu volume e turgidez, saindo de íons e ânions de potássio (MENDEZ E VALLEJO, 2019).

2.2.Parede celular

Foram descritos muitos modelos de paredes celulares de plantas que tentam integrar todos os detalhes de composição e estrutura. Contudo, certamente não existe um modelo universal que se aplique a todas as paredes celulares apesar de descobertos vários princípios comuns presentes nos maiores grupos de plantas (COSGROVE, 1997; WOLF et al., 2012; TENHAKEN, 2015). A composição da PC é variada não apenas entre as espécies vegetais, mas também entre os tipos tecido (HOUSTON et al., 2016).

Na maioria das plantas, a parede celular vegetal é composta por microfibrilas de celulose embebidas em uma matriz de hemicelulose, pectinas e glicoproteínas estruturais, bem como lignina em células dos elementos traqueais e fibras do xilema (KUSHWAH et al., 2020). Noventa por cento dos componentes da parede celular são polissacarídeos, sendo a celulose o mais abundante das paredes primaria e secundaria; cuja estrutura

fibrosa permite a manutenção da integridade estrutural. As pectinas estão predominantemente na parede primaria e tem papeis na expansão, força, porosidade, adesão e sinalização intercelular. Outros polissacarídeos não celulósicos abundantes (hemicelulose) incluem xiloglucanos, xilanos, manano e calose que desempenham vários papéis no suporte mecânico armazenamento de reservas e desenvolvimento (HOUSTON, 2016).

2.2.1. Plasticidade e Remodelamento

A parede celular é uma estrutura dinâmica que fornece suporte mecânico durante o crescimento, desenvolvimento e adaptação das plantas, através de rearranjos e remodelamento de seus componentes. Assim, é importante o monitoramento de seu estado, para garantir a integridade e funcionalidade. Esse monitoramento envolve a percepção de forças físicas na interfase da parede celular - membrana plasmática. Essas forças são alteradas durante a divisão celular e a morfogênese, bem como em resposta a vários estresses abióticos e bióticos. (VAAHTERA, SCHULZ, HAMANN, 2019; NOVAKOVIC *et al*., 2018).

Um elemento chave da plasticidade da parede celular parece envolver ao mecanismo que controla sua integridade funcional, que inicia respostas compensatórias quando a integridade da parede celular (CWI) e prejudicada (WOLF, 2017). A detecção de estresse mediada pela parede e a aclimatação da parede são ativadas por vários receptores e canais que regulam o transporte e a troca de sinais moleculares locais e de longa distância, como elicitores, hormônios, açúcares, proteínas e RNAs (HOUSTON et al., 2016). Os sensores associados à parede celular têm funções que incluem a detecção de sinais mecânicos gerados pela pressão do turgor de dentro da célula ou das células vizinhas e sensores CWI que detectam alterações nas propriedades mecânicas da parede e ativam a transdução de sinal (HAMANN, 2015; NOVAKOVIC et al., 2018).

Na maioria dos casos, dois mecanismos principais podem ser destacados: (i) um nível aumentado de endotransglucosilase / hidrolase de xiloglucano (XTH) e proteínas de expansina, associados a um aumento no grau de ramificação de ramnogalacturonan I que mantém a plasticidade da parede celular e (ii) um espessamento aumentado da parede celular por reforço da parede secundária com deposição de hemicelulose e lignina (HYACINTHE, 2015). As endotransglicosilases / hidrolases de xiloglucano (XTHs) são

uma classe de enzimas envolvidas na construção e remodelação de reticulados celulose / xiloglucano e desempenham um papel importante na regulação da extensibilidade da parede celular.

2.2.2. Resposta ao estresse abiótico – osmótico

A percepção de diferentes sinais ambientais resulta na ativação de vários receptores e canais que regulam o transporte e a troca de sinais locais e de longa distância como elicitores, hormônios, açúcares, proteínas e RNAs. Os sensores associados à parede têm funções que incluem a detecção de sinais mecânicos gerados pela pressão do turgor de dentro da célula ou de células vizinhas e sensores CWI (rota cell wall integrity) que detectam alterações nas propriedades mecânicas da parede e ativam a transdução sinal (HOUSTON et al., 2016; LE GALL et al, 2015).

Durante o reconhecimento, os sinais primários de estresse são processados por meio de receptores de membrana celular. Por exemplo, para a deficiência de água, o sinal primário é a hiperosmolaridade; enquanto, para a alta salinidade, os sinais primários são a pressão osmótica alterada e a toxicidade iônica. Em relação à alta temperatura, quatro sensores putativos foram propostos: um canal membrana de membrana que inicia um influxo de Ca2 +, um sensor de histona no núcleo e dois sensores de proteína no retículo endoplasmático e no citosol (Mittler et al., 2012).

Várias mudanças na composição da parede celular vegetal sob um espectro de estresses abióticos foram estudadas. Entre os genes discutidos em detalhes estão membros da família de genes CesA, que são conhecidos por sintetizar celulose, bem como membros das famílias de genes expansina e XTH (HOUSTON et al., 2016). Uma resposta comum das plantas é a produção de ROS e um aumento na atividade das peroxidases, XTH e expansinas. O equilíbrio entre a formação de ROS e as mudanças transcricionais para enzimas de remodelação da parede celular parece ser importante para o resultado, seja a interrupção do crescimento em cultivares sensíveis ao sal e à seca ou uma continuação do crescimento (preferencialmente da raiz), embora com uma taxa reduzida (TENHAKEN, 2015).

O estresse abiótico pode resultar em danos à parede e mudanças nas propriedades mecânicas que ativam ROS, detecção de CWI e sinalização hormonal. Homólogos de

oxidase de explosão respiratória (RBOH) são ativados pelo influxo de cálcio (Ca2 +) levando à produção de ROS na parede. A produção de ROS combinada com a atividade da peroxidase promove a sinalização para induzir ao endurecimento da parede. Se a atividade da peroxidase ou H2O2 for limitada, a formação de radicais OH pode resultar na clivagem das ligações do açúcar nos polissacarídeos e no afrouxamento da parede (NOVAKOVIC, et al., 2018).

2.3.Genes xyloglucan endo-transglycosylase / hydrolase (xth)

Os genes XYLOGLUCAN ENDO-TRANSGLYCOSYLASE / HYDROLASE (XTH) codificam proteínas que podem ter potencialmente duas atividades catalíticas distintas, com efeitos radicalmente diferentes sobre o xiloglucano: atividade de xiloglucano endo-transglicosilase (XET); resulta na clivagem não hidrolítica e ligação de cadeias de xiloglucano, enquanto a atividade de endo-hidrolase (XEH) produz encurtamento de cadeia irreversível. (ROSE et al., 2002; EKLÖF, BRUMER 2010). Para compreender os efeitos fisiológicos dos produtos individuais do gene XTH em diversos processos, como germinação de sementes, organogênese, expansão celular e amadurecimento de frutos, é essencial compreender sua bioquímica. Em particular, é necessário saber se um transcrito regulado codifica um XET estrito desprovido de atividade hidrolítica cineticamente relevante, um XEH estrito sem capacidade de reorganizar a rede de xiloglucano, exceto por degradação irreversível ou uma enzima com função mista (EKLÖF, BRUMER 2010).

Os XTHs foram amplamente relatados em muitas plantas, como Arabidopsis thaliana (33 genes), Oryza sativa (29 genes), Populus tomentosa (33 genes), Solanum lycopersicum (25 genes), Nicotiana tabacum (56 genes), Glycine max (61 genes), Hordeum vulgare (24 genes) e Ananas comosus (24 genes). Os genes XTH são expresos em diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento (WU, et al., 2020). Estudos nesses genes indicaram que estão intimamente relacionados ao crescimento e desenvolvimento da planta. Os genes XTH também estão associados à resistência das plantas ao estresse.

Genes da família XTH têm sido estudados sob diferentes tipos de estresse, para a análise da superexpressão e aumento da atividade da xiloglucan endotransglycosylase

(XET), bem como seu envolvimento no metabolismo celular. É o caso dos genes PvXTH9 e PvXTHb em feijão (Phaseolus vulgaris), que foram superexpressos sob condições de déficit hídrico com maior atividade do XET na zona do meristema radicular (Zhang et al., 2016). No cultivo de arroz (Oryza sativa L.), o gene OsXET9, apresentou aumento nos níveis de expressão em diferentes tecidos e fases de desenvolvimento, em baixa temperatura e em condições de seca (Dong et al., 2013). Outros estudos realizados em linhagens transgênicas revelaram que a superexpressão do gene tXET-B2 (Solanum lycopersicum) induziu o crescimento radicular em meios de cultura com alto potencial osmótico e aumentou significativamente o peso fresco e seco sob condições de seca (Berezhneva, Mikhaylova, Kuluev, 2018).

Nos últimos anos, na biotecnologia vegetal, os sistemas de expressão de genes induzíveis tornaram-se muito populares. Esses sistemas, juntamente com os promotores constitutivos, são cada vez mais usados na geração de plantas transgênicas. A vantagem desses sistemas de transcrição é a possibilidade de ativação da expressão do transgene a qualquer momento durante a estação de crescimento, dependendo das tarefas do experimento. Devido a isso, as manifestações fenotípicas da expressão constitutiva e induzível de genes alvo em plantas transgênicas podem diferir substancialmente (BEREZHNEVA, MIKHAYLOVA e KULUEV, 2018). Assim manifestação fenotipicas da expressão constitutiva dos genes XTHs, é variável,

2.3.1. Enzimas Xiloglucan endotrasglicosilase/ hidrolase

O xiloglucano é hemicelulose mais abundante e onipresente das paredes celulares primárias em todas as plantas terrestres. A interação com as microfibrilas de celulose é uma das principais responsáveis pelo afrouxamento e plasticidade da célula durante o desenvolvimento e adaptabilidade dos vegetais. Essa interação é modulada pelas enzimas xiloglucan endotrasglicosilase/hidrolase (XET/XTH) e proteínas de expansina (KUSHWAH et al., 2020, TENHAKEN, 2015). As endotransglucosilasas / hidrolasas de xiloglucano (XET / XTH também denominadas XTH) se classificam como a família 16 de glicósideo hidrolase (GH16) e tem um papel importante no alargamento dos órgãos e regulação da extensibilidade da parede celular (SONG et. al., 2018). No entanto o papel delas na regulação e promoção do crescimento das plantas, em resposta a fatores de estresse tão difundidos quanto a seca, a salinização e a hipotermia, ainda é pouco compreendido (BEREZHNEVA, MIKHAYLOVA, KULUEV, 2018).

As enzimas xiloglucan endotrasglicosilase XET, clivam as cadeias de xiloglucano e junta novamente a extremidade redutora a outra molécula de xiloglucano, resultando no alongamento do polímero (ROSE et al., 2002; COSGROVE, 2005; WANG et al., 20018). O mecanismo único das enzimas XET permite que elas hidrolisem e religuem o oligossacarídeo xiloglucano a outras cadeias de xiloglucanoligossacarídeo / polissacarídeo. As moléculas de xiloglucano têm forte tendência de se ligar naturalmente às cadeias de celulose por meio de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas in vivo e in vitro as moléculas de xiloglucano se ligam quase instantaneamente à celulose. A interação do xiloglucano com a celulose desempenha um papel fundamental no controle do crescimento das células vegetais, no amolecimento dos frutos, na resposta a patógenos e na diferenciação vascular. Diferentes isozimas das enzimas XTH são expressas em diferentes estágios de crescimento da planta / fruto (KAUR, 2019).

A analise da expressão desses genes revelou que a maioria dos membros da família exibe padrões de expressão distintos em termos de especificidade do tecido e que respondem de maneira diferente aos sinais hormonais (EKLÖF, BRUMER, 2010; SHARPLES et. al., 2017). A presencia de xiloglucanos em todos os tipos de células e os perfis de expressão específicos de tipos de células dos genes XTH, indicam que os XTHs estão envolvidos em uma ampla gama de processos fisiológicos. Em Arabidopsis XTH (AtXTH), cada gene parece desempenhar um papel particular na modulação da arquitetura de paredes de maneira específica temporal e espacialmente (YOKOYAMA et al., 2004; SONG et al., 2018). A capacidade da XTH's de recrutar novas cadeias poliméricas ou de xiloglucano para a parede celular existente provavelmente leva ao fortalecimento da parede, enquanto a hidrólise de ligações cruzadas pode levar ao afrouxamento da parede. Portanto, XTH pode regular a plasticidade da parede celular e, posteriormente, o tamanho celular e a arquitetura da planta (NISHITANI E TOMINAGA 1992; ROSE et al., 2002; JAN et al., 2004; BECNEL et al., 2006; ADAMS, 2018).

2.3.2. EucXET

No projeto "WoodGenes – Gênese da Madeira em Eucalyptus: Genes, Funções, Regulação e Expressão Transgênica" derivado do Pojeto GENOLYPTUS, clones de cDNA das bibliotecas de expressão de xilemas de espécies contrastantes de Eucalyptus foram analisados com objetivo de selecionar genes cuja expressão afeta direta ou indiretamente a formação da madeira. A análises comparativas dos transcriptomas de

xilemas de E. *grandis* e E. *globulus*, identificaram uma sequência similar à XET (*Euc*XET) entre os genes diferencialmente expressos (SOUSA, 2013). O gene *Euc*XET apresento maior expressão em *Eucaliptus grandis*. Essa sequência foi assim denominada por apresentar homología com o gene da xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase 9 [XP 010035630.1]. Genes de *EucXET* de eucalipto foram transferidos individualmente, sob a regulação do promotor constitutivo 35S (CAMV35S), para *Nicotiana tabacum*, no ano 2009 no laboratório de cultura de tecidos da UESC (ASSIS, 2018).

Com base nas características estruturais da proteína XTH, as XTH's foram divididas em três grupos, denominados I/II, III e Grupo Ancestral. A atividade glicosiltrasferase pertence aos membros do Grupo I / II e os XTHs com atividade de hidrolase pertence principalmente ao Grupo III (MICHAILIDIS et al., 2009; BEHAR et al., 2018; SONG et al., 2020). Análises bioinformáticas, registraram que o gene *EucXET* pertenece ao grupo I/II com atividade glicosiltrasferase, localizado na membrana plasmática (ASSIS, 2018).

Plantas transformadas com o gene EucXET de E. grandis foram avaliadas, e apresentaram superexpressão do XET na atividade das enzimas peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase do guaiacol (GPX), bem como acumulo da proteína exógena, sugerindo ao gene *EucXET* como provável alvo de resistência ao estresse e qualidade da madeira. Em conjunto, esses resultados sugerem que o gene *EucXET* pode estar potencialmente relacionado a mecanismos de ativação em resposta a diferentes tipos de estresse entre eles o déficit hídrico (ASSIS, 2018).

Assim, esse projeto teve como objetivo compreender as possíveis alterações anatômicas e morfofisiológicas promovidas pela superexpressão do gene EucXET. Para tanto avaliou quatro linhagens de plantas de fumo transformadas e superexpressando EucXET submetidas ou não a estresse osmótico e salino. Hipotetizou-se que a superexpressao de EuXET confere resistencia a estresse abiotico por meio de alterações anatômicas e fisiológicas impostas nas plantas.

3. HIPOTESE

A superexpressão de *EucXET* promove mudanças anatomorfológicas e confere resistência ao estresse abiótico em plantas transformadas de *Nicotiana tabacum.*

4. OBJETIVO

4.1. Objetivo Geral.

Compreender as possíveis mudanças anatomorfológicas, fisiológicas e moleculares promovidas pela superexpressão do gene *EucXET* em plantas modelo de *Nicotiana tabacum*.

4.2. Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade do gene *EucXET* em conferir tolerância a estresse por indutores osmóticos em linhagens transgênicas de tabaco em condições *in vitro*;

- Avaliar os efeitos da expressão de *EucXET* sobre alterações anatômicas e fisiológicas em plantas transgênicas de tabaco, sob condições controle na ausência de indutor de estresse;

- Identificar diferenças no perfil proteico de plantas transformadas e não-transformadas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Material vegetal

Plantas de tabaco da variedade Havana foram transformadas por Sousa (2009) com o gene *EucXET* dirigido sob a expressão do promotor CAMV35S, via *Agrobacterium tumefaciens* seguindo protocolo estabelecido por Brasileiro e Carneiro (1998) (ASSIS, 2018). Cada uma das variantes de integração do transgene encontradas em plantas regeneradas no experimento de transformação foram nomeadas como L1, L2, L3 e L4, e as plantas controle não transformadas foram nomeadas como NT.

Os regenerantes trasgênicos primários T0, refere-se a plantas transgênicas recuperadas dos explantes submetidos ao processo de transgênese (HOMRICH, 2008). Nesse sentido, sementes "T2" obtidas por autopolinização de plantas T0 e T1, foram utilizadas para a realização dos experiemtos do presente trabalho. Sementes de quatro linhagens: L1, L2, L3 e L4, bem como NT, de *Nicotiana tabacum*. Fornecidas pelo laboratório de cultura de tecidos vegetais (LCT) do Centro de Biotecnologia e Genética (CBG) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC).

A parte experimental foi realizada com plantas mantidas na câmara de crescimento em condições *ex vitro,* na ausência de indutores de estresse. Bem como em plântulas *in vitro* na presencia de dois indutores de estresse osmótico (NaCl ou Manitol).

5.2. Verificação do estado transgênico das plantas

Sementes das plantas T2 foram desinfestadas com hipoclorito de sódio e semeadas em placas de Petri com meio de seleção MS-0: Sais de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de sacarose (30g/L), vitaminas de Gamborg's, agar (8g/L) e Kanamicina (50mg/l). Após 10 dias, as 5 plântulas mais vigorosas de cada linha transgênica e controle, foram transferidas para frascos de micropropagação contendo 30mL de meio MS. O material foi mantido em sala de crescimento (32 μmoles fótons/m^2/s, 16h dia/8h noite; 25 ±2°C). Depois de 30 dias, foi realizada a extração de DNA pelo método C-TAB simplificado (Doyle e Doyle, 1987) a partir de 50mg de folhas isoladas de plantas únicas individuais, por cada linhagens transgênicas e controle. O DNA extraído foi submetido a

reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando primer especifico para a detecção do gene de seleção codificante da proteína Neomicina Fosfotransferase (*nptII*) que confere resistência à Kanamicina, visando sua amplificação. Para a amplificação empregou-se 0,5 µL de DNA (50-100 ng), 0,5 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,5 µL de $MgCl_2$ (25 mM), 1,25 µL de tampão (10x), 0,5 µL 10µM dos oligonucleotídeos específicos e 0,1 µL de Taq Polimerase (5U/µL) em volume de reação de 12 µL. As reações foram amplificadas em termociclador (APPLIED BIOSYSTEMS), com uma desnaturação inicial de 95 ºC por 4 min seguida de 35 ciclos de 94 ºC por 1 min, 58 ºC por 1 min, 72 ºC por 1 min e 30 segundos e uma extensão final de 72ºC por 10 min. O resultado da reação foi avaliado por eletroforese, em gel de agarose (1%) contendo gel red diluído a 1:1000 (1 µl de GelRedTM para 1000 µl de água miliQ) e fotografado sob luz ultravioleta.

5.3. Avaliações em ausência de estresse

A regeneração de plantas T2, foi realizada a partir de plantas únicas (com estado trasgênico comprovado) e através da técnica de micro propagação *in vitro* por micro estaquia. Obteve-se 10 clones de cada linha transgênica e plantas não transformadas. Após 25 dias de desenvolvimento em condições *in vitro*, os clones foram transplantados em vasos de 500mL contendo substrato (BASAPLANT) previamente autoclavado. O material foi mantido na sala de crescimento (T° 25±2°C, e intensidade luminosa alternada entre 16/8horas de fotoperioso luz/escuro) por 55 dias. Essas plantas foram utilizadas para os experimentos *ex vitro* de avalição na ausência de indutores de estresse. Cada um dos experimentos foi realizado com 4 repetições biológicas (4 clones), em plantas em estado juvenil (30 días) e estado adulto (55 dias).

5.3.1. Alterações anatomorfológicas

5.3.1.1. Área Foliar

Para a determinação da área foliar, após de 55 dias de cultivo, fez-se o registro fotográfico das imagens de todas as folhas frescas (limbo foliar e pecíolo) de plantas individuais em quadruplicata. Utilizou-se câmera fotográfica CANON POWERSHOT

SX400IS com resolução de 16.0MP. As imagens digitais foram processadas pelo software ImageJ, versão 1.50i.2016. O conjunto de dados foi analisado estatisticamente.

5.3.1.2. Tenacidade

Foi analisada a tenacidade em tecido foliar (3ra folha expandida), peciolar e caulinar das plantas controle (não transformada) e linhagens transgênicas. As medições foram realizadas em plantas após 30 dias de cultivo (estado juvenil, vegetativo) e aos 55 dias (estado adulto, floração). Foram realizadas 3 perfurações por tecido, para cada uma das quatro réplicas. No caso do tecido caulinar essas perfurações foram feitas a 5cm do coleto. Utilizou-se penetrômetro digital (Penetrometer, modelo: GY-4), com cabeça de 3,55mm de diâmetro. Os valores foram expressados em kgf/cm^2, e analisados estatisticamente.

5.3.1.3. Analise morfo-histológica

Para a confecção das laminas histológicas semipermanentes utilizou-se a técnica de corte à mão livre, de tecido caulinar (material fresco, plantas maduras de 55 días) conservado em etanol 70% (CORTEZ, SILVA, CHAVES, 2016). Foram feitos cortes histológicos transversais da parte basal do caule (coleto), de plantas únicas das linhagens transgênicas L2 e L3 e controle (Não transformada). As linhagens transgênicas foram selecionadas por apresentarem maior diferença fenotípica em relação as plantas controle. As secções obtidas foram clarificadas em hipoclorito de sódio 50% durante 10 minutos e, a seguir, submetidas a dupla coloração, com safranina e azul de astra por 5 minutos para cada corante (GERLACH, 1984). Observou-se com objetiva 10X e 20X em microscópio ótico (Câmera Olympus - C7070) do Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UESC.

5.3.2. Atividade enzimática da Fenilalanina Amônia-liase (PAL) e Tyrosine Amônia-liase (TAL)

A atividade enzimática, foi estimada com base na diferença de absorbância resultante da conversão da L-fenilalanina em ácido trans-cinâmico, como descrito por Hyodo et al. (1978) mencionado por Souza (2017); e conversão da L-Tirosina em ácido p-cumarico

(WAJAHATULLAH et al., 2003). As leituras foram realizadas no espectrofotômetro de microplacas EspectramaxParadigm (Molecular Devices) em quadruplicatas. As análises foram feitas com as mesmas plantas submetidas as análises anatomorfológicas e fisiológicas, plantas adultas de 55 dias de desenvolvimento mantidas condições de sala de crescimento na ausência de estresse.

5.3.2.1. Obtenção do extrato bruto

Para a avaliação da atividade enzimática, foram pesadas 100mg de um mix representativo de todas as folhas das plantas, mantido a -80°C. A amostra foi macerada, na presença de nitrogênio líquido, até atingir textura de pó fino. Adicionou-se 800µl de tampão borato de sódio (100mM, Ph7,0). Após sonicação (8pulsos; 5ON; 10OF, 70% amplitude) e centrifugação (14000rpm/15min/4C°), o sobrenadante foi coletado e incubado por 1 hora a 40°C. Esse extrato foi denominado de extrato bruto.

5.3.2.2. Fenilalanina Amônia-liase (PAL)

A atividade de Fenilalanina Amônia-liase (PAL) foi determinada pelo procedimento de Hodgins (1971), com modificações, mencionado por Mora (2016). Adicionou-se 75µl de tampão borato de sódio 100 mM e 125µl de tampão de reação (borato de sódio 100mM mais fenilalanina 12mM, pH 8,8) a 50µl de extrato bruto. O branco usado foi a mistura de 125 µL dos dois tampões sem adição do extrato bruto. A leitura pontual foi realizada imediatamente, no escuro, no comprimento de onda de 290nm utilizando o espectrofotômetro de microplacas. As leituras foram realizadas em quadruplicata por linha transgênica e controle. Os dados foram analisados estatisticamente.

5.3.2.3. Tyrosine Amônia-liase (TAL)

A atividade enzimática TAL, determinou-se pelo procedimento descrito por Wajahatullah et al., (2003) com modificações. As mensurações foram feitas em uma mistura de reação com volume final de 250µl, contendo 50µl extrato bruto, 75µl tampão borato de sódio 100 mM e 125µl tampão de reação (borato de sódio 100mM mais 5,5 µmol de Tirosina, pH 8,8). As leituras foram realizadas com base na diferença de

absorbância resultante da conversão da L-Tirosina para ácido p-cumarico, leitura pontual ao comprimento de onda de 315nm no espectrofotômetro de microplacas. As leituras foram realizadas em quadruplicata por linha transgênica e controle. Os dados foram analisados estatisticamente.

5.3.3. Trocas Gasosas

Após 55 dias de cultivo sob condições de sala de crescimento, sem indutor de estresse, plantas trasgenicas das 4 linhagens (L1, L2, L3, L4) e plantas não transformadas (NT), foram submetidas a avaliação das trocas gasosas. As analises foram conduzidas em folhas maduras do terceiro ou quarto nó a partir do ápice caulinar, utilizando-se um sistema portátil de medição de fotossíntese Li-6400 (Li-Cor, USA). As medições foram realizadas sempre das 08:30 às 12:00 h, sendo avaliadas a taxa fotossintética líquida (*A*), condutância estomática (*gs*), transpiração (*E*), razão entre as concentrações internas e externas de CO_2 (*Ci*/*Ca*), sob luz saturante artificial de 600 μmol fótons m^{-2} s^{-1}, temperatura foliar de 25ºC, umidade relativa próxima a 60% ± 5 e a concentração atmosférica de CO_2 (*Ca*) de 390 mmol mol^{-1}. A eficiência instantânea (*A*/*E*) e intrínseca (*A*/*gs*) de uso da água foram calculadas a partir dos valores obtidos. As medições foram feitas em quatro plantas (clones) para cada linhagem e plantas não trasformadas.

5.3.4. Analise Proteômica

5.3.4.1. Extração de Proteína

A extração de proteína foi realizada seguindo o protocolo desenvolvido por Pirovani et al. (2008). O material foi macerado com nitrogênio líquido e 0,07g de polivinilpirrolidona (PVPP), até atingir a textura de pó fino. Utilizou-se folhas de plantas de linhagem L2 e plantas não transformadas, em condições controle de sala de crescimento, sem estresse. Foram feitas lavagens com acetona 100% e β-mercaptoethanol a 0,07% (centrifugação: 14000rpm/4°C/8min), o sobrenadante foi descartado. Após secar o pellet em câmara de fluxo laminar a temperatura ambiente por 1 hora, foram realizadas

lavagens com ácido tricloroacético (TCA) 10% em acetona e β-mercaptoethanol a 0,07%. As amostras foram sonicadas (3 pulsos, 5on, 10off, 70% de amplitude), e centrifugadas (13400rpm/8min/4°C). Em seguida, os pellets foram lavados com ácido tricloroacético (TCA) 10% em agua e β-mercaptoethanol a 0,07%, após com acetona 80% (centrifugação: 13400rpm/4°C/8min), o sobrenadante foi descartado e o material secado a temperatura ambiente por 1 hora. Os pellets secos foram ressupensos em 0,8ml de tampão de extração de dodecilsulfato de sódio (SDS) denso, (30% sacarose, 2% SDS, 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 5% β-mercaptoethanol) e 0,8ml de Fenol (tamponado com Tris, pH 8,0), as amostras centrifugaram-se a 14000rpm/15min/4°C. A fase superior de cada amostra foi coletada e incubada overnight a -20°C com 5 volumes de amônio 0,1 M em metanol. O pellet gerado por centrifugação foi lavado com amônio 0,1 M em metanol, e acetona 80%. Em seguida os pellets foram secados a temperatura ambiente. Em cada lavagem as amostras foram centrifugadas (13400rpm, 5min, 4°C) e os sobrenadantes descartados. As proteínas foram ressuspensos em 800 µL de tampão de reidratação (ureia 7mol.L^{-1}, tiourea 2mol.L^{-1}, CHAPS 2 %, e azul de bromofenol 0,002%) e armazenados em freezer a -20°C.

As proteínas foram quantificadas por utilizando o Kit 2-D Quant de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare).

5.3.4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE 1D)

Com os valores obtidos referentes à concentração de proteínas foram preparadas 30 µg de proteína de cada amostra, acrescido com tampão de reidratação e tampão de amostra até atingir o volume 25µl. O material foi desnaturado (95°C, 5min), e cada amostra foi depositada nos poços do SDS-PAGE (Dodecil Sulfato de Sódio - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida). Utilizou-se o marcador Low Molecular 27 Weight Marker de 14-97 kDa (GE Healthcare). Após da corrida, o gel foi colocado em tampão de fixação (40% etanol, 10% Ac acético) durante 10 min e corado durante 1 dia em 0,08% de Coomassie coloidal G-250 (NEUHOFF et al., 1988). O gel foi digitalizado usando ImageScanner II (Amersham, GE Healthcare).

5.3.4.3. Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE 2-D)

A separação em primeira dimensão das proteínas foi realizada pelo seu ponto isoelétrico, em um sistema Ettan IPGphor (GE Healthcare). Foram usados 350µg de proteína solubilizadas em tampão de reidratação, adicionou-se ditioo treitol (DTT), anfólitos para pH 3-10 NL (DryStrip 13cm), acrescido com tampão de reidratação até atingir o volume de 125µl. As tiras de gel (DryStrip 13cm) foram colocadas em contato com as amostras proteicas em suporte especifico para focalização, e selado com 1ml de óleo mineral (*Dry Strip Cover Fluid*). Os suportes foram transferidos para o equipamento de focalização em condições de reidratação de 12 horas, a 20°C; condições de corrida de 500Vh/1hr, 1000Vh/1,04hrs, 8000Vh/2,30hrs e 8000Vh/40min.

Antes da eletroforese de gel de poliacrilamida-SDS (PAGE), as tiras foram incubadas durante 15 min em tampão de equilíbrio (ureia 6 M, Tris-HCl 7,5 M, pH 8,8) glicerol 30%, SDS 2%, e azul de bromofenol 0,002% com ditiotreitol (DTT) 1%, durante mais 15 minutos em agitação suave com tampão de equilíbrio com iodoacetamida 2,5% e finalmente 15 min em tampão de corrida (Tris 0,25M, Glicina 1,92M, e SDS 1%, pH 8.5). Após da eletroforese os géis foram colocados em tampão de fixação por 40 min e as proteínas foram coradas por 7 dias em 0,08% de Coomassie coloidal G-250 (w / v) (Neuhoff et al., 1988), e descorados durante 7 dias. Os géis foram digitalizados usando ImageScanner II (Amersham, GE Healthcare) e analisados utilizando ImageMaster 2D Platinum (GE Healthcare). Os *spots* foram caracterizados por o ponto isoletrico e peso molecular, o que permitiu fazer a marcação de cada *spot* individualmente. Analisou-se a quantidade e o nível de expressão nos géis da linhagem transgênica (L2) e não transformada (NT), para a identificação de *spots* exclusivos e diferenciais. Para o match entre tratamentos foram escolhidos os *spots* com *folding* igual ou maior a 1,5 e ANOVA igual ou menor de 0,05.

5.3.5. Tratamento por indutores Osmóticos.

As plântulas foram germinadas de acordo com o tem 5.2. Após 10 dias, plântulas NT e transgênicas de tamanhos semelhantes, foram selecionadas e transferidas para placas petri contendo ao meio MS0 suplementado com indutores de estresse NaCl ou Manitol.O potencial osmótico foi ajustado para -1Mpa, utilizando o sistema de potencial hídrico PSYPRO (Wescor Inc., modelo P3-526). Plântulas também foram transferidas para o meio MS0, sem adição de indutor de estresse, como tratamento controle. O potencial osmótico do meio controle foi de -0,5MPa. As plântulas permaneceram 30 días em sala de crescimento (16h dia/8h noite; 25 ±2°C) sob as condições descritas ancima. Após desse período, avaliaram-se o comprimento da raiz, peso de biomassa seca das plântulas e conteúdo de clorofila. A mensuração de comprimento da raíz primaria, foi realizada com auxílio de régua graduada em milímetros (mm).

Para a determinação da ***biomassa seca***, as plântulas foram transferidas para sacos de papel e mantidas em estufa a 60C° por 72 horas até atingir um peso constante (SOUSA, 2013).

Para a quantificação do ***conteúdo de clorofila***, adicionou-se 2ml de acetona 80% a 100mg de tecido vegetal previamente macerado na presença de nitrogênio líquido. Os extratos obtidos foram cobertos com papel alumínio e armazenados a -20°C, por 24hr. Após esse período centrifugou-se (15min, 10000rpm, 4°C) e coletou-se o sobrenadante. A quantificação dos teores de clorofila *a* e *b* foram procedidos no espectrofotrômetro de microplacas Espectramax Paradigm (Molecular Devices), utilizando as absorbâncias no comprimento de onda de 470nm, 645nm e 662nm. Os resultados obtidos foram expressos em $\mu g/ml^{-1}$ através das equações dadas por Wellburn (1994).

5.4. Delineamento experimental e Análise Estatística

Os experimentos em condições de sala de crescimento *ex vitro*, sem indutores de estresse, foram conduzidos com um delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições biologicas (clones), analisadas com ANOVA e comparação de medias pelo teste de Tukey 5%-1%. Avaliou-se alterações anatômicas (tenacidade, área foliar) e

fisiológicas (atividade enzimática, trocas gasosas) em plantas transgênicas e plantas não transformadas.

As avaliações *in vitro* com tratamento por indutores de estresse osmótico, foram conduzidas com delineamento inteiramente com dois fatores: linhas transgênicas (L1, L2, L3, L4 e NT) e meios de estrese (MS+NaCl, MS+Manitol e MS). Avaliou-se o peso seco de biomassa, comprimento de raiz e conteudo de clorofila de plântulas de quatro linhagens transgênicas e plântulas não transformadas, como resposta a meios de estrese e controle. Foram utilizadas como repetições biológicas 3 placas de petri (unidade experimentai) por linha, por tratamento. Cada uma das unidades experimentais composta de 9 plântulas. Fez-se analise de variância fatorial (ANOVA), e análise de efeitos dos fatores individuais pelo teste de Tukey 1%.

Todos os dados gerados foram analisados com os softwares estatísticas RStudio e SPSS-IBM.

6. RESULTADOS

6.1. Confirmação molecular da integração do gene *EucXET* no genoma das plantas

A análise, em gel de agarose, dos produtos do PCR revelou que todas as plantas representativas de linhagens transgênicas testadas (L1, L2, L3 e L4) apresentaram fragmentos de DNA amplificados de aproximadamente 750pb (Fig. 1.). Esse e o tamanho esperado para amplificações utilizando *primers* específicos para o gene de seleção Neomicina Fosfotransferase *(nptII)*, gene de seleção presente no cassete do vetor de transformação utilizado para a transformação. Foi observado também que não ocorreu amplificação na amostra NT (não transformado, controle) e no controle negativo do ensaio (ausência de DNA molde). Foi importante conduzir essa análise, pois, os experimentos foram conduzidos com plantas T2, ou seja, originadas da germinação das sementes das linhagens transgênicas obtidas em trabalho preliminar realizado por ASSIS no ano 2018.

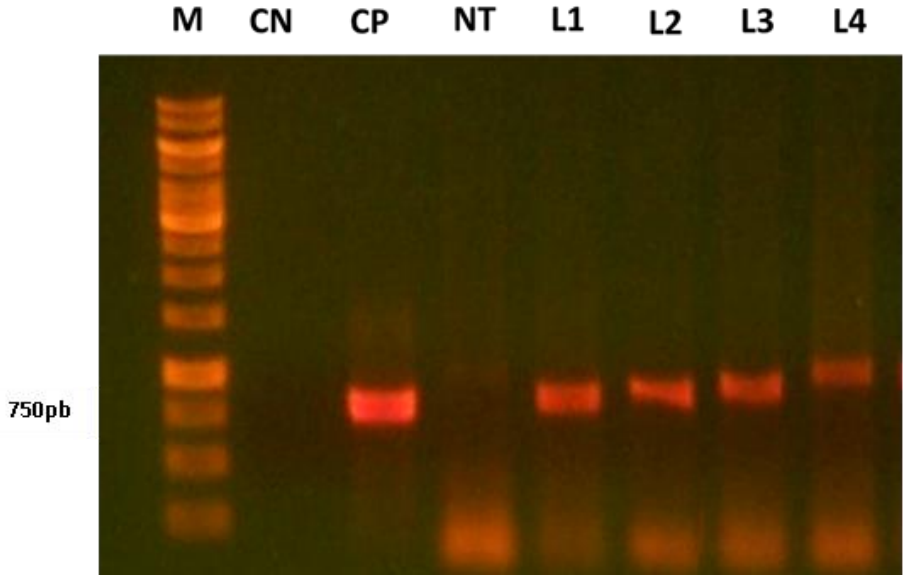

Fig. 1. Gel de agarose mostrando confirmação do estado transgênico de plantas T2. Fragmentos amplificados através de PCR, para primers específicos *nptII* (Neomicina Fosfotransferase). Onde (M) é o marcador (Gene Ruler de 1kb Plus DNA Ladder, ThermoFisher Scientific), (CN) Controle negativo – reação sem DNA molde, (CP) Controle positivo – reação utilizando DNA plasmidial, (NT) DNA molde de planta não transformada e (L1, L2, L3, L4) linhagens transgênicas.

6.2.Alterações anatomorfológicas na ausência de estresse

6.2.1. Área Foliar

As medidas da área foliar, das plantas transgênicas e controle, foram realizadas após 55 dias de cultivo sob condições controladas e sem indução de estresse. Nesse momento, as plantas estavam na fase de floração. Observamos que duas linhagens transgênicas, L2 e L3, apresentaram aumento significativo no tamanho da área foliar, em comparação com as plantas controle. Sendo que a área foliar da linhagem L3 foi ainda maior do que a observada em L2. Contudo, as plantas das linhagens L1 e L4 não apresentaram diferenças na área foliar quando comparadas com as plantas não transformadas. Linhas transgênicas L2 e L3 com diferença estatística, incremento de 47% e 70% respectivamente em relação com as plantas NT (Fig. 2).

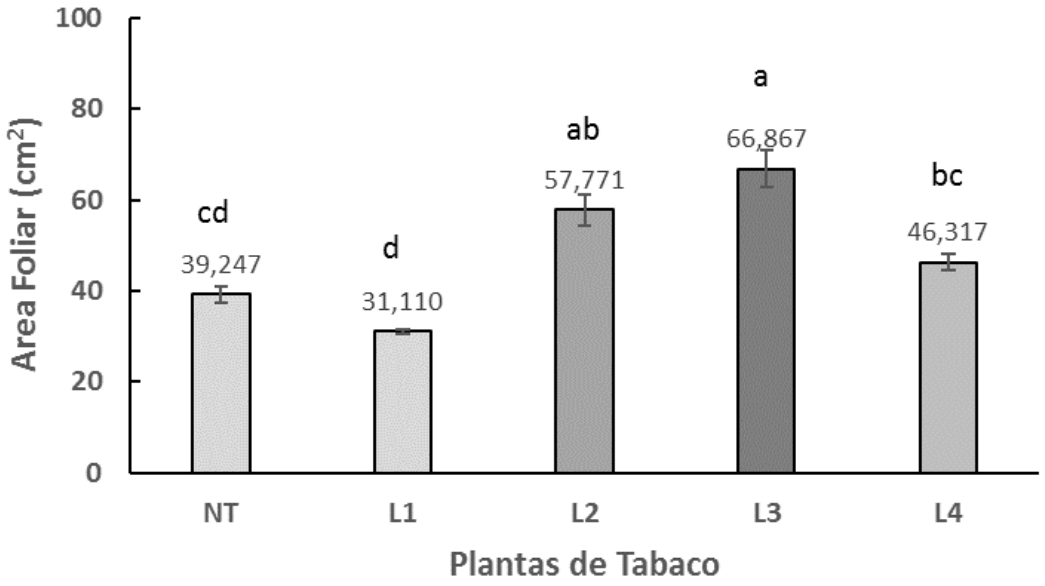

Fig. 2. Área foliar de *Nicotiana tabacum* expressando *EucXET*. Plantas não transformadas (NT) e transformadas com o gene *EucXET* (L1, L2, L3, L4). Colunas seguidas de mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p<0,01$). Dados representativo de 4 plantas por tratamento, aos 55 dias de cultivo.

Apesar de não ter sido medida a área foliar das plantas aos 30 dias de cultivo, as mesmas já apresentavam diferenças visíveis. A fig. 3, mostra 3 clones de cada linhagem, onde pode-se ver as diferenças no tamanho das folhas das linhagens L2 e L3 em comparação com a outras linhas e plantas não transformadas. No entanto, desde o início do desenvolvimento até a fase de floração, não foi possível observar diferença na altura das plantas (dados não mostrados).

Fig. 3. *Nicotiana tabacum* transformadas com o gene *EucXET* e plantas não transformadas. Fotos ilustrativas de 3 clones de cada linhagen (L1, L2, L3, L4) e plantas NT após 30 días de cultivo em condições controladas.

6.2.2. Tenacidade dos tecidos

Além das diferenças observadas em relação a área foliar, avaliou-se também a tenacidade dos tecidos, utilizando como parâmetro a resistência a perfuração via penetrômetro. As avaliações foram realizadas em plantas jovens (30 días) e em floração (55 días). Os tecidos analisados foram pecíolo, limbo foliar e caule. Verificou-se que existe diferença significativa na resistência a perfuração sendo geralmente os tecidos das plantas transgênicas, exceto pela L1, mais resistentes a perfuração do que os das plantas controle. As plantas da L1 não apresentaram diferença em comparação com as plantas controle (NT) (Fig. 4 A, B).

Dentre as plantas transgênicas, as linhagens L2 e L3 foram as que apresentaram maior resistência a perfuração, em todos os tecidos testados, comparado as plantas NT e linhagens L1 e L4 (Fig. 4 A). Essa diferença foi mais evidente no caule, onde as linhagens L2, L3 e L4 acrescentaram 76,01%, 145,59% e 47,64% respectivamente, ao valor médio das plantas NT. No entanto, a linhagem L1 não apresentou diferença significativa, incrementando apenas 7,48% a mais do que as plantas não transformadas. O mesmo padrão de resposta na tenacidade foi observado ao se avaliar os tecidos foliares e pecíolos.

Na fase de floração (plantas adultas) (Fig. 4 B), as linhagens transgênicas L2, L3 e L4 continuaram sendo as que apresentaram os valores médios de tenacidade mais elevados, principalmente no caule e nas linhagens L2 e L3. Nessas, observa-se o incremento de duas a três vezes no valor médio de tenacidade observado nas plantas não transformadas. Os resultados demonstraram também que nas linhagens L2, L3 e L4 quanto maior foi o tempo de cultivo maior foi a tenacidade nos tecidos, principalmente no caule. Contudo, o mesmo não foi observado para as plantas NT e linhagem L1 visto que essas não apresentaram incremento significativo entre as avaliações conduzidas com as plantas jovens (30 días) e adultas (55 días) (Fig. 4A e B).

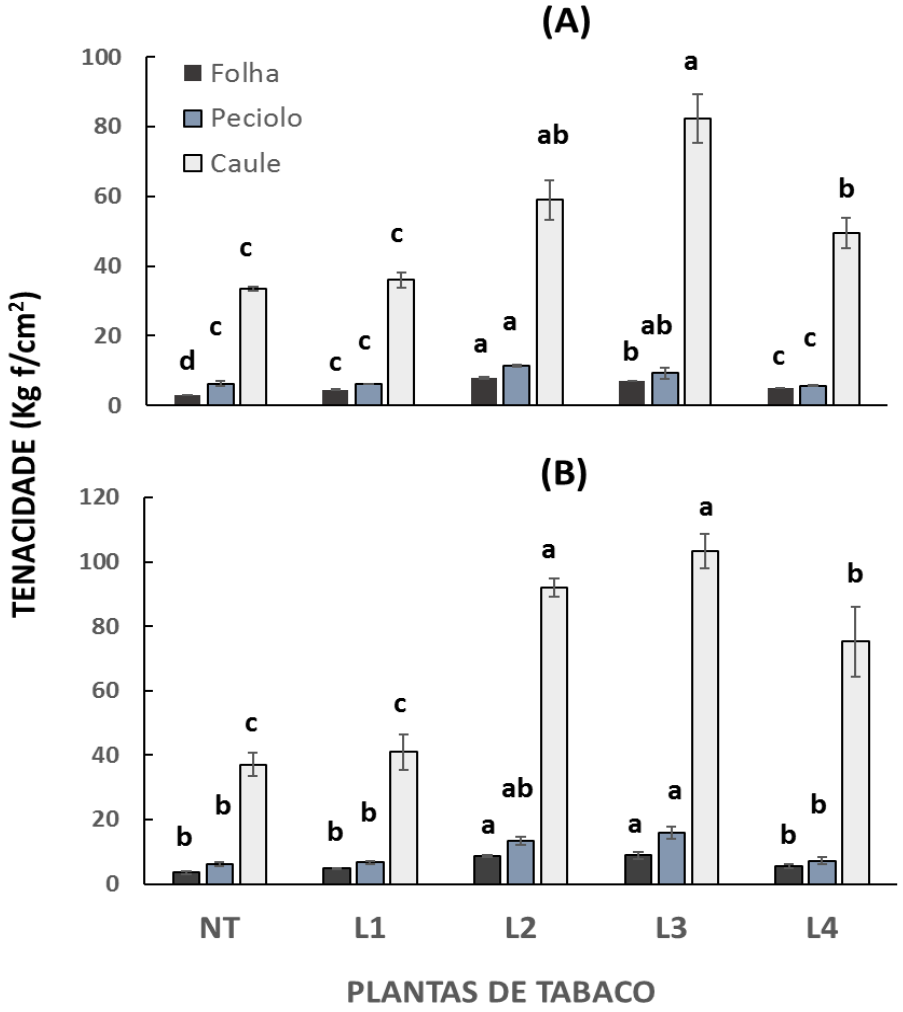

Fig. 4. Tenacidade de tecidos vegetais (folha, pecíolo e caule) em plantas de tabaco em duas fases de crescimento. Plantas não transformadas (NT); Plantas transformadas com o gene *EucXET* (L1, L2, L3, L4). Resistência à perfuração de tecidos vegetais, em plantas jovens de 30 días de desenvolvimento, fase vegetativa (A), e plantas adultas de 55 días de desenvolvimento, fase floração (B). Meias representativos de 4 plantas. Colunas seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p<0,01$).

6.2.3. Analise anatômica

Amostras de caule, das plantas NT (controle) e das linhagens que se mostraram mais resistentes no teste do penetrômetro (L2 e L3) foram analisadas anatomicamente via microscopia ótica. As amostras foram isoladas das plantas aos 55 dias de cultivo (floração). As laminas, coradas com dupla coloração (safranina e azul de astra),

evidenciaram que as linhagens transgênicas apresentaram uma porção lignificada no xilema (observar coloração vermelha) mais compacta do que a observada nos cortes das plantas NT (controle). Sendo os valores de 1205,663 µm em NT, 442,88 µm em L2 e 364,86 µm em L3 (Fig. 5). Além disso, a porção de celulose no xilema (observar coloração azul) foi notavelmente maior nas linhas transgênicas (Fig. 5). Ao se utilizar a coloração apenas com safranina, que cora lignina, observou-se que apesar da menor espessura do tecido xilemático nas plantas transgênicas, o mesmo apresentou maior intensidade na coloração vermelha. Esse resultado sugere maior deposição de lignina na parede das células do tecido xilemático (Fig. 6. A, B).

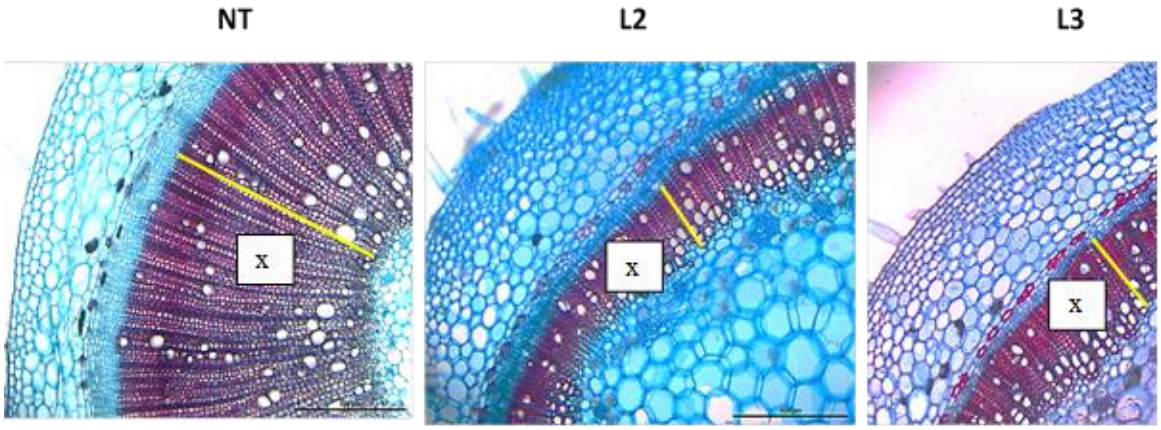

Fig. 5. Micrografias, corte transversal da porção basal do caule de linhas transgênicas transformadas como gene *EucXET* (L2 e L3) e planta não transformada (NT), cultivadas por 55 dias em sala de crescimento. Cortes histológicos com dupla coloração evidenciando a presença de lignina (cor vermelho - safranina); e celulose (azul - azul de astra). X, secção lignificada do tecido xilemático: 1205,663 µm NT, 442,88 µm L2 e 364,86 µm L3. Ampliação 500 µm, objetiva 10X.

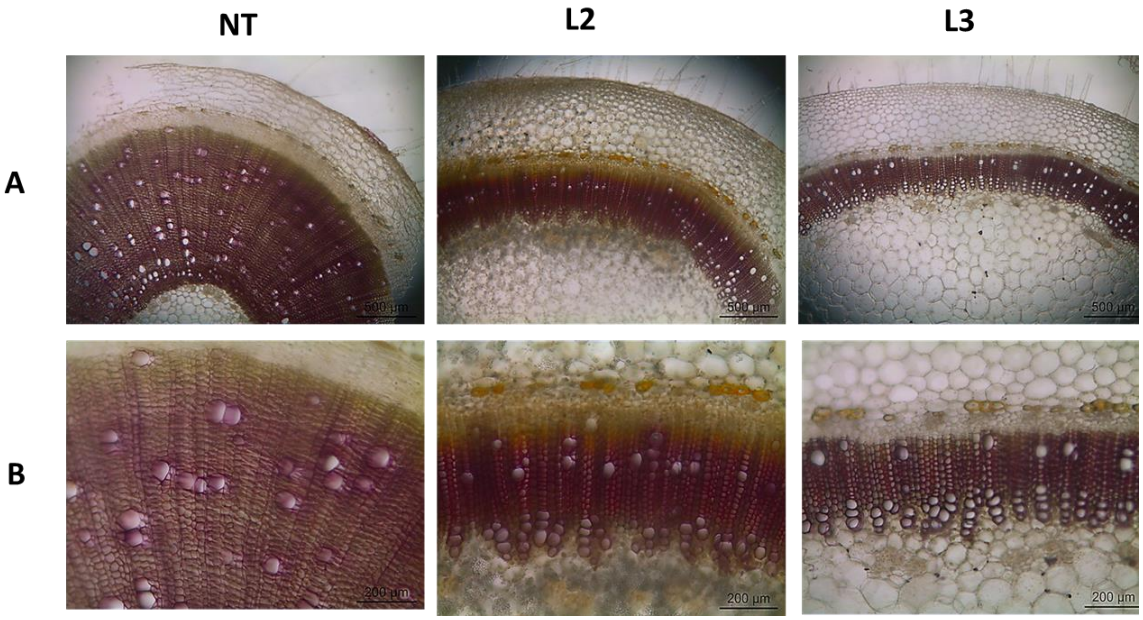

Fig. 6. Micrografias corte transversal da porção basal do caule de linhas transgênicas transformadas como gene *EucXET* (L2 e L3) e planta não transformada (NT), cultivadas por 55 dias em sala de crescimento. Cortes histológicos corados com safranina, porção do xilema com deposição de lignina no tecido caulinar, objetiva 10X, ampliação 500 µm (A). Coloração vermelha com diferentes intensidades na parede das células, objetiva 20X, ampliação 200 µm (B).

6.3.Atividade Enzimática Fenilalanina Amônia-liase (PAL) e Tirosina Amônia-liase (TAL)

Com base nesses resultados, a atividade de duas enzimas sabidamente envolvidas na síntese de lignina, foram dosadas em amostras de plantas NT (controle) e nas linhagens L1, L2, L3 e L4. As enzimas testadas foram PAL e TAL. As analises foram realizadas com amostras extraídas das folhas das plantas aos 55 dias de cultivo (floração). A atividade enzimática da PAL apresentou diferença altamente significantes, ao nível de 1%, entre as linhagens transgênicas (L2, L3 e L4) e as plantas controle. Observou-se que a atividade e maior nas linhagens L2, L3 e L4 em comparação com as plantas NT. Contudo, não houve diferença quando se comparou a linhagem L1 com as plantas não transformadas (Fig. 7).

A atividade enzimática TAL apresentou comportamento similar ao identificado para PAL. Observou-se aumento na atividade de TAL nas linhagens transgênicas L2 e L3. Contudo a linha L4 não apresentou diferença de L1, que por sua vez não apresentou diferença em relação com à atividade enzimática de plantas não transformadas (NT). Os valores mais baixos de atividade enzimática TAL (Fig. 8), foram apresentados pelas plantas não transformadas em comparação com as plantas transformadas com o gene *EucXET*.

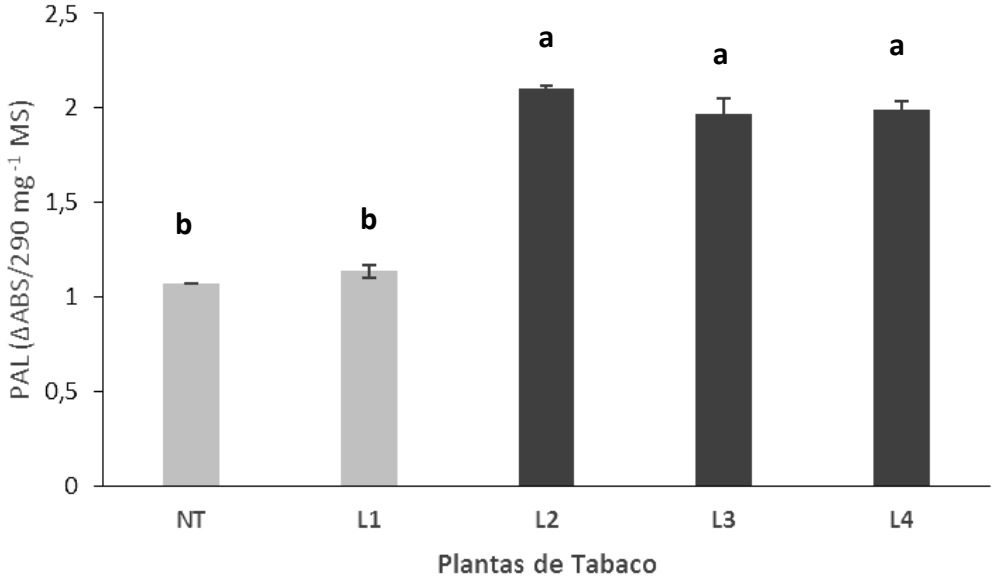

Fig. 7. Atividade da fenilalanina amônialiase (PAL) em plantas de tabaco não transformadas (NT) e plantas transformadas com o gene *EucXET* (L1, L2, L3, L4). Condições controle sem indutores de estresse, colunas seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p<0,01$).

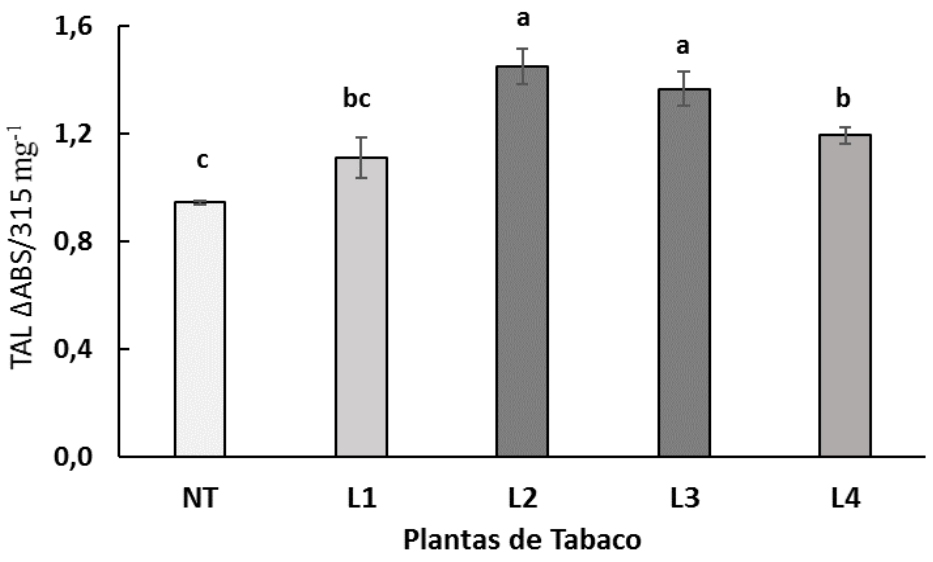

Fig. 8. Atividade da Tirosina Amônialiase (TAL) em plantas de tabaco não transformadas (NT) e plantas transformadas com o gene *EucXET* (L1, L2, L3, L4). Condições controle sem indutores de estresse, colunas seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p<0,01$).

6.4.Aterações fisiológicas na ausência de estresse: Trocas gasosas foliares

Visando avaliar se a transformação com o gene *EucXET* induz mudanças na fisiologia vegetal, em plantas transformadas (L1, L2, L3 e L4) comparadas com o controle (NT). Foram analisadas a taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (B), taxa transpiratória (C) e razão entre concentrações de CO2 intra/extracelular (D), utilizando o IRGA (infrared gas analyzer). As plantas submetidas ao experimento foram as mesmas utilizadas nas análises enzimáticas, anatômicas e de resistência a perfuração, ou seja, as mantidas 55 dias sob condições controladas e ausência de estresse.

A análise revelou que as linhagens L2, L3, L4 apresentaram diferenças quando comparadas as plantas não transformadas (Fig. 9). A taxa fotossintética líquida (A) das plantas L2 apresentaram aumento de 37%quando comparadas as plantas NT (Fig. 9A). Tais resultados são associados a aspectos difusivos uma vez que houve incrementos para a condutância estomática (gs) de 136% para L2 (Fig. 9B). A maior g_s em L2 refletiu em maior transpiração, porém sem efeitos substânciais na razão Ci/Ca (Fig. 9C e D). Apesar

dos impactos positivos nas trocas gasosas foliares para a linhagem 2, a transformação afetou negativamente L1, sem diferença para L3 e L4 em relação ao controle (Fig. 9). A linhagem 1 apresentou os menores resultados, em todas as análises conduzidas, quando comparado as demais linhagens e as plantas NT, contudo não foi verificada diferença significativa para a razão Ci/Ca.

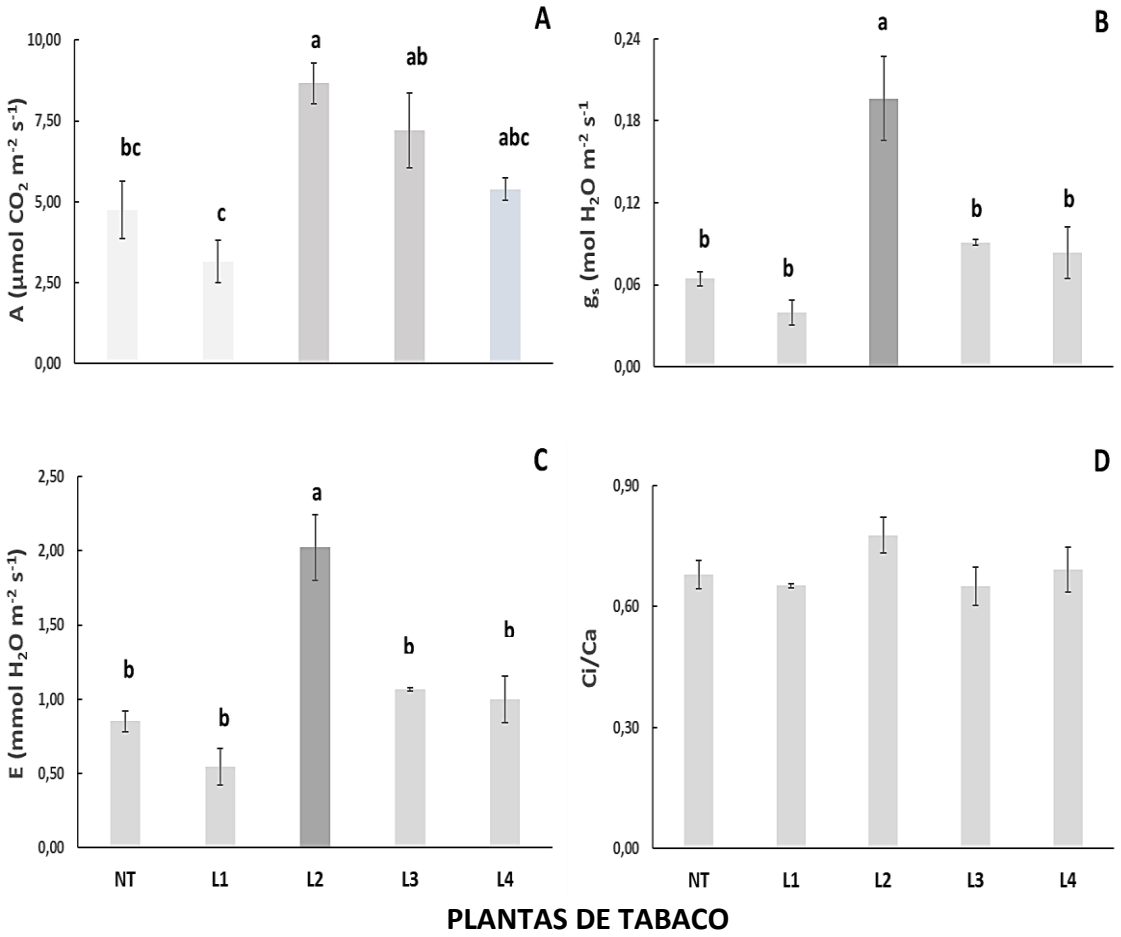

Fig. 9. Trocas gasosas foliares de plantas não transformadas (NT) e palntas transformadas com o gene *EucXET* (L1, L2, L3, L4). Taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (B), taxa transpiratória (C), Razão entre concentrações de CO2 intra/extracelular (Ci /Ca) (D). Colunas seguidas da mesma letra, não diferem entre si, nível de significacia1 % pelo teste de Tukey (p<0,01).

A apesar de não ter encontrado diferenças estatísticas significativas, observou-se que a alteração na fotossíntese, diretamente relacionada com a eficiência instantânea de carboxilação (A/Ci), foi maior nas plantas L2 e L3 quando comparada com as outras

linhagens e NT (Fig. 10A). As plantas L1 apresentaram redução em A/Ci apesar de não haver diferença significativa para a razão Ci/Ca o que indica uma possível limitação bioquímica associada a limitação estomática (Fig. 9D e 10A). Para as eficiências instantânea (A/E) e intrínseca (A/gs) no uso da água a redução significativa em L2 (Fig. 10B-C), está diretamente relacionada com os maiores valores de g_s (Fig. 9B). No entanto, as diferenças não foram significativas.

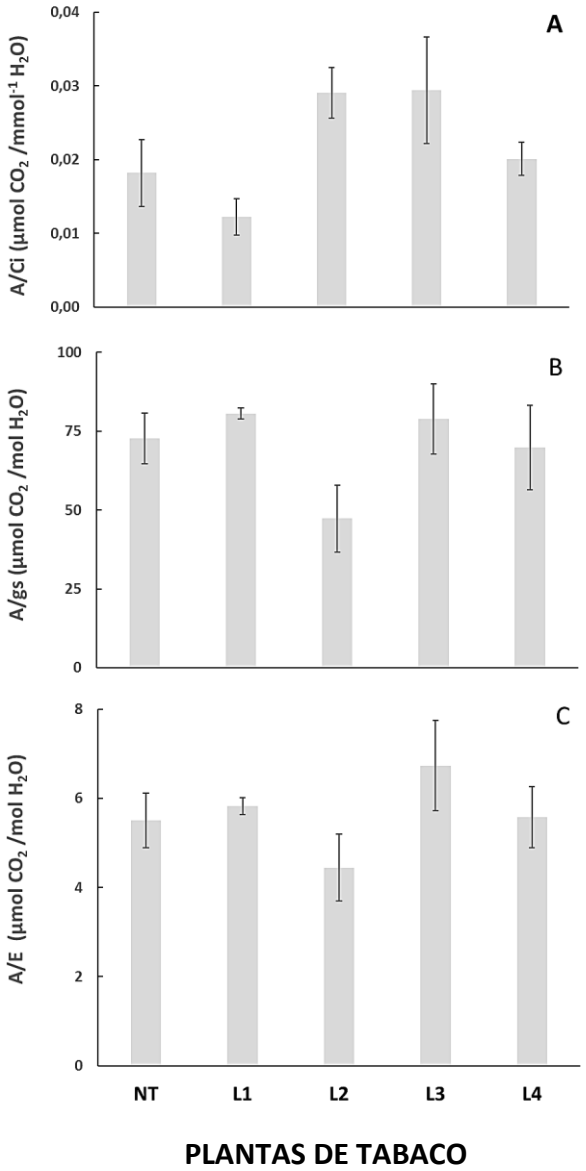

Fig. 10. Eficiência de carboxilação (A/Ci) (A); Eficiência intrínseca (Ags) (B) e instantânea do uso da água (C). Experimento conduzido em triplicata. Colunas seguidas das mesmas letras não tem diferença ao nível de significância de 1% pelo teste de Tukey ($p<0,01$).

6.5.Analise proteômica

6.5.1. Perfil Proteico SDS-PAGE, eficiência da extração de proteínas.

O extrato proteico total foi extraído de folhas e caule das plantas NT e de todas as linhagens transgênicas. O método utilizado para extração proteica foi o estabelecido por Pirovani e colaboradores (2008). Essa metodologia mostrou-se eficiente para a extração de proteínas de folha, mas não de caule (Fig. 11). A análise do perfil proteico das amostras demonstrou bandas definidas em todas as amostras provenientes de tecido foliar (NT, L1, L2, L3 e L4) e distribuídas entre 14 e 97 KDa. Todas as amostras apresentaram um maior número de bandas proteicas na faixa entre 30kDa e 45KDa. Contudo, as linhagens transgênicas, em especial a L2, apresentaram bandas mais intensas próximo a 30 KDa. As extrações proteicas a partir de tecido caulinar (L2c, L3c) teve um rendimento insuficiente para as analises proteômicas. Cabe ressaltar que o peso molecular do *EucXET* é de 33,9kDa.

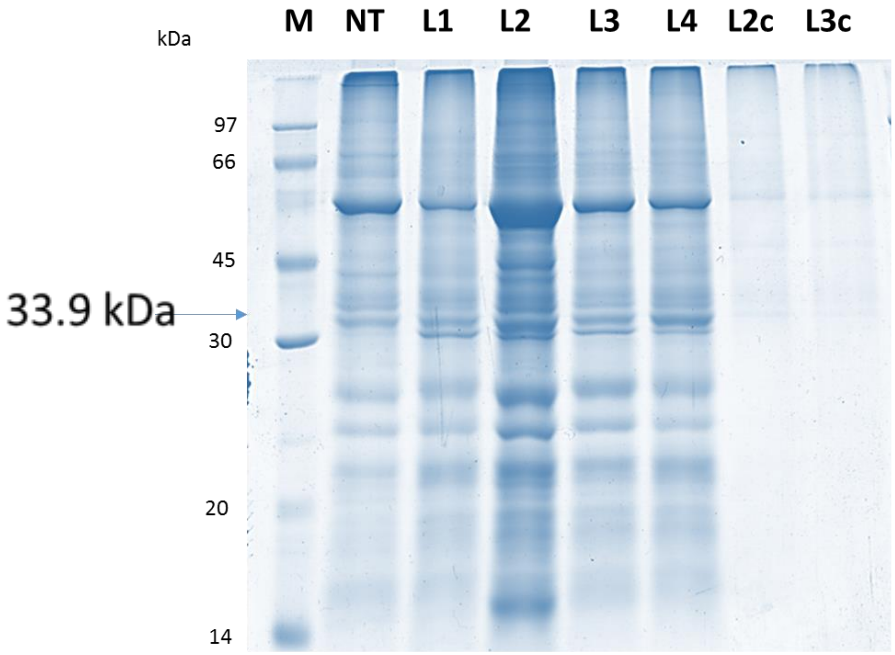

Fig. 11. SDS-PAGE, qualidade da proteína de Plantas de Tabaco. M – Marcador de peso molecular (14-97KDa) GE Healthcar; NT- extrato proteico foliar de plantas não transformadas; L1, L2, L3, L4 - extrato proteico foliar de 4 linhagens transgênicas; L2c, L3c - extrato proteico caulinar de plantas da linha trasgênica 2 e linha trasgenica 3. Extração de proteína foliar pelo método fenólico (PIROVANI et al., 2008).

6.5.2. Perfil Proteico SDS-2D, proteínas diferencialmente expressas

Nas análises anatômicas, histológicas, de atividade enzimática e trocas gasosas observou-se diferenças significativas entre as linhagens transgênicas e as plantas não transformadas. De todas as linhagens testadas, a L2 foi a com maior diferença nos parâmetros mensurados, comparativamente com as plantas controle. Por este motivo, esta linhagem foi selecionada para ter o perfil proteico bidimensional revelado e comparado com o das plantas controle (NT). Foram submetidas a separação bidimensional 350 µg de proteína, representativas da L2 e NT. Verificou-se, na analises comparativa entre os géis, a presença de *spots* de boa qualidade, bem focalizados, bem como diferença na intensidade e número de *spots* visualizados (Fig. 12). A menor quantidade de *spots* foi identificada no gel das plantas NT (130 *spots* detectados). Em contrapartida foram observados 162 *spots* na linhagem L2, 20% mais *spots* que o controle. A intensidade diferencial e maior quantidade de *spots* foi evidente no pH de 4 a 5, faixa acida e na faixa de peso molecular de 45 a 30kDa.

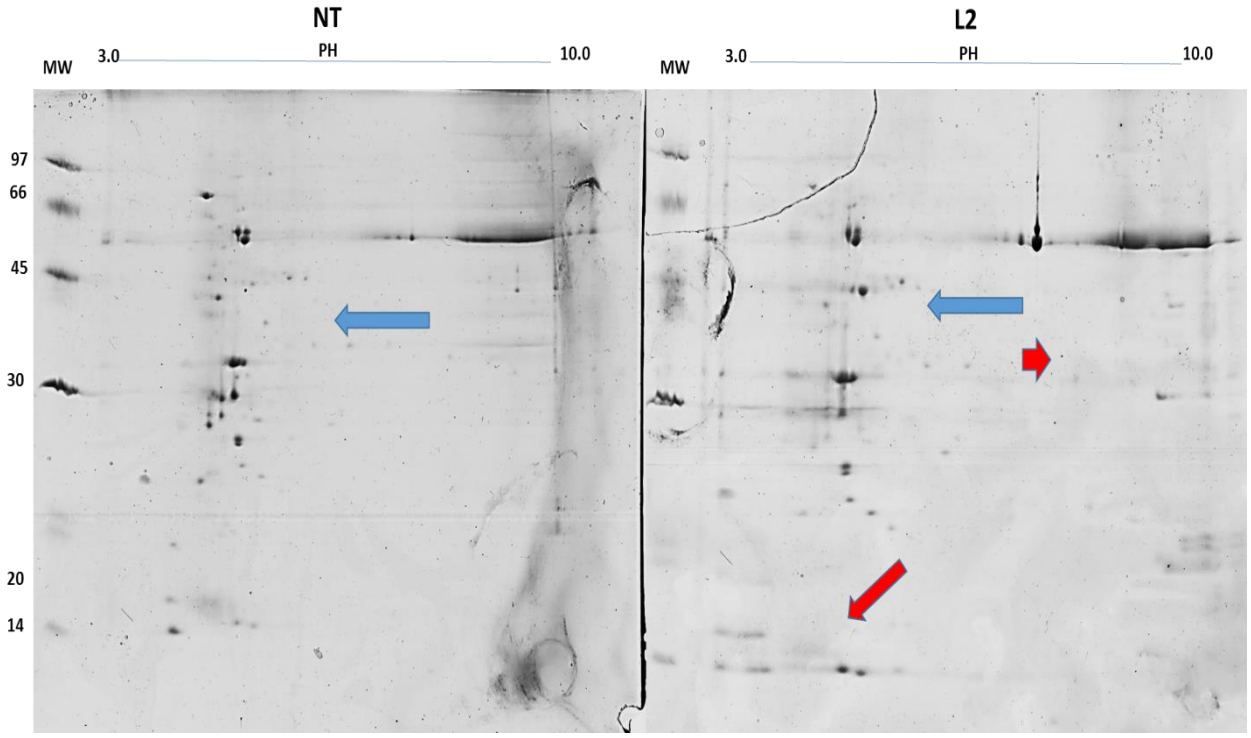

Fig.12. Perfil protéico bidimensional de folhas de folhas *Nicotiana tabacum*. Amostras focalizadas em strips de 13cm e PH de 3.0 a 10.0 NL. Separadas em segunda

dimensão em gel de poliacrilamida 12,5%. NT - Planta não transformada e L2 – linha transgênica, planta transformada com o gene *EucXET*; MW - valor massa molecular em kDa. As setas azuis sinalizam a faixa onde foi observado a maior quantidade de *spots;* as setas vermelhas sinalizam as diferenças mais contrastantes entre a linhagem L2 e plantas não transformadas NT.

Verificou-se que as distribuições dos *spots* de acordo com o gradiente de pH, apresentou diferenças entre a linha L2 e controle NT (Fig. 13A). A maior parte dos *spots* foi observado entre os valores e 4-5 e 9-10, com ênfase para a linha transgênica com percentagem de 12% a mais na faixa de 4-5 e 42% na faixa de 9-10. O padrão de frequência dos *spots* em todas as faixas, foi superior para a linha transgênica. Na distribuição dos *spots* de acordo com a massa molecular (MW), obsevou-se que a maioria dos *spots* detectados foi visualizada na faixa de 30 a 60 kDa, tanto para L2 quanto para o controle NT, com destaque para a linha transgênica com 32% a mais do que o controle (Fig. 13B).

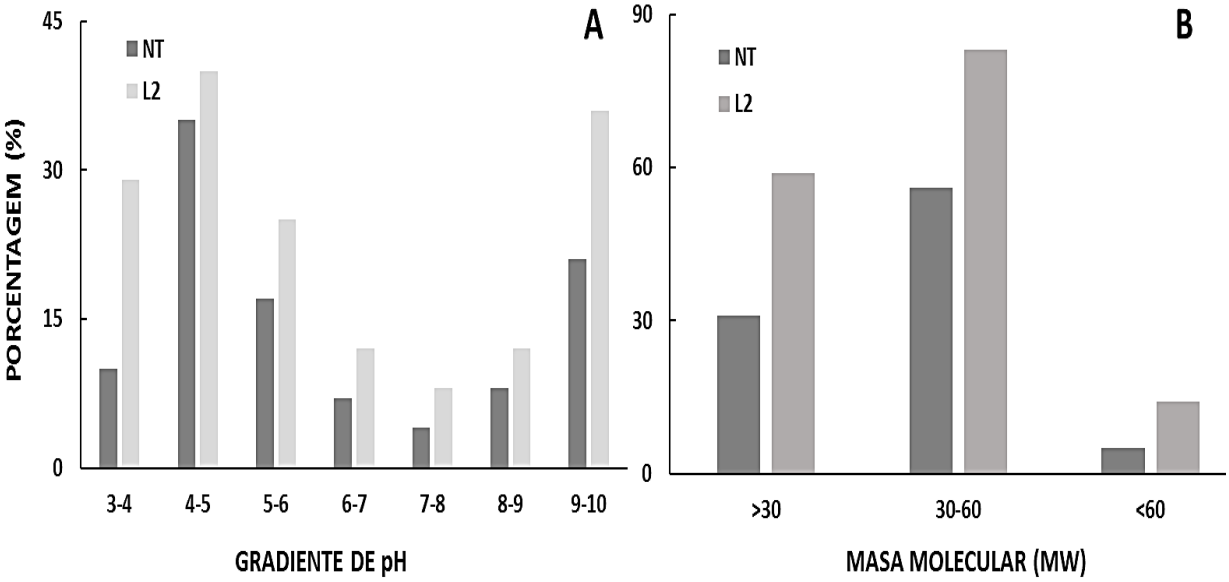

Fig. 13. Frequência de distribuição de *spots* de acordo com o gradiente de pH (A). Distribuição de *spots* de acordo com a massa molecular (MW) (B). Amostras de proteína obtidas a patir de folhas de plantas transformadas com o gene *EucXET* linhagem L2 e plantas controle, não transformadas NT.

A partir do perfil proteico e diagrama de Venn (Fig. 14) foi possível obter uma comparação, detectando-se 107 *spots* exclusivos para a linha transgênica L2 e 75 *spots* exclusivos para a plantas não transformada NT. Nesta comparação 55 *spots* foram comuns e 35 diferencialmente acumulados entre plantas transformadas e não transformadas.

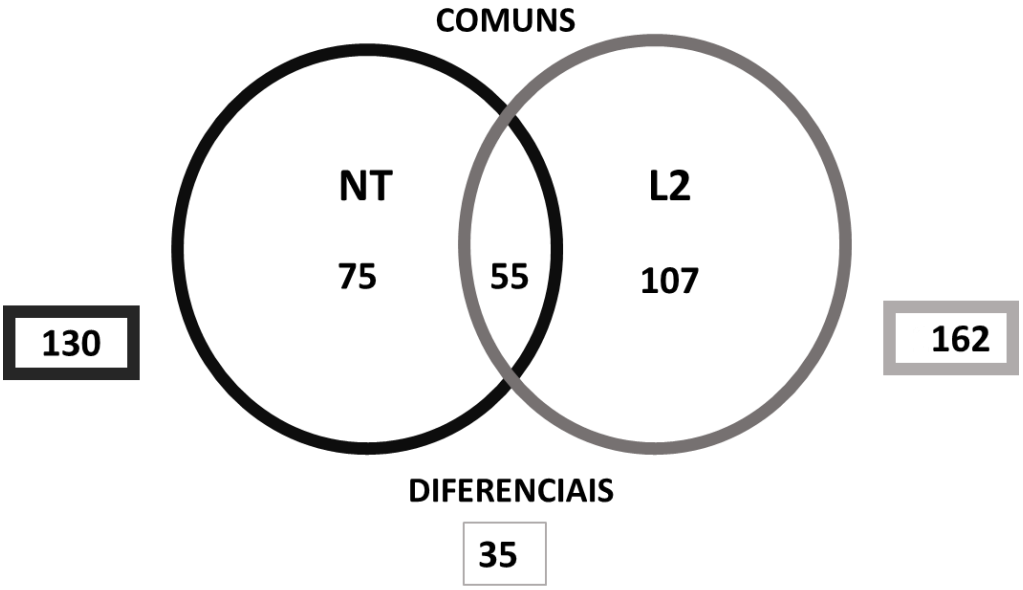

Fig. 14. Diagrama de Venn, mostrando a distribuição dos *spots* de amostras foliares, detectados nos géis bidimensionais. *Spots* exclusivos, comuns e diferencialmente expressos para a linhagem transgênica L2 e plantas não transformadas NT.

6.6.Plântulas de tabaco expressando *EucXET* apresentan tolerância ao estresse salino

Observou-se diferença no tamanho das folhas e coloração das plântulas de linhagens transformadas, principalmente evidentes para MS0 e NaCl, diretamente relacionado com os resultados obtidos no conteúdo de biomassa e conteúdo de clorofila. De fato, as plântulas mantidas em placas de Petri, submetidas ou não a estresse, apresentaram diferenças na coloração e no tamanho, a depender dos diferentes meios de cultura (Fig. 15). Evidenciou-se que o meio acrescido com manitol impacta o crescimento e também induz a clorose acentuada das plântulas, transgênicas e controle. Contudo, as linhagens

transgênicas, especialmente a L2 e L3, conseguiram sustentar o crescimento e uma coloração menos clorótica na presença do NaCl. Nesse meio, observa-se ainda que as plântulas L1 e L4 possuem comportamento parecido entre si e são menos impactadas do que as plântulas controle.

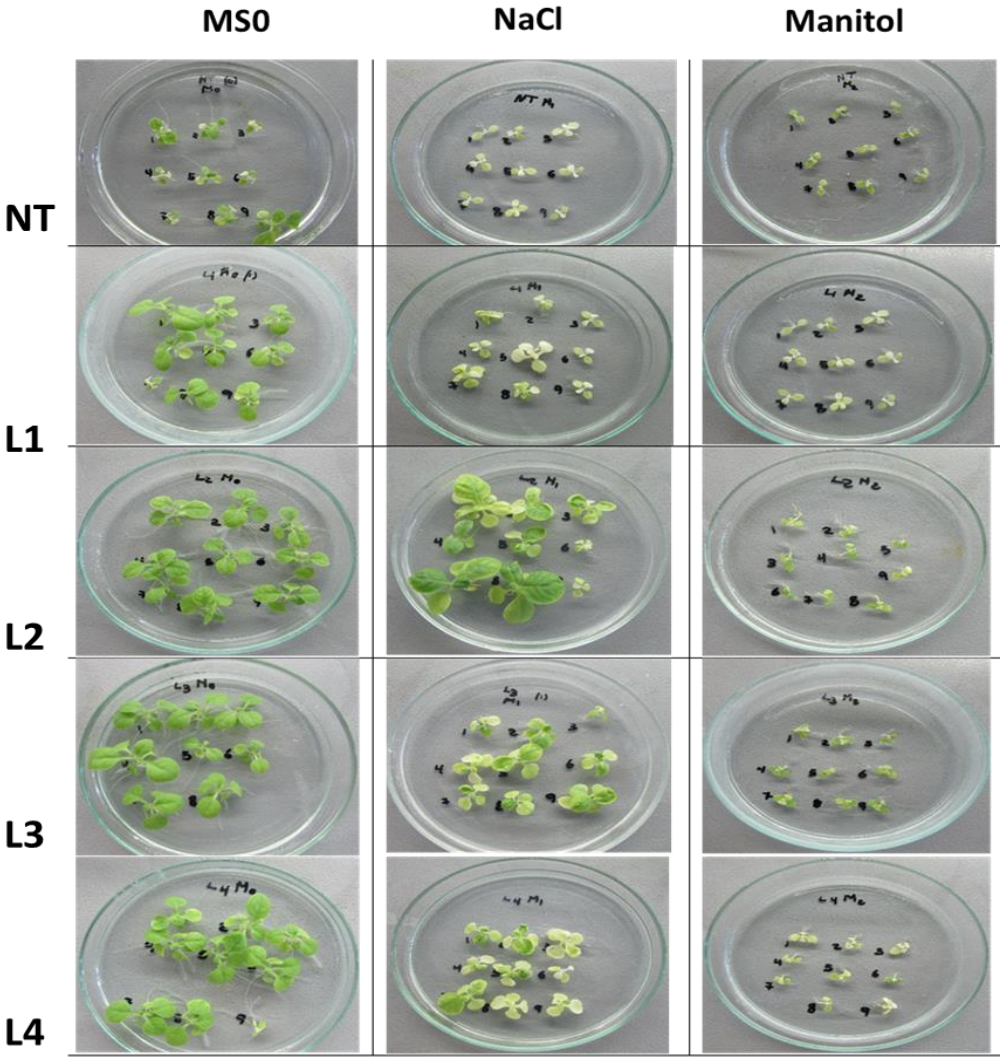

Fig. 15. Tolerância de planta expressando *EucXET* e controle a estresse osmótico. Plântulas não transformadas (NT) e transformadas com o gene *Euc*XET (L1, L2, L3, L4) sob condições controle (MS0) e de estresse osmótico (-1MPa), induzido por NaCl e Manitol. Fotos ilustrativas das plântulas após 30 días nos meios de cultura.

6.6.1. Biomassa Seca

Na análise do peso de biomassa seca de plântulas de tabaco (Fig. 16) crescidas na presença de indutores de estresse, observou-se que as linhagens transgênicas e as plantas

não transformadas apresentaram pesos diferentes a depender do tratamento. No meio controle (MS0) verificou-se que as linhagens transgênicas apresentaram peso maior do que as plantas NT. Foi identificado que as linhagens L2 e L3 foram as que apresentaram os maiores valores de biomassa seca, seguida das linhagens L1 e L4 e por fim as plantas NT (Fig. 15). Cabe ressaltar que este padrão de desenvolvimento foi semelhante às plantas avaliadas mantidas *ex vitro* (Fig. 3).

Ao analisarmos o impacto dos indutores de estresse (NaCl e Manitol) no crescimento das plântulas, observamos que plântulas das linhagens L2 e L3 foram as que apresentaram maior peso quando crescidas em NaCl. Não observamos diferenças significativas nos pesos de biomassa das plântulas L1 e L4. No entanto as linhagens transgênicas apresentaram peso maior em comparação com as plântulas não transformadas. As plântulas L2 e L3 também foram as que apresentaram o maior peso seco quando crescidas na presença de manitol. As linhagens L1 e L4 apresentaram o peso significativamente menor do que a L2, mas maior do que a NT.

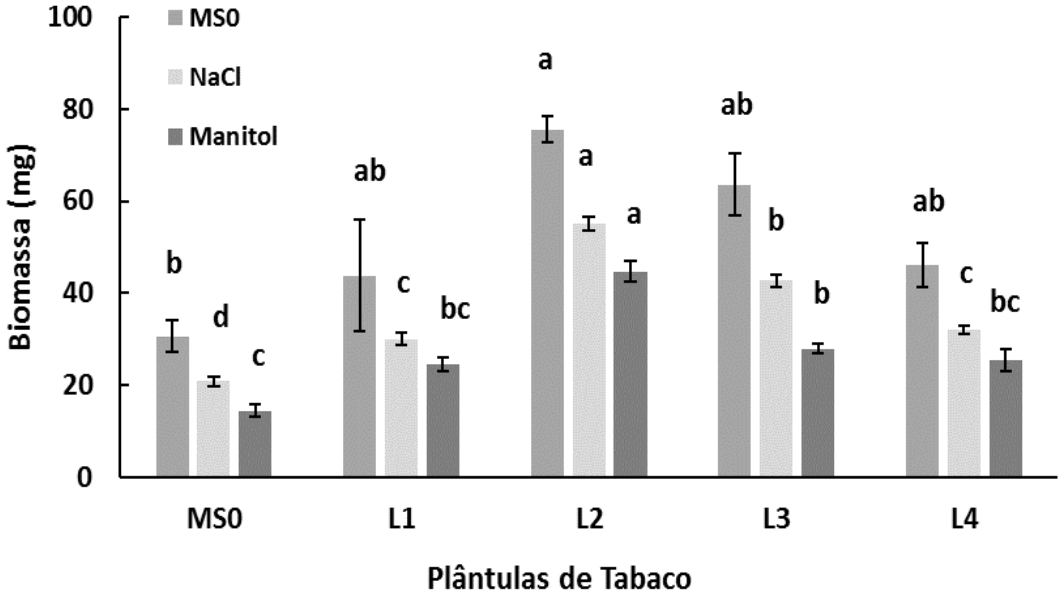

Fig. 16. Peso seco de biomassa de plântulas de *Nicotiana tabacum* transformadas com o gene *EucXET* (L1, L2, L3, L4) e plântulas não transformadas (NT), sob estresse osmótico. Condições controle (MS0) e de estresse osmótico (-1MPa), induzido por NaCl e Manitol; valor médio de peso seco de biomassa. Colunas seguidas da mesma letra, não diferem entre si ao nível de significância de 1% pelo teste de Tukey ($p<0,01$).

6.6.2. Conteúdo de Clorofila

As plântulas submetidas ao estresse tiveram também os teores de clorofilas “a” e “b” quantificados, como maneira indireta de mensurar a sensibilidade das mesmas aos agentes estressores (Fig. 17). Observou-se que, quando mantidas em meio MS0, todas as plântulas apresentam quantidade similar de clorofila “a” sendo essa elevada, comparativamente com a observada nos demais tratamentos. O crescimento das plântulas na presença de NaCl afetou negativamente o teor de clorofila “a” em todas as plântulas, o controle (NT) e as transgênicas. A linhagem L2 foi a que apresentou menor diminuição no teor de clorofila “a” em resposta ao tratamento com NaCl. As NT e as linhagens L1, L3 e L4 foram mais impactadas pelo NaCl apresentando quantidades similares de clorofila “a” (Fig. 17A). Observou-se também que o manitol impactou drasticamente e de maneira similar o teor de clorofila “a” de todas as plântulas testadas (NT e transgênicas). Cabe ressaltar que o impacto do manitol na quantidade de clorofila “a” foi maior do que o observado no tratamento com NaCl, apesar de ambos os meios de cultura apresentarem o mesmo potencial osmótico (-1Mpa).

O comportamento do conteúdo de clorofila “b” foi diferente do observado para clorofila “a”. Foi visto que todas as plântulas transgênicas mantidas em meio MS0 (ausência de estresse) apresentam teor de clorofila “b” maior do que o presente nas plantas controle (NT). Sendo a linhagem L2 a com maior teor (até 40% acima das demais linhagens e o dobro das plantas não transformadas), seguida das L3 e L1 e pôr fim a L4. Sob estresse induzido por NaCl as linhagens L3 e L2 foram as que apresentaram os maiores teores de clorofila “b”, respectivamente (Fig. 17B). Em seguida os maiores valores foram observados nas linhagens L1 e L4. As NTs foram as plântulas com menor conteúdo de clorofila “b”. Essas diferenças não foram observadas no tratamento com manitol. Nesse todas as amostras foram drasticamente afetadas não apresentando diferença significativa nos valores dosados de clorofila “b”.

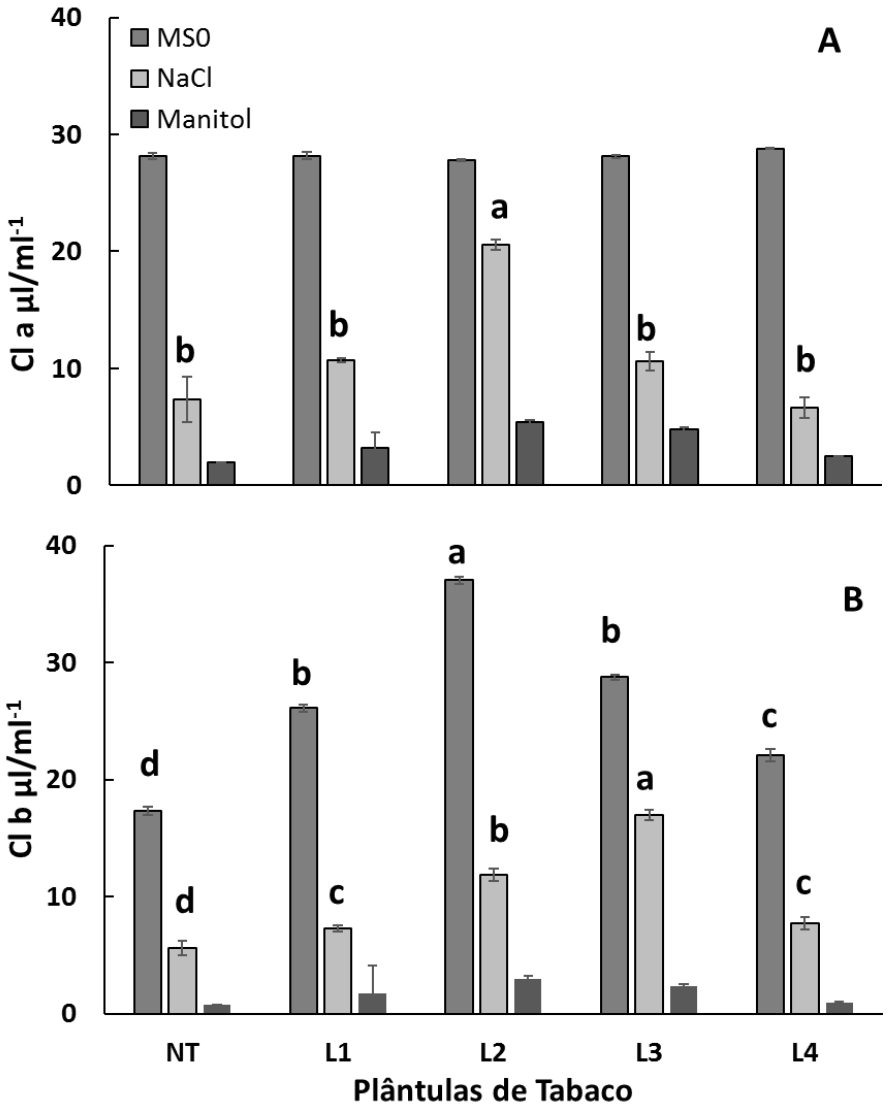

Fig. 17. Conteúdo de clorofila, em plântulas de *Nicotiana tabacum* transformadas com o gene *EucXET* (L1, L2, L3, L4) e plântulas não transformadas (NT) sob estresse osmótico. Condições de estresse osmótico (-1MPa), induzido por NaCl e Manitol. Conteúdo de clorofila "a" (A); conteúdo de clorofila "b" (B). Colunas seguidas de mesma letra, não diferem entre si ao nível de significância de 1% pelo teste de Tukey ($p<0,01$).

6.6.3. Comprimento da Raiz

O comprimento da raiz das plantas foi medido como fator indireto relacionado ao aumento de tolerância a estresse osmótico. Observou-se que na ausência de estresse (meio MS0) as plântulas das linhagens L2 e L3 apresentaram as maiores raízes

comparativamente com as demais plântulas. Todas as plântulas tiveram o crescimento das raízes impactado negativamente quando crescidas na presença dos indutores de crescimento NaCl ou manitol. Contudo, na presença de NaCl observamos que as linhagens L1, L2 e L3 foram as que apresentaram as maiores raízes. Nesse tratamento, não observamos diferença significativa entre as raízes da linhagem L4 e controle (NT). Não observamos diferença significativa estatisticamente no tamanho das raízes das plântulas crescidas com manitol (Fig. 18).

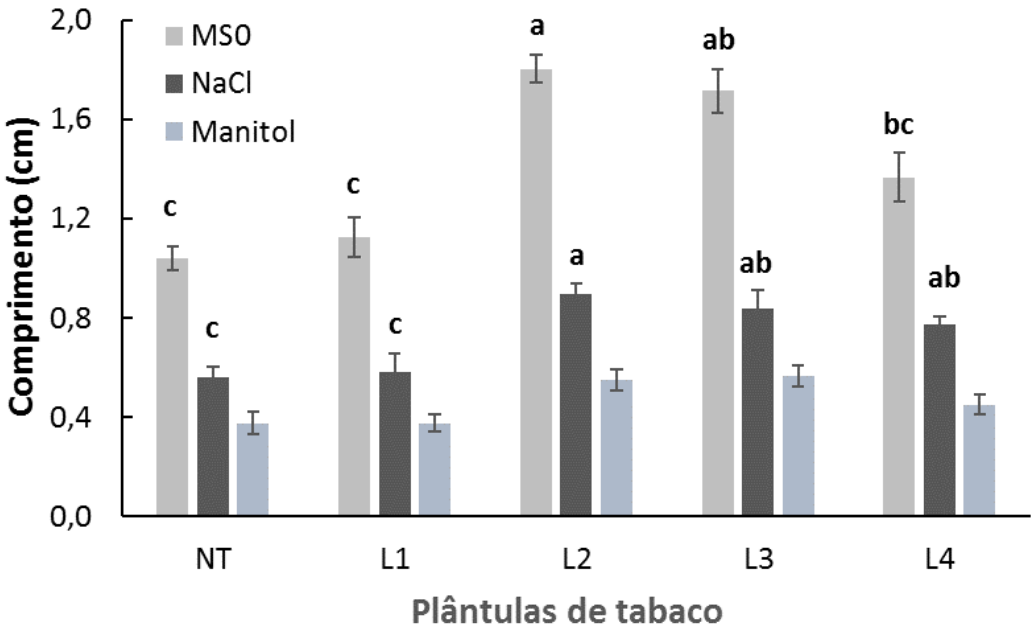

Fig. 18. Crescimento de raízes em plântulas de *Nicotiana tabacum* transgênicas (L1, L2, L3, L4) e controle (NT) sob estresse osmótico. Condições controle (MS0) e de estresse osmótico (-1MPa) induzido por NaCl e Manitol.Valor médio de **c**omprimentos de raiz (27 plântulas por tratamento por linha). Colunas seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo Tukey $p<0,01$.

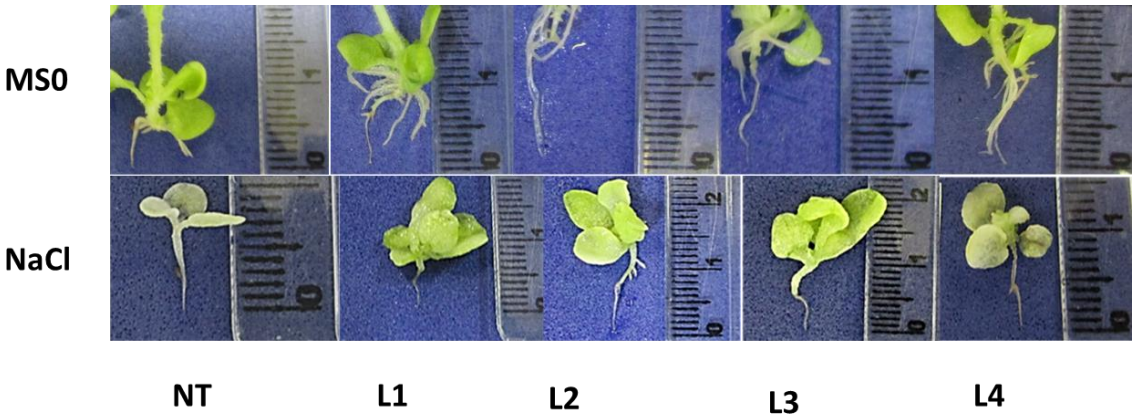

Fig. 19. Analise comparativa de raízes de plantulas de *N. tabacum* transgênicas e controle crescidas sob estresse salino. Plântulas de tabaco não transformadas (NT) e transformadas com o gene *EucXET* (L1, L2, L3, L4) sob condições controle (MS0) e de estresse osmótico (-1MPa), induzido por NaCl. Fotos ilustrativas das plântulas após 30 días nos meios de cultura.

As diferenças observadas sugerem que a expressão do gene *EucXET* pode induzir o crescimento das raízes o que acaba por de maneira indireta aumentar a tolerância das plântulas ao estresse induzido por NaCl (Fig. 18 e 19).

A tabela 1 mostra que as plântulas transgênicas se comportaram de maneira diferente das não transformadas quando cultivadas em meios de indução de estresse. Observa-se que a biomassa seca total das plantas (BS) foi diferente em todos os tratamentos. O comprimento de raiz (CR) foi diferente no meio controle (MS) e acrescido de cloreto de sódio (NaCl). Mas no acrescido de manitol (MN) não observamos diferença significativa. Verificou-se também diferenças significativas no conteúdo de clorofila “b”, no meio controle MS0 e no meio com indutor cloreto de sódio NaCl. A diferença no conteúdo de clorofila “a” só foi observada nas plântulas crescidas em meio com indutor NaCl. No meio com indutor de estresse manitol não houve diferença no conteúdo de clorofila “a” e “b”. Os coeficientes de variação se encontram dentro dos parâmetros para avaliações realizadas em condições de laboratório.

A interação entre os fatores de linha transgênica e meio de cultivo para biomassa seca, comprimento de raiz, e conteudo de clorofila não foi significativa. Portanto, o efeito dos

fatores é independente, sendo L2 e L3 as linhas transgênicas com os valores medios mais altos obtidos nos meios MS0 e NaCl, quando comparadas com as outras linhagens e plantas não transformadas. Esses resultados coinciden com os resultados observados em plantas avaliadas em condições *ex vitro*.

Tabela 1. ANOVA dos tratamentos do estresse osmótico em plântulas de quatro linhagens transgênicas e plantas não transformadas, para biomassa seca total (BS), comprimento de raiz (CR) e conteúdo de clorofila (CC): clorofila "a", clorofila "b".

FV	**QM**			
			CC	
	BS	**CR**	**a**	**b**
MS0	933,563*	3,151*	0,387NS	164,563*
NaCl	363,398*	0,123*	92,443*	62,711*
MN	358,411*	5,525NS	6,515 NS	2,613NS
CV%	**32,157**	**1,237**	**0,169**	**0,112**

FV: fontes de variação, QM: quadrado médio, CV%: coeficiente de variação, NS: não significante, *: significante, valores de F significativos a 1% de probabilidade para todas as variáveis.

7. DISCUSSÃO

A atividade enzimática XET, tem sido localizada principalmente em zonas de crescimento e expansão celular, de folhas, primórdios das raízes e desenvolvimento dos tecidos vasculares (ROSE et al., 2002; MIEDES, 2011). Estudos realizados em membros da família XTH de *Hordeum vulgare* resultaram diferencialmente expressos para tecido foliar e foram relacionados com alongamento das folhas (FU et al., 2019). Do mesmo modo a perda da funcionalidade do gene AtXTH27 em *Arabidopsis* provoco alterações no fenótipo das folhas, com lesões (pela morte de células) e defeitos no padrão dos elementos traqueais, no entanto não foram observadas alterações na área foliar (MATSURI et al., 2005). No presente trabalho, plantas de tabaco transformadas com o gene *EucXET*, apresentaram aumento na área foliar desde os primeiros estágios de crescimento. Essas alterações possivelmente estão relacionadas com aumento no nível de XET, provocando a expansão celular neste tecido e derivando no incremento na área foliar. A supressão de *XTH21* levou a uma redução na expressão de CESA2 e CESA4 em *A. thaliana* (genes CESA/CSL, CELLULOSE SYNTHASE que catalisam a síntese de celulose e hemicelulose). Bem como a supressão genes ERECTA (ER) relacionada com mudanças significativas na forma tamanho e anatomia foliar, tem sido associados com a expressão conjunta e coordenada dos genes XTH (WERADUWAGE et al., 2018).

Enfoques de ganho e perda de função de enzimas vasculares XTH4 e XTH9 em *Arabidopsis*, a traves de análise da inflorescência das paredes celulares do caule, revelaram alterações na composição de lignina, celulose e açúcar da matriz, indicando aumento geral das paredes secundarias e aumento radial do xilema (KUSHWAH et al., 2020). Linhas transgênicas transformadas com o gene *EucXET* apresentaram aumento na tenacidade dos tecidos foliar, peciolar e caulinar, durante a fase vegetativa e fase de floração, principalmente nas linhas L2 e L3, em comparação com as plantas controle. Bem como micrografias feitas da porção basal do caule evidenciaram um possível aumento na deposição de lignina nas paredes celulares do xilema das linhas transgênicas, tecido lignificado, em uma região mais compacta, no presente trabalho. Esses resultados provavelmente estão relacionados com aumento no conteúdo basal de lignina nas células dos tecidos traqueais. Mais importante ainda sugere, a deposição de lignina como mecanismo de adaptabilidade (VAAHTERA, SCHULZ, HAMANN, 2019), atribuindo o aumento de tecido lignificado com o aumento dos níveis basais de resistência mecânica

nas plantas das linhagens transgênicas. As enzimas PAL e TAL, são consideradas enzimas-chave no metabolismo dos fenilpropanoides, do qual se deriva a síntese de lignina. O aumento na atividade está relacionado à acumulação de compostos como resposta de defesa a tensões bióticas e abióticas. Fornecendo proteção dos tecidos das plantas, reforçando as barreiras físicas com aumento da lignificação da parede celular (MORA, 2016; BEVILAQUA, 2017; DIAZ et al., 2018; BEZERRA et al., 2020). Essas enzimas apresentan aumento da atividade em linhas transgênicas L2 e L3 no presente trabalho. Sugerindo-se que a mudança na lignificação das paredes celulares e possível aumento de resistência em linhagens transgênicas é mediada pelo gene *EucXET* como resultado da sua expressão. Isso pode estar relacionado com os resultados descritos por ASSIS (2018) onde foi registrado acúmulo de H_2O_2 e aumento na atividade GPX, em plantas T1 trasformadas com o gene *EucXET*, principalmente em L3. O H_2O_2 é um ROS (espécies reativas de oxigênio) vital em los processos biológicos que levam à tolerância contra vários tipos de estresse e é considerado um componente essencial na reação de formação oxidativa de lignina (ASSIS, 2018). Da mesma maneira a enzima GPX está associada com biossintese de etileno, cicatrização de feridas, defesa com estresse e à biossíntese de lignina na parede celular (SHARMA et al., 2012; MORA, 2016).

Cadeias carbonadas, ou carboidratos, são utilizados em diversas rotas metabólicas do vegetal, bem como na síntese de outros compostos orgânicos, que constituirão a estrutura do vegetal. Quando a produção de carboidratos é elevada, além da capacidade de síntese destas rotas metabólicas, nem todos os esqueletos carbonados produzidos são utilizados, acumulando-se na planta (KRISHNAN et al., 2007; WALTER, ROSA, STRECK, 2015). O aumento na taxa fotossintética e condutância das linhagens transgênicas principalmente L2, reflexa a eficiência no processo de carboxilacão, síntese e produção de biomassa no presente trabalho. Aparentemente a eficiência no processo da carboxilacão aumentam a expressão de proteínas de armazenamento, bem como endo-xiloglucana transferase e endotransglicosidase xiloglucana (XET) ambas envolvidas na incorporação de xiloglucanos secretados recentemente nas paredes celulares (COSGROVE, 2000; DE LA MATA et al., 2012). A família do gene xiloglucano endotransglucosilase/hidrolases (XTH) está baseada na classificação de enzimas ativas de carboidratos (CAZy). Estudos nessas enzimas em perfis de transcrição de álamo e Arabidopsis, revelaram uma inesperada importância, na reciclagem interna de carbono. Assim PttXET16A do álamo desempenha um papel na reestruturação de paredes primárias durante a deposição de

camadas de paredes secundárias, provavelmente criando e reforçando as conexões entre as camadas de paredes primárias e secundárias (KUSHWA et. al., 2020).

Os genes XTH estão associados à resistência de plantas ao estresse uma vez que codificam emzimas-chave que participam na extensão e degradação da parede celular em ambientes normais e estressantes. Esses genes são expressos em diferentes tecidos e estados fisiológicos. Modificaçoes fenotípicas marcantes na sua expressão observou-se em células vegetais estressadas osmoticamente (TENHAKEN, 2015; QIANG, 2019; WU, 2020). A expressão do gene CaXTH (*Capsicum annuum)* constitutivamente em plantas de Arabidopsis e Tomate sob estresse salino, registrou redução do comprimento de raiz menos pronunciada comparada com as plantas controle. Além disso superexpressão de CaXTH3 poderia fortalecer a camada da parede celular das células do mesofilo em plantas transgênicas, protegendo as células da desidratação e coferindo osmotolerância (TENHAKEN, 2015; SEOK, et al., 2006). No presente trabalho plantas transgênicas e controle foram afetadas negativamente quando submetidas ao estresse salino em condições *in vitro*. No entanto nas linhagens transgênicas L2 e L3 o impacto foi menos pronunciado para biomassa e comprimento de raiz, bem como no conteudo de clorofila "b". Cabe ressaltar que no meio controle MS0 sem indutor de estresse as linhas transgênicas registraran melhor desenvolvimento comparadas com plantas não transformadas. Esses resultados estão relacionados com estudos de super expressão do gene PeXTH (*Populus euphratica*) onde linhasgens transgênicas registraram uma maior capacidade de tolerar salinidade, com maior biomassa e comprimento de raiz, embora tenham sido reduzidas pela exposição ao meio suplementado com NaCl. Da mesma maneira superexpressão de genes PtoXTH27, PtoXTH34 (*Populus tomentosa*) em arabidopsis, NtEXGT (*Nicotiana tabacum*) e tXET-B2 (*Solanum lycopersicum*) em tabaco promoveram aumento na atividade XET associada com maior tolerância ao estresse por salinidade. No entanto as manifestações fenotípicas de expressão constitutiva e induzível podem diferir. Apresentando ou não efeito positivo da expressão constitutiva dos genes da endotransglicosilase de xiloglucano em condições normais de crescimento (HAN, et al., 2013; JIANG, et al., 2020; BEREZHNEVA, 2018; KULUEV, et al., 2019).

Estudos conducidos em plantas T1 trasformadas com o gene *EucXET*, por Assis (2018), regitraram aumento no acúmulo da proteína *EucXET*, em linhagens transgênicas, bem como aumento da atividade de APX e GPX. Esses resultados se relacionan com os

resultados obtidos no presente trabalho. Sugerindo que possivelmente a expressão constitutiva do gene *EucXET* em linhas transgênicas de tabaco, promove modificações morfológicas de área foliar, e conteudo de lignina. Bem como alterações fisiológicas na eficiência no processo de carboxilacão. Aumentando níveis basais de resistência a ao estresse salino.

As informações descritas acima sugerem ao gene *EucXET* como alvo para o melhoramento de espécies forestais e herbáceas. Toda vez que a possível expressão em diferentes tecidos e estádios de desenvolvimento fornece ventagems de resistência mecânica, no fruto com aumento da tenacidade nesse tecido. Bem como maior estabilidade em cultivos suscetíveis a tombamentos causados pelo vento.

8. CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que a expressão do gene *Euc*XET induz a remodelação da parede celular modificando a morfologia, fisiologia e metabolismo nas plantas. O conjunto de mudanças podem proporcionar um nível basal de resistência ao estresse abiótico. As XETs tem sido relacionada com muitos processos fisiológicos nas plantas, metabolismo de hemicelulosa, processos de carboxilacao e expresao diferencial de genes XET de espécies arbóreas e herbáceas em distintas etapas de desenvolvimento. É assim que a expresao do gene EucXET mudou características fenotípicas e morfológicas em relação com as plantas não transformadas. Constituindo ao gene como alvo de interes biotecnológico para o melhoramento de espécies forestais bem como herbáceas.

REFERÊNCIAS

ARGENTE C. L., LÓPEZ C. R., FONSECA R, GONZÁLEZ L. M. Chlorophyll content and ions of a bread wheat variety Cuba-C-204 under salinity stress conditions. cultrop v.30 n.4 La Habana oct.-dic. 2009.

ASSIS, E.T.C.M. **Caracterização bioquímica e morfológica de plantas de *Nicotiana Tabacum* transformadas com o gene *Euc*XET de *Eucalyptus grandis***. Ilhéus, Bahia, Brasil 2014. Monografia para obter o certificado de graduação. Universidade Estadual de Santa Cruz.

ASSIS, E.T.C.M. **Estudo funcional do gene *EucXET* de *Eucalyptus grandis* em plantas transformadas de *Nicotiana tabacum*.** Ilhéus, Bahia, Brasil 2018. 74p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós- graduação em Genetica e Biologia Molecular. Universidade Estadual de Santa Cruz.

BEZZERRA et al. Biossíntese de lignina em plantas submetidas ao déficit hídrico. PUBVET 14(9): 653, p. 1-14. https://doi.org/10.31533/pubvet.v14n9a653.1-14. 2020.

BEVILAQUA, J. M. Efeitos do ácido rosmarínico na estrutura da lignina visando redução da recalcitrância da biomassa lignocelulósica em milho. Maringá, PR, Brasil 2017. 62 f. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas - Universidade Estadual de Maringá.

BEREZHNEVA, Z.A.; MIKHAYLOVA, E.V.; KULUEV, B.R. The Growth of Transgenic Tobacco Plants with Estradiol-Induced Expression of Tomato Xyloglucan Endotransglucosylase Gene tXET-B2 under Stress Conditions. Russ J Genet 54, 431–441. DOI: https://doi.org/10.1134/S102279541804004X. 2018.

CORTEZ, P., SILVA, D., CHAVES, A. Manual Prático de Morfologia e Anatomia Vegetal. EDITUS. Ed. Universidade Estadual de Santa Cruz. 92p. Ilhéus, Bahia, Brasil. 43-45. 2016.

COSGROVE, D.J. Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. Plant Cell. 9, pp. 1031-1041. 1997.

COSGROVE, D.J. Expansive growth of plant cell walls. Plant Physiology and Biochemistry 38(1-2) 109-124. https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)00164-9. 2000.

COSGROVE, D.J. Growth of the plant cell wall. Nature reviews molecular cell biology. 6, 850-861. 2005.

DE LA MATA, L., et al. Growth under elevated atmospheric CO2 concentration accelerates leaf senescence in sunflower (Helianthus annuus L.) plants. Journal of Plant Physiology. Vol.169, 14:1392-1400. 2012.

DIAZ, J.M., et al. Chitosan derivates induce local and distal expression of defence-related genes in wheat (Triticum aestivum L.) seedlings. Agrociencia. 52:497-509. 2018.

DONG J., et al. Isolation of a novel xyloglucan endotransglucosylase (OsXET9) gene from rice and analysis of the response of this gene to abiotic stresses. AJOL. Vol. 10 No. 76. 2013.

DOYLE, J.J. and DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bul. 19:11-15. 1987.

EKLÖF, J.M.; BRUMER, H. The XTH Gene Family: Na Update on Enzymes Structure, Function, and Phylogeny in Xyloglucan Remodeling. Plant Physiology; DOI: https://doi.org/10.1104/pp.110.156844. 2010.

FLORIDO BACALLAO MARILYN; BAO FUNDORA LOURDES. Water stress tolerance in tomato (Solanum lycopersicum L.). Cultivos Tropicales. vol. 35, no. 3, pp. 70-88. 2014.

FERREIRA, S. R.; CARLESSO R. Déficit hídrico e os processos morfológico e fisiológico das plantas. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, Campina Grande, PB, DEAg/UFPB. v.2, n.3, p.287-294, 1998.

FU, M.M.; LIU, C.; WU, F. Genome-wide identification, characterization and expression analysis of Xyloglucan Endotransglucosylase/hydrolase genes family in barley (Hordeum vulgare). Molecules 24(10), 1935. https://doi.org/10.3390/molecules24101935. 2019

GONÇALVES, J. et al. Eucalypt plantation management in regions with water stress. Southern Forests: Journal of Forest Science, 79:3, 169-183. DOI: 10.2989/20702620.2016.12554152017. 2017.

GERLACH, D. Botanische Mikrotechnik: eine Einführung. Sttutgart: Georg Thieme Verlag. 1984.

HAMANN, T. The Plant Cell Wall Integrity Maintenance Mechanism - Concepts for Organization and Mode of Action. Plant and Cell Physiology. 56, 215-223. DOI: https://doi.org/10.1093/pcp/pcu164. 2015.

HAN, Y. et al. Populus euphratica XTH overexpression enhances salinity tolerance by the development of leaf succulence in transgenic tobacco plants. Journal of Experimental Botany, 64 (14), 4225–4238. https://doi.org/10.1093/jxb/ert229. 2013.

HYACINTHE, L.; GALL,F. P.; DOMON J.M.; GILLET, F.; PELLOUX J. Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress. Plants. 4(1), 112-166. 2015.

HOMRICH, M S., et al. Resistance to Anticarsia gemmatalis Hübner (Lepidoptera, Noctuidae) in transgenic soybean (Glycine max (L.) Merrill Fabales, Fabaceae) cultivar IAS5 expressing a modified Cry1Ac endotoxin. Genetics and Molecular Biology. 31(2), p. 522-531. 2008.

HYODO, H.; KURODA, H.; YANG S. F. Induction of Phenylalanine Ammonia-Lyase and Increase in Phenolics in Lettuce Leaves in Relation to the Development of Russet Spotting Caused by Ethylene. Plant Physiol. 62(1), p. 31-35, 1978.

HODGINS, D. S., Yeast Phenylalanine Ammonia-lyase, Prurification, Properties, and the Identification of Catalytically Essential Dehydroalanine. The Journal of Biological Chemistry. 246(9), p. 2977-2985. 1971.

HORSCH, R.B., FRY, J.E., HOFFMANN, N.L., EICHHOLTZ D, *et al*. (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227:1229-1231.

HOUSTON, K. et al. The Plant Cell Wall: A Complex and Dynamic Structure as Revealed by the Responses of Genes under Stress Conditions. Front. Plant Sciense https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00984. 2016.

IQBAL, A., TANG, W., WANG, T., WANG, H. Identification and functional characterization of the promoter driving “xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase gene (XET)” gene for root growth in the desert Populus euphratica. South African Journal of Botany. 112, p. 437-446. 2017.

JIANG, Y., LI, Y., LU C., TANG, Y., JIANG, X, GAI, Y. Isolation and characterization of Populus xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase (XTH) involved in osmotic stress responses. International Journal of Biological Macromolecules. 115, p.1277-1287. 2020.

KUMAR, Sudhir et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Molecular biology and evolution. 35(6), 1547-1549. 2018.

KAUR, G. A Review of XET Enzymes, Current Applications and Future Trends. International Journal of Latest Technology in Engineering, Management & Applied Science (IJLTEMAS), 8(10), 2278-2540. 2019.

KAO, S.-C., AND GANGULY, A. R. Intensity, duration, and frequency of precipitation extremes under 21st-century warming scenarios. J. Geophys.

KÖRBES, A.P. Avaliação da capacidade de genes de Eucaliptus grandis em conferir tolerância à deficiência hídrica. Rio Grande do Sul, Brasil, 2006. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Genetica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Biociências.

KULUEV, et al. Role of the expansin and xyloglucan endotransglycosylase genes in the regulation of tobacco growth under the influence of abiotic stress factors. Plant biotechnology in the postgenomic era. Doi: 10.18699/ICG-PlantGen2019-43. 2019.

KUSHWAH S. et al. Arabidopsis XTH4 and XTH9 Contribute to woos cell expansion and secondary wall formation. Plant Physiology 182(4), 1946-1965. DOI: https://doi.org/10.1104/pp.19.01529. 2020.

KRISHNAN, P. et al. Impact of elevated CO2 and temperature on rice yield and methods of adaptation as evaluated by crop simulation studies. Agriculture, Ecosystems & Environment 122(2) 233-242. https://doi.org/10.1016/j.agee.2007.01.019. 2007.

LOBELL, D. B., AND GOURDJI, S. M. The influence of climate change on global crop productivity. Plant Physiol. 2012. 160, 1686–1697. doi: 10.1104/pp.112.208298.

LURLARO A. et al. Drought and Heat Differentially Affect XTH Expression and XET Activity and Action in 3-Day-Old Seedlings of Durum Wheat Cultivars with Different Stress Susceptibility. Plant Sci.; 10; 2016.

MATSURI et al. *AtXTH27* plays an essential role in cell wall modification during the development of tracheary elements. The plant journal 42:4, 525-534. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02395x. 2005.

MENDEZ, C.; VALLEJO M.A. Mecanismos de respuesta al estrés abiótico: hacia una perspectiva de las especies forestales. Revista Mexicana de Ciencias Forestales. 10(56). Doi: https://doi.org/10.29298/rmcf.v10i56.567. 2019.

MIEDES E.; ZARRA I.; HOSONC T.; HERBERS K.; SONNEWALDE U.; LORENCES E.P. Xyloglucan endotransglucosylase and cell wall extensibility. Journal of Plant Physiology. 168, 196–203. 2011.

MORA I. Y. Padronização de análise proteômica e atividade enzimática em nível de xilema visando estudos de interação entre Ceratocystis cacaofunesta e clones de cacau. Dissertação (Mestrado). Programa Genética e Biologia Molecular. Universidad Estadual de Santa Cruz. Ilheus, Bahia, Brasil. 2016.

MURASHIGE T.; SKOOG, F. A evised medium for rapid growth and bio assays wiyh Tobacco tissue cultures. PHYSIOLOGIA PLANTARUM, vol 15. 1982.

NOVAKOVI´C, L., et al., Hitting the Wall-Sensing and Signaling Pathways Involved in Plant Cell Wall Remodeling in Response to Abiotic Stress. Plants 7(4)-89. 2018.

PIROVANI, C.P., et al. Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by Moniliophtora perniciosa, the causa agent of the witches´broom disease. ELECTROPHORESIS. 29, 11, p. 2391-2401. 2008.

PAULY, M.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.; YORK, W.S. Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. Plant J 20: 629–639. 1999.

POTTERS, G. et al. Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble. Trends Plant Sci., 2007, vol. 12, no. 3, pp. 99-105.

QIANG, L. et al. Systematic Analysis and Functional Validation of Citrus XTH Genes Reveal the Role of Csxth04 in Citrus Bacterial Canker Resistance and Tolerance. Front. Plant Sci. 10:1109. doi: 10.3389/fpls.2019.01109. 2019.

ROJAS A., 2018. Extracción fenólica de proteínas. Disponível online http://conogasi.org/articulos/extraccion-fenolica-de-proteinas/

ROSE, J.K.C.; BRAAM, J.; FRY S.C.; NISHITANI, K. The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosyltation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. Plant Cell Physiol. 43:1421-1435. 2002.

SONG, Li. et al. Characterization of the XTH Gene Family: New Insight to the Roles in Soybean Flooding Tolerance. International Journal of Molecular Sciences. 19(9), 2705, https://doi.org/10.3390/ijms19092705. 2018.

SIMON A. et al. Increase in XET activity in bean (Phaseolus vulgaris L.) cells habituated to dichlobenil. Planta (2007) 226:765–771.

SEALE, M. Cell Wall Remodeling during Development. Plant Physiology 182 (4) 1800-1801; DOI: 10.1104/pp.20.00260. 2020.

SEOK K. et. al. Constitutive expression of abiotic stress-inducible hot pepper CaXTH3, which encodes a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase homolog, improves drought and salt tolerance in transgenic Arabidopsis plants. FEBS Letters 580: 3136-3144. 2006.

SILVA, H.; MARTÍNEZ, J.P.; BAGINSKY, C.; PINTO, M. Effects of different frequencies of irrigation on the leaf anatomy of different cultivars of common bean Phaseolus vulgaris L. Revista Chilena de Historia Natural 72: 219-235. 1999.

SOUZA, D. **Perfil proteômico e estresse oxidativo em plantas jovens de cacau submetidas a doses de potássio e a seca no solo**. Ilhéus, Bahia, Brasil 2017. Dissertação

de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal. Universidade Estadual de Santa Cruz.

SOUSA, A.O. DE. **Avaliação da expressão gênica em *Eucalyptus grandis* E *Eucalyptus globulus* E estudos funcionais de genes, visando a qualidade da madeira**. Ilhéus, Bahia, Brasil 2009. 98p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-graduação em Genetica e Biologia Molecular. Universidade Estadual de Santa Cruz.

SOUSA, A.O. DE. **Análise funcional do gene *EgPHI-1 (Phosphate induced-1)* de eucalipto em tabaco.** Ilhéus, Bahia, Brasil 2013. 110p. Dissertação de Doutorado – Programa de Pós-graduação em Genetica e Biologia Molecular. Universidade Estadual de Santa Cruz.

SHARMA, P.; JHA, A.B.; DUBEY, R.S.; PESSARAKLI, M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. Journal of Botany. 2012, 1-26. 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia e Desenvolvimento vegetal. 6ta edição. 2017.

TENHAKEN, R. Cell wall remodeling under abiotic stress. Front. Plant Sci. 5:771. Doi: 10.3389/fpls.2014.00771. 2015.

VAN DAM, N.M. How plants cope with biotic interactions. Plant Biol., 11, 1–5. 2009.

VAAHTERA, L.; SCHULZ, J.; HAMANN, T. Cell wall integrity maintenance during plant development and interaction with the environment. Nat. Plants 5, 924–932. doi.org/10.1038/s41477-019-0502-0. 2019.

WALTER, L.C.; ROSA, H.T.; STRECK, N.A. Mecanismos de aclimatação das plantas à elevada concentração de CO_2. Ciencia Rural 45(9). http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20140527. 2015.

WANG, W., VINOCUR, B., ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. Planta 218, 1–14. doi.org/10.1007/s00425-003-1105-5. 2003.

WAJAHATULLAH, K., BALAKRISHNAN, P., DONALD, L.S. Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. J. Plant Physiol. 160, 859–863. 2003.

WELLBURN, A. R. The Spectral Determination of Chlorophylls *a* and *b*, as well as total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. Plant Physiol. Vol. 144pp.307-3013. 1994.

WERADUWAGE S.M., et al. Molecular Mechanisms Affecting Cell Wall Properties and Leaf Architecture. In: Adams III W., Terashima I. (eds). The Leaf: A Platform for Performing Photosynthesis. Advances in Photosynthesis and Respiration (Including Bioenergy and Related Processes), vol 44. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-93594-2_8. 2018.

WOLF, S. Plant cell wall signaling and receptor-like kinases. Biochem. J. 474, 471–492. 2017.

WU, D. et al. Genome-wide identication, and phylogenetic and expression proling analyses of XTH gene families in *Brassica rapa* L. and *Brassica oleracea* L. BMC Genomics 21, 78. https://doi.org/10.1186/s12864-020-07153-1. 2020.

XU, Z.; ZHOU, G. Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. Journal of Experimental Botany, 59(12), 3317–3325, https://doi.org/10.1093/jxb/ern185. 2008.

ZHANG, M. et al. Spatial–temporal analysis of polyethylene glycol-reduced aluminium accumulation and xyloglucan endotransglucosylase action in root tips of common bean (*Phaseolus vulgaris*). Annals of Botany. vol 118, 1–9. DOI: https://doi.org/10.1093/aob/mcw062. 2016.