

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR



ESTUDO FUNCIONAL DO GENE *EucXET* DE *Eucalyptus grandis*
EM PLANTAS TRANSFORMADAS DE *Nicotiana tabacum*

ELZA THAYNARA CARDOSO DE MENEZES ASSIS

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Maio de 2018

ELZA THAYNARA CARDOSO DE MENEZES ASSIS

**ESTUDO FUNCIONAL DO GENE *EucXET* DE *Eucalyptus grandis*
EM PLANTAS TRANSFORMADAS DE *Nicotiana tabacum***

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

Área de concentração: Genética e
Biologia Molecular.

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Maio de 2018

ELZA THAYNARA CARDOSO DE MENEZES ASSIS

**ESTUDO FUNCIONAL DO GENE *EucXET* DE *Eucalyptus grandis* EM PLANTAS
TRANSFORMADAS DE *Nicotiana tabacum***

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

Área de concentração: Genética e
Biologia Molecular.

Ilhéus, 30 de maio de 2018

Dr^a. Amanda Ferreira da Silva Mendes
(IFBA)

Dr^a. Luciana Rodrigues Camillo
(UESC)

Dr. Carlos Priminho Pirovani
(UESC)

Dr^a. Fátima Cerqueira Alvim
(UESC - Orientadora)

DEDICATÓRIA

A minha mãe, Mercene e aos meus avós Waldemar e Elza por me darem asas e sempre acreditarem que eu poderia alcançar cada sonho. E a mulher que eu me tornei nesses anos de trajetória.

AGRADECIMENTOS

Mas uma etapa vai chegando ao fim, por mais que eu saiba que muitas outras virão essa ficará marcada. Foram dois anos de amadurecimento, conhecido e lutas, a maioria delas comigo mesma. Fui contemplada com a temida crise de ansiedade, que não escolhe pessoa ou momento, ela simplesmente chega e te paralisa. Algumas vezes achei que não fosse conseguir, outras não queria sair de casa, outras apenas chorei, mas eu não ia desistir. Não desistiria por mim e por todos que acreditavam e me apoiavam nos momentos em que precisei. Agora chegou o momento de agradecer publicamente a cada pessoa de luz que apareceu no meu caminho.

Agradeço a Deus por se manter sempre ao meu lado, me guiando e sustentando, mesmo quando sou falha. Obrigada Senhor, por me permitir acordar todos os dias e pela força que me proporciona para alçar os meus objetivos.

A minha mãe e a minha avó por todo amor e compreensão. E mesmo em meio à saudade sempre me motivaram a ir em frente e nunca desistir. Ao meu avô que mesmo estando em outro plano se faz anjo pra me proteger. Sem vocês a minha vida perde o sentido.

A Dr^a Fátima Alvim pela orientação. Obrigada pela ajuda, por compartilhar suas experiências e conhecimentos.

Ao meu co-orientador Márcio Costa pelo suporte dado durante o trabalho.

A minha co-orientadora Aurizangela por confiar em mim desde o início, por me ensinar boa parte do que sei, por me acalmar quando o caos queria tomar conta, por ter se tornado uma mãe-amiga. E como eu já te disse uma vez, se tem uma pessoa que eu nunca queria decepcionar nessa trajetória de pesquisa, essa pessoa é você.

Ao CNPq pelo apoio financeiro para o projeto.

A Universidade Estadual de Santa Cruz estrutura e suporte.

Ao Centro de Biotecnologia e Genética que se tornou minha segunda casa. Foram 7 anos fazendo parte da minha rotina diária, 7 anos de dancinhas esquisitas quando os experimentos davam certo e cara fechada quando algo não saía como o planejado.

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos, em especial a Malu que se tornou a melhor irmãzinha de pesquisa que eu poderia ter e a Dandara por toda ajuda, conversas, risadas e por agüentar minha chatice quando repetia mil vezes que era pra anotar tudo na ata.

Aos membros da banca examinadora Dr^a Amanda Mendes, Dr^a Luciana Camillo e a Dr Carlos Priminho Pirovani por terem aceitado participar da avaliação deste trabalho.

As minhas amigas Élyda e Joyce por estarem sempre na minha vida, independente da trajetória que eu siga ou das pessoas que eu conheça vocês sempre terão um lugar especial.

Nesses dois anos conheci pessoas incríveis com diferentes histórias e culturas, juntos formamos o melhor bonde que a genética poderia ter. Mas gostaria de destacar três, que com certeza carregarei por toda vida: Thaís, Natasha e Jona. Fomos mais que amigos, fomos (seremos sempre) friends! Obrigada por tudo! Obrigada pelas crises de risos, por enxugar lágrimas, pelos almoços, pela troca de energia e por nossas preciosas sextas-feiras. Amo muito vocês, nosso encontro foi de alma e sem vocês a caminhada seria mais longa.

A Thaíse por ser amiga e afilhada que viveu essa jornada junto comigo.

Ao Prof. Priminho, Thayse Tosto e Arianne pela ajuda com as atividades enzimáticas.

A Horlei por ser o Super - Homem do CBG que nos salva de todos os apuros.

As minhas companheiras da casa da mãe Joana, Elloah e Ivina que dividiram comigo não só a casa, mas também suas vidas e hoje somos uma família. Conviver com vocês é uma alegria sem fim. Obrigada pela amizade sincera. Amo vocês!

Aos meus filhos felinos por me trazerem doses de amor diário.

A todos que de alguma forma, contribuíram com a realização desse trabalho.

A vocês, meu muito obrigada!

“Graças à vida, que me deu tanto. Me deu o riso e me deu o pranto...”

Violete Parra, Chile.

ÍNDICE

EXTRATO	IX
ABSTRACT	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	XV
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Geral	3
2.2. Específicos.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1. Biossíntese de madeira.....	4
3.2. Melhoramento e biotecnologia de eucalipto, aplicados à qualidade de madeira.....	6
3.3. <i>EucXET</i>	9
3.3.1. Mecanismo de ação da xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase (XTH).....	9
3.3.2. Resposta a estresses bióticos e abióticos	11
3.3.3. Atuação da <i>XTH</i> na formação da madeira.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1. Material biológico	15
4.2. Extração de DNA.....	15
4.3. Reação em Cadeia da Polimerase.....	16
4.4. Medidas de crescimento	17
4.5. Indução de calogênese	17
4.6. Análise protéica.....	18
4.7. Indução de estresse osmótico.....	19

4.8. Detecção de ROS	19
4.9. Atividades enzimáticas.....	19
4.9.1. Peroxidase do ascorbato (APX).....	20
4.9.2. Peroxidase do guaiacol (GPX).....	20
4.10. Análise filogenética	21
4.11. Análise estatística	21
5. RESULTADOS	21
5.1. Comprovação do estado transgênico das plantas transformadas e regeneradas.....	21
5.2. Expressão de <i>EucXET</i> altera o crescimento das plantas e a indução de calogênese	23
5.3. Análise de imunodetecção	25
5.4. A expressão de <i>EucXET</i> aumenta a tolerância de plântulas de tabaco a estresse osmótico.....	26
5.5. Detecção de ROS	29
5.6. Ensaio enzimático.....	29
5.7. Análise filogenética	31
6. DISCUSSÃO	33
7. CONCLUSÕES	38
8. ANEXO.....	39
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

EXTRATO

ASSIS, E. T. C. M., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, maio de 2018.
Estudo funcional do gene *EucXET* de *Eucalyptus grandis* em plantas transformadas de *Nicotiana tabacum* Orientador: Dr^a Fátima Cerqueira Alvim. Co-orientadores: Dr^a Aurizangela O. de Sousa, Dr. Márcio Gilberto C. Costa.

A expansão das células vegetais depende principalmente da ação de enzimas da subfamília da *xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase* (XTH). Estas enzimas agem na parede celular para remodelar as cadeias de xiloglucano e reduzir as interações com as microfibrilas de celulose permitindo o crescimento e desenvolvimento vegetal. Esse movimento de remodelamento causado pela ação das XTHs também foi relacionado com respostas às condições de estresse abiótico. Análises comparativas dos transcriptomas de xilemas de *Eucalyptus grandis* e *E. globulus*, espécies contrastantes quanto ao crescimento e qualidade da madeira, identificaram uma sequência similar à XTH que exhibe predominantemente atividade XET, (*EucXET*) entre os genes diferencialmente expressos. Plantas T1 de *N. tabacum* transformadas com o gene *EucXET* de *E. grandis*, foram utilizadas com intuito de esclarecer a participação do transgene no processo de crescimento e tolerância a estresse. Foi analisado acúmulo da proteína exógena no tecido de caule e folha por *western blot*. Resistência das plantas transgênicas estresse osmótico utilizando o PEG (polietilenoglicol), Manitol e NaCl (cloreto de sódio). Acúmulo de peróxido de hidrogênio via coloração de DAB (3,3-diaminobenzidina) e atividade das enzimas peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase do guaiacol (GPX) no caule e folha. Foi confirmada a superexpressão de XET nas amostras extraídas das folhas de todas as linhagens transgênicas analisadas, havendo maior acúmulo na linhagem L3. Contudo, os resultados das análises proteômicas conduzidas utilizando amostras extraídas do caule das plantas transgênicas foram inversas ao observado nas folhas, indicando que o acúmulo de XET sofre variação nos diferentes tecidos. No ensaio de resistência a estresse osmótico, observou-se que as plântulas de todas as linhagens transgênicas testadas apresentaram aumento na tolerância ao estresse, havendo melhor desenvolvimento na L3, essa a linhagem também apresentou uma

maior produção de peróxido de hidrogênio. As atividades das peróxidasas estão relacionados ao remodelamento imposto pela expressão do gene *EucXET* em cada tecido, na folha houve maior atividade de APX, enquanto que no caule a GPX apresentou maior atividade. Estes dados reunidos auxiliarão o entendimento sobre a função de *EucXET* em *Eucalyptus*, bem como apontam para um provável alvo para engenharia genética visando a tolerância ao estresse abiótico.

Palavras-chave: xiloglucano endotransglicosilase, xiloglucano, parede celular, estresse abiótico, qualidade da madeira

ABSTRACT

ASSIS, E. T. C. M., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, maio de 2018.
Functional study of the EucXET gene of Eucalyptus grandis on transformed plants of Nicotiana tabacum Advisor: Dr^a Fátima Cerqueira Alvim. Advisor Committee Members: Dr^a Aurizangela O. de Sousa, Dr. Márcio Gilberto C. Costa.

The expansion of plant cells depends mainly on the action of enzymes from the xyloglucan endotransglycosylase/ hydrolase (XTH) subfamily. These enzymes act on the cell wall to remodel xyloglucan chains and reduce interactions with cellulose microfibrils allowing plant growth and development. This remodeling movement caused by the action of XTHs was also related to responses to abiotic stress conditions. Comparative analyzes of xylem transcripts of *Eucalyptus grandis* and *E. globulus*, two contrasting species for growth and wood quality, identified an XTH-like sequence that exhibits predominantly XET activity (*EucXET*) among differentially expressed genes. *N. tabacum* T1 plants transformed with the *E. grandis EucXET* gene were used to clarify the participation of the transgene in the growth process and stress tolerance. Accumulation of exogenous protein in stem tissue and leaf by western blot. Resistance of transgenic plants stress osmotic use of PEG (polyethylene glycol), mannitol and NaCl (sodium chloride). Accumulation of hydrogen peroxide via DAB (3,3-diaminobenzidine) staining and activity of the ascorbate peroxidase (APX) and guaiacol peroxidase (GPX) enzymes on the stem and leaf. The overexpression of XET was confirmed in the samples extracted from the leaves of all transgenic lines analyzed, with a higher accumulation in the L3 lineage. However, the results of the proteomic analyzes conducted using samples extracted from the stem of the transgenic plants were inverse to that observed in the leaves, indicating that the accumulation of XET undergoes variation in the different tissues. In the test of resistance to osmotic stress, it was observed that the seedlings of all the transgenic lines tested showed an increase in the tolerance to stress, with a better development in L3, this line also presented a higher production of hydrogen peroxide. The peroxidases activities are related to the remodeling imposed by the expression of the *EucXET* gene in each tissue, in the leaf there was more APX

activity, whereas in the stem the GPX presented greater activity. Taken together, these data improve to understand the role of *EucXET* in *Eucalyptus*, as well as point to a probable target for genetic engineering aiming improve wood quality and crop tolerance to abiotic stress.

Key words: xyloglucan endotransglycosylase, xyloglucan, cell wall, abiotic stress, wood quality

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ilustração esquemática da parede celular da madeira. Adaptado de Sticklen, 2008.....6
- Figura 2. Ação do xiloglucano endotransglicosilase (XET), clicando e unindo polímeros de xiloglucano em novas configurações. Fonte: TAIZ, et al., 2017. Baseado em Smith e Fry 1991.10
- Figura 3. Esquema da região de transferência (T-DNA) do vetor binário pCambia 2301 ligada ao cassete de super-expressão (Medeiros, 2009).15
- Figura 4. Diagnóstico do estado de transgenia das plantas de *Nicotiana tabacum*. DNA genômico foi extraído de folhas de *N. tabacum* e submetido à reação de PCR com *primer* específico para *nptII*. M: marcador Gene Ruler de 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific); NT: planta não transformada; L1 – L4: linhagens independentes de *N. tabacum* transformadas com *EucXET*; C+: DNA plasmidial de pCAMBIA 2301 (controle positivo); C-: reação de PCR sem conter DNA (controle negativo).22
- Figura 5. A expressão de *EucXET* induz florescimento precoce em plantas de *Nicotiana tabacum* (círculo vermelho). Foto representativa do florescimento observado nas plantas expressando *EucXET* (planta B) enquanto as plantas controle se apresentavam na fase vegetativa (planta A). Foto ilustrativa de 3 réplicas biológicas registrada após 7 semanas em casa de vegetação24
- Figura 6. A superexpressão de *EucXET* induz o crescimento em plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum*. Gráfico representativo da altura final, em cm, atingida pelas plantas controle, não transformadas (NT) e linhagens expressando *EucXET* (L1 a L4). Gráfico representativo de 3 réplicas biológicas.....24
- Figura 7. A expressão de *EucXET* induz divisão celular. Foto representativa de 3 réplicas biológicas da cultura de calos das plantas NT e transgênicas (L1 a L4) após 30 dias em sistema de cultura de tecidos, com condições controladas.25

Figura 8. Transformação com *EucXET* induz mudanças no perfil protéico de *N. tabacum* e influencia no acúmulo de XET endógeno. 35µg de proteínas totais extraídas de folha (A) ou caule (B) de *Nicotiana tabacum* foram separadas em SDS-PAGE e visualizadas após coloração com comassie coloidal. Géis similares foram transferidos para membrana de nitrocelulose posteriormente sondada com anticorpo contra EucXET. NT: planta não transformada, L1 a L4: linhagens transgênicas de *N. tabacum*.....26

Figura 9. Expressão de *EucXET* induz, em plantas de tabaco, aumento na tolerância a estresse osmótico. Plântulas de *N. tabacum* NT (não transformada) ou expressando *EucXET* (L1 a L4) sob tratamento com cloreto de cálcio (NaCl), Manitol ou Polietilenoglicol (PEG). Fotos e gráficos de comprimento representativos de 8 réplicas biológicas, após 15 dias de tratamento.....28

Figura 10. Nível de peróxido de hidrogênio em folhas de *N. tabacum* modifica após transformação com *EucXET*. Discos foliares de *N. tabacum* isolados de plantas mantidas *in vitro* não transformadas (NT) ou transformadas com *EucXET* (L1 a L4) foram submetidos a tratamento com 3,3-diaminobenzidine (DAB). Coloração marrom significa presença de H₂O₂. Fotos capturadas em Lupa Leica, 4,5x e representativa de 3 réplicas biológicas.....29

Figura 11. Atividade de peroxidases modifica em plantas transformadas com *EucXET*. Atividade das enzimas oxidorrredutoras Peroxidase do Ascorbato (APX, A e B) e Peroxidase do Guaiacol (GPX, C e D) foram dosadas em extratos protéicos extraídos de folhas e caules de plantas NT (não transformada) e transformadas com *EucXET* (linhagens L1 a L4). Plantas mantidas em sistema de cultura de tecidos. A barra de erros é representativa da triplicata. Diferenças estatísticas significativas para $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) e $p \leq 0,001$ (***).31

Figura 12. Neighbor-Joining - Filograma não enraizada de sequências protéicas de xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase de *N. tabacum* (NtXTH) e *E. grandis* (EucXET).....32

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C – graus Celsius

Abs – absorbância

APX – peroxidase do ascorbato

BCIP – 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato

CTAB – brometo de acetiltrimetilamônio

DAB – 3,3-diaminobenzidine

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTP – desoxinucleotídeo trisfosfato

EDTA – ácido etilenodiamino tetra- acético

GH-16 - glicosilhidrolase 16

GPX - peroxidase do guaiacol

gus - b-glucuronidase

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

kDa - quilodalton

M – molar

mg – miligrama

mL – mililitro

mM – milimolar

NaCl – cloreto de sódio

NBT – Nitro blue tetrazolium

nM - nanomolar

nptII – neomicina fosfotransferase

pb – pares de base

PCR - reação da cadeia da polimerase

PEG – polietilenoglicol

pH – potencial hidrogeniônico

PVP – Polivinilpirrolidona

ROS – espécies reativas de oxigênio

rpm – rotação por minuto

SDS - dodecil sulfato de sódio

SDS – PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio

Taq – *Termus aquaticus*

Tris - Tris(hidroximetil) amino metano

XTH- *Xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase*

μL – microlitro

1. INTRODUÇÃO

A madeira é um abundante recurso biológico na Terra e é considerada a matéria-prima mais importante para indústria global com demanda crescente. Sua formação envolve um processo de proliferação de células cambiais, especificação, expansão das células do xilema e morte celular programada. Análise de genes envolvidos na formação da madeira fornece informações valiosas sobre os mecanismos moleculares presentes na diferenciação do xilema secundário, bem como o uso de manipulação genética e análises genômicas em plantas modelo têm ajudado a compreender melhor os genes candidatos para a melhoria da qualidade da madeira (PAUX, 2004; ZHANG, 2014).

No Brasil, 34% dos 7,8 milhões de hectares de árvores plantadas pertencem às empresas de papel e celulose, sendo que 88,6% da matéria prima utilizada por elas são da madeira de eucalipto (IBÁ 2016). Com a elevada utilização da madeira de eucalipto no setor industrial, tornou-se necessário obter madeira de melhor qualidade, uma vez que variações na qualidade influenciam diretamente no produto final (PEREIRA, 2000). Com o objetivo de identificar genes cuja expressão se relaciona com a qualidade da madeira de eucalipto, foi conduzido a análise transcriptômica de xilemas isolados de *E. grandis* e *E. globulus*, espécies contrastantes no que tange a qualidade produzida da madeira. O Projeto, denominado de Genolyptus, visou, portanto, explorar o potencial genético/biotecnológico dos referidos clones em proporcionar características benéficas ao processamento da madeira. Para tal, foi realizada a construção de microarranjos de cDNA de xilema de *E. globulus* e *E. grandis*. As análises comparativas dos microarranjos permitiram identificar genes diferencialmente expressos entre estas duas espécies. Entre eles estava o *EucXET*, o qual apresentou maior expressão em o *E. grandis*. Esta sequência foi assim denominada por apresentar homologia como gene da *xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase 9* [XP_010035630.1]. Em 2009, no laboratório de cultura de tecidos da UESC, Medeiros obteve linhagens transgênicas de *Nicotiana tabacum* contendo genes isolados de eucaliptos que foram selecionados para estudos funcionais por apresentarem padrões de expressão gênica contrastantes entre *E. grandis* e *E.*

globulus. Ao todo, 7 genes de eucalipto foram transferidos individualmente, sob a regulação do promotor 35S (CAMV35S), para *N. tabacum*. Dentre esses o *EucXET* (MEDEIROS, 2009).

As enzimas da classe xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase (XTH) são um subgrupo da família da glicosilhidrolase 16 (GH-16) e participam em todos os processos de remodelação das paredes celulares, podendo apresentar atividade -transferase (XET), através de um processo de transglicosilação as XTHs "cortam" polissacarídeos de xiloglucano, permitindo que as microfibrículas de celulose se separem e ocorra a expansão celular. Ainda, podem apresentar, utilizando a molécula de água para clivar uma cadeia de xiloglucano produzindo oligossacarídeos com finais não redutores (FRY et al., 1992; ROSE et al., 2002). Esse remodelamento causado pelas XTHs sugere possíveis respostas as condições de estresses desfavoráveis. A XTH também pode agir durante as fases iniciais de deposição da parede celular secundária, reforçando as ligações entre as camadas da parede primária e secundária (BOURQUIN et al., 2002; RUPRECHT, 2018; SMITH e FRY 1991).

O presente trabalho apresentou como objetivo correlacionar a superexpressão de XET com processos fisiológicos relacionados com remodelamento de parede celular, como o crescimento e a tolerância vegetal a estresse abiótico. Para tanto, quatro linhagens independentes de T1 de *N. tabacum* transformadas com o gene *EucXET*, e plantas não-transformadas (controle) foram analisadas em condições laboratoriais e em casa de vegetação. A análise fisiológica se deu pelo acompanhamento no crescimento das plantas em casa de vegetação. As análises moleculares envolveram o diagnóstico da transgenia (via análise de DNA genômico) bem como acúmulo de proteína XET via imunoblotting. As análises bioquímicas englobaram dosagem de atividade enzimática de enzimas detoxificadoras (peroxidases) bem como acúmulo de peróxido de hidrogênio. Além disso, foram conduzidos experimentos de simulação de estresse hídrico e salino em condições laboratoriais. Com esse estudo estima-se aumentar o conhecimento acerca da ação de XET e comprovar a relação entre o acúmulo da proteína e o aumento em características importantes para a cultura do eucalipto e demais culturas.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Analisar a participação de *EucXET* no processo de desenvolvimento vegetal e aumento da tolerância a estresse.

2.2. Específicos

- Analisar o acúmulo específico de *EucXET* em tecidos das plantas por meio de *western blot*;
- Verificar os efeitos dos estresses hídrico e salino;
- Determinar as atividades das enzimas peróxidase envolvidas no processo de resistência a estresses.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Biossíntese de madeira

A madeira é um material heterogêneo, formado por células com paredes celulares espessas. Em termos de estrutura, a parede da célula é formada por: parede primária (P), parede secundária externa (S1), parede secundária média (S2), parede secundária interna (S3) e a lamela média, a qual une as células entre si. Em termos de composição química, a parede celular vegetal é constituída basicamente por celulose, hemicelulose e lignina (CARVALHO, 2009) (Figura 1).

A formação de madeira é um processo dinâmico derivado do crescimento secundário da planta que tem início com a divisão celular do câmbio vascular. Assim que as células do câmbio perdem a capacidade de se dividir, elas começam a se diferenciar em células do xilema secundário em um processo que envolve expansão celular e espessamento da parede celular. Durante essa etapa ocorrem a biossíntese e deposição de polissacarídeos (celulose e hemiceluloses), proteínas estruturais da parede celular secundária e lignificação. Por fim, se inicia a morte celular programada, onde ocorre o colapso dos vacúolos com a liberação de hidrolases que degradam o conteúdo celular, exceto a parede celular secundária. Cada passo é altamente regulado por genes que são expressos em resposta aos sinais ambientais e de desenvolvimento da planta (FUNADA et al., 2016; MELLEROWICZ et al., 2001; PLOMION et al., 2001; SAMUELS et al., 2006; ZHANG et al., 2014).

A celulose é o principal componente da madeira, localiza-se predominantemente na parede celular secundária e representa cerca de 35 % a 50% do seu peso seco. A celulose é um homopolissacarídeo linear composto de unidade de β -D-glicopirranose que são ligadas por ligações (1,4)-glicosídicas. As moléculas de celulose são agregadas em conjunto na forma de microfibrilas, uma estrutura fibrosa que possui de alta resistência e fortes ligações de hidrogênio (CHEN, 2014; HOFFMANN e JONES, 1990; SJOSTROM, 2013).

O segundo componente macromolecular da madeira são as hemiceluloses, polissacarídeos heterogêneos constituídos por monômeros de pentosanas, hexosanas e ácidos urônicos. As hemiceluloses representam entre 20 e 30% do peso seco da madeira e interagem com as microfibrilas de celulose através de pontes de hidrogênio ou formando ligações covalentes com outros polímeros (CARPITA, 2000; CHEN, 2014; PETTERSEN, 1984). Dentre as hemiceluloses, uma das mais abundantes é o xiloglucano, que atua na parede de células vegetais em crescimento. O metabolismo do xiloglucano controla a expansão das células vegetais (HAYASHI e KAIDA, 2011).

A lignina é o terceiro componente fundamental da madeira, compreendendo cerca de 15 a 35% de seu peso. É composta por fenilpropanóides, originárias de três monolignóis (álcoois aromáticos): álcoois p-acalila, coniferila e sinapila, estes monolignóis produzem, respectivamente, unidades de p-hidroxifenilo H, guaiacil G e siringil S. A quantidade de lignina depositada na parede celular secundária (lamela média), bem como sua composição (H, S e G) são influenciadas pelo ambiente e pelo estágio de desenvolvimento da planta. A lignina desempenha um papel importante na resistência e estrutura às paredes celulares, controlando o fluxo de fluidos e protegendo contra estresses bioquímicos (BOERJAN, 2003; CHEN, 2014; LAURICHESSE, 2014).

A madeira contém também substâncias poliméricas secundárias que são encontradas em pequenas quantidades, como por exemplo, as proteínas de parede e substâncias pécticas. As pectinas são um grupo complexo e heterogêneo de polissacarídeos ricos em ácido galacturônico (GalA). Este polissacarídeo tem papéis nas paredes celulares primárias e secundárias, atuando no crescimento, morfologia, desenvolvimento e defesa de plantas (MOHNEN, 2005; WILLATS, 2001).

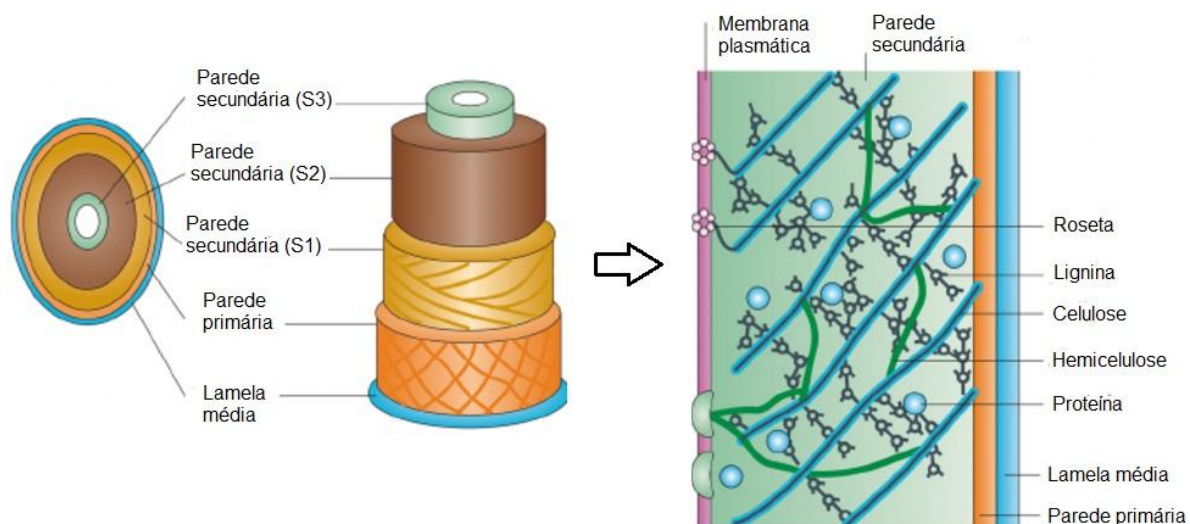


Figura 1. Ilustração esquemática da parede celular da madeira. Adaptado de Sticklen, 2008.

3.2. Melhoramento e biotecnologia de eucalipto, aplicados à qualidade de madeira

Com a alta utilização da madeira de eucalipto no setor industrial, tornou-se necessário obter uma madeira de melhor qualidade, uma vez que variações na qualidade influenciam diretamente no produto final. Uma das formas de se obter madeira de qualidade é o melhoramento convencional onde, espécies que possuem características satisfatórias são cruzadas para aumentar a produtividade. Outra alternativa é o uso da biotecnologia por meio da recombinação genética do material selecionado, obtendo variedades com melhor produtividade (PEREIRA, 2000).

Por volta da década de 60 aconteceu o crescimento da eucaliptocultura no Brasil, junto com essa expansão houve o aparecimento do fungo *Cryphonectria cubensis*, agente causal do cancro doença que provoca lesões e intumescimento de casca na base de árvores. Com isso houve a necessidade de iniciar um programa de melhoramento, onde com a seleção de árvores superiores fosse possível se obter uma plantação mais uniforme, que possuíssem características desejáveis tais como maior resistência, altura e diâmetro. O sucesso dessa técnica acontece graças à facilidade que o eucalipto oferece na hibridização, onde se obtém cruzamentos entre diferentes espécies. Em meados da década de 80 surgiu a técnica de clonagem do

eucalipto que foi incorporada aos programas de melhoramento para aumentar as boas combinações genéticas. A utilização dessa tecnologia propiciou uma alta produção de eucalipto com qualidade e baixo custo, fazendo com que o Brasil se destacasse mundialmente. (CARVALHO, 2000; CIB, 2008; FERREIRA e SANTOS, 1997).

Dentre as novas tecnologias que vem sendo incorporadas ao melhoramento da qualidade da madeira, principalmente para fins industriais, se destaca o mapeamento genético, transgenia e a utilização de microssatélites (SANSALONI, 2008). Em 2014, Myburg et al seqüenciaram e montaram 94% do genoma *Eucalyptus grandis*. Dados genômicos como esses são de suma importância para compreender a biologia da planta e os genes envolvidos em diferentes processos. A análise funcional desses genes pode ser feita com o uso da transformação genética em sistema *in vitro*, que possibilita a introdução de genes de interesse em um genótipo desejável, de uma maneira controlada, reduzindo os longos períodos de geração e ciclos reprodutivos. Essa tecnologia permite obter variedades mais produtivas e resistentes a estresses bióticos (pragas e doenças) e abióticos (seca, frio e salinidade) (SPOKEVICIUS, 2005).

Obter um eucalipto contendo um menor teor de lignina é uma característica desejável para as indústrias de papel de celulose. Isso porque durante o processo de produção, há um gasto excessivo de agentes químicos para a retirada de toda lignina, pois seu resíduo resulta na descoloração e enfraquecimento da polpa de celulose. Dessa maneira, um eucalipto transgênico que produza menos lignina seria de grande importância para a fabricação de papel de qualidade (GIRIJASHANKAR, 2011). Kawaoka et al. (2006) identificou em tabaco o gene *Nt1iml*, que codifica o fator de transcrição LIM que se liga à fenilalanina amônia liase e inibe a transcrição de alguns genes via de fenilpropanoides tais como fenilalanina amônia liase (PAL), hidroxicinamato-CoA ligase (4CL) e álcool cinâmico desidrogenase (CAD), envolvidos na biossíntese de lignina. Uma construção anti-senso do fator de transcrição do tabaco *Ntlim* foi introduzido nas plantas de *Eucalyptus camaldulensis*. As plantas transgênicas apresentaram uma redução na regulação dos genes da via biossintética da lignina, causando uma queda de 20-29% do teor de lignina nos resíduos da parede celular dos tecidos do xilema do caule.

Estresses bióticos e abióticos também afetam diretamente no crescimento, produtividade e qualidade das culturas. Uma estratégia é desenvolver árvores transgênicas com genes voltados à tolerância aos possíveis estresses que estão presentes nos plantis (GIRIJASHANKAR, 2011). Navarro et al (2011), isolou de *E. gunnie* dois genes da via CBF (EguCBF1a e EguCBF1b), essa via desempenha papel na tolerância ao congelamento. Esses genes foram inseridos em um híbrido de eucalipto (*E. urophylla* × *E. grandis*) que é sensível a baixas temperaturas, linhagens controle e transformadas foram aclimatadas no frio (-1 ° C / h até -7,5 ou -8 ° C). As plantas transgênicas apresentaram uma melhor tolerância ao congelamento, foi observada a sobrevivência da maioria das linhagens a -8 ° C, enquanto todas as controle morreram. Esse experimento comprova a funcionalidade das proteínas EguCBF1a / b.

Grande parte das pesquisas em torno do eucalipto transgênico são realizadas por empresas privadas e sua utilização para fins comerciais ainda está só no início devido, pois ainda existem alguns obstáculos, como altos custos de geração de plantas transgênicas, patentes e falta de informação sobre o escape de transgene em espécies de árvores florestais (GIRIJASHANKAR, 2011). Dessa maneira, uma das alternativas para se compreender a biologia molecular do eucalipto é a transformação genética utilizando plantas modelos, como por exemplo, a *Arabidopsis thaliana*, tomate e tabaco. Para ser considerada uma boa planta modelo são necessárias algumas características, tais como: genoma pequeno, ciclo de vida curto e fácil manipulação (DELATORRE, 2008). Em 2009, Sonoda et al. verificaram que o gene *EcHB1* de *Eucalyptus camaldulensis* poderia ser um bom candidato na melhoria da biomassa de eucalipto, uma vez que está relacionado ao desenvolvimento do xilema. Esse gene foi utilizado para obtenção de plantas transgênicas de tabaco e como resultado as plantas apresentaram maior comprimento de fibra (20%) e aumento da altura da planta (50%) quando comparadas a planta controle, comprovando as melhorias na biossíntese da parede celular do xilema e no crescimento, o que leva esse gene a ser um potencial alvo para obtenção de eucalipto de melhor qualidade.

3.3. *EucXET*

Em um projeto derivado do 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. Entre os transcritos identificados como diferencialmente expressos em *E. grandis* e *E.globulus* estava a sequência que codifica uma proteína homóloga à xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase (XTH), enzima que atua no rearranjo dos componentes estruturais da parede celular vegetal (MEDEIROS, 2009). Este gene tornou-se alvo do presente trabalho e foi denominado *EucXET* mostrando uma expressão 9 vezes maior em *E. grandis* em relação à *E. globulus*.

3.3.1. Mecanismo de ação da xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase (XTH)

A parede celular é uma estrutura organizada que desempenha diversas funções, como proteção, rigidez mecânica, manutenção da morfologia e controle a expansão celular, fator essencial para o crescimento, diferenciação vascular e germinação do vegetal (KEEGSTRA, 2010). A parede celular pode ser classificada em primária e secundária. A primária é sintetizada durante o crescimento das plantas e possui estruturas finas e flexíveis, constituídas de celulose, xiloglucanos e pectinas. A parede secundária apresenta composição semelhante a primária, acrescida de lignina que confere rigidez aos tecidos que cessaram o crescimento. (COSGROVE e JARVIS, 2012; JOHANSSON, et al., 2004). O xiloglucano é a maior hemicelulose em plantas não gramíneas e está presente em todas as plantas vasculares. Possui uma forte ligação com as microfibrilas de celulose e para ocorrer a expansão celular é preciso afrouxar essas ligações (POPPER e FRY, 2004). Em 1989 Fry identificou que as enzimas metabolizadoras de xiloglucano desempenhavam uma atividade em todos os processos que requeriam a remodelação das paredes celulares. Posteriormente essas enzimas foram nomeadas de xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase (XTH) (ROSE et al., 2002).

As proteínas XTH possuem duas atividades catalíticas distintas: xiloglucano endo-hidrolase (XEH) e a endotransglicosilase (XET). O domínio XEH reúne o final de redução do xiloglucano a uma molécula de água, resultando em encurtamento irreversível da cadeia de xiloglucano (NISHITANI e TOMINAGA, 1992). Já o domínio XET remodela oligossacarídeos de xiloglucano via um processo de transglicosilação (RUPRECHT, 2018). Primeiro a XET cliva as cadeias curtas de xiloglucano, permitindo que as microfibrilas de celulose se separem e a célula se expanda. Em seguida, XET liga o a ponta clivada à xiloglucano recém-gerado, restaurando assim a estrutura de parede celular estável (SMITH e FRY 1991) (Figura 2). Acredita-se que os efeitos do XET na expansão celular podem depender das quantidades relativas da mesma e de xiloglucano secretos na parede celular. Se a quantidade de xiloglucano for muito maior do que a de XET, eles se unem e formam um complexo, dessa maneira a enzima só pode transglicosilar as extremidades não redutoras de xiloglucano. Dessa forma aumenta e fortalece a rede de xiloglucano na parede celular. Porém, quando a quantidade de XET sintetizada for maior do que a de xiloglucano, essa pode entrar na parede celular e “cortar” as amarras, com isso enfraquece a parede promovendo a expansão (NISHIKUBO, 2011).

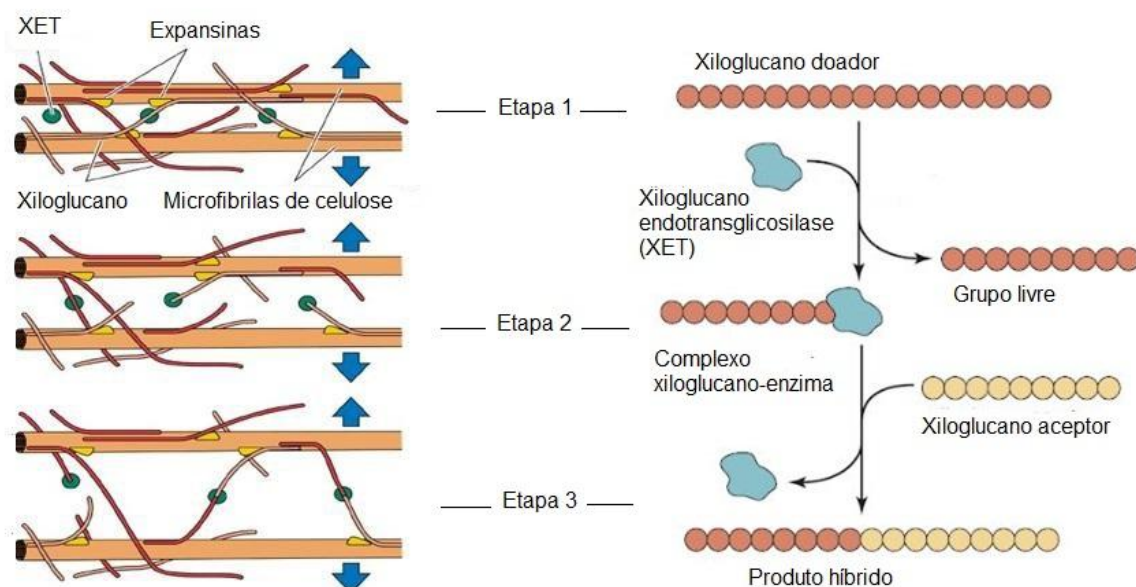


Figura 2. Ação do xiloglucano endotransglicosilase (XET), clivando e unindo polímeros de xiloglucano em novas configurações. Fonte: TAIZ, et al., 2017. Baseado em Smith e Fry 1991.

Desde a descoberta das XTHs no início da década de 90, o interesse em conhecer a diversidade de genes e as funções relacionadas aos modificadores de paredes aumentou. Um dos primeiros estudos foi realizado por Nishitani (1997), nele genes que codificam XTHs foram parcial ou totalmente seqüenciados em 8 espécies diferentes, onde observou-se que XTH é codificado por uma família multigênica, dividida em três subgrupos filogeneticamente distintos. A atividade XTH está presente nos principais grupos de plantas verdes. Sugerindo que essas enzimas são essenciais para o desenvolvimento de todas as plantas terrestres e o seu mecanismo de expansão se originou antes da divergência evolutiva da Chlorobionta (IURLARO, 2016; VAN, 2006). Em 1999, Campbell e Braam observaram que 46 XTHs presentes em 14 espécies de plantas compartilham entre 34-90% de identidade de aminoácidos, sendo que esse índice foi maior dentro do grupo I, onde as espécies compartilham 70-89% de identidade, sugerindo que as proteínas podem exercer funções similares em diferentes espécies. Em contra partida, as maiores divergências de seqüência são encontradas, entre diferentes proteínas de uma única espécie, sugerindo que essas proteínas divergentes desenvolveram funções distintas dentro de uma espécie.

3.3.2. Resposta a estresses bióticos e abióticos

Os estresses abióticos e bióticos afetam a dinâmica das paredes celulares, fazendo com que as mesmas sejam remodeladas para aumentar as chances de sobrevivência da planta. Esse remodelamento causado pelas XTHs, durante o processo de expansão e divisão celular sugere possíveis respostas as condições de estresse desfavoráveis (IURLARO, 2016; TENHAKEN, 2015). Le Gall e colaboradores (2015) compararam artigos que trabalharam com efeitos de oito fatores de estresse abióticos (seca, inundações, calor, frio, salinidade, metais, irradiância de luz e poluentes do ar) sobre o metabolismo da parede celular vegetal. Com essa análise foi possível identificar que frente a estresses ocorre na parede primária um aumento significativo no nível de XTH e proteínas da expansina. A relação de XTH com resistência à estresse biótico foi também observada em outras espécies vegetais, como a soja. No trabalho de Morales (2009) foi analisada a

expressão de genes de soja envolvidos na resistência ao nematóide *Meloidogyne javanica*. Em uma variedade resistente houve um aumento de 3,76 vezes na quantidade de transcritos de XTH quando inoculada com o nematóide. Contudo, em plantas híbridas provenientes do cruzamento da variedade resistente com uma susceptível, houve um aumento de 84,94 vezes. Este aumento na expressão sugere que o gene ocasione um aumento da espessura da parede celular, impedindo que o nematóide consiga se estabelecer adequadamente, desenvolvendo um mecanismo de defesa das plantas à infecção de *M. javanica*. Lurlaro e colaboradores (2016) investigaram o potencial de XTH na tolerância ao estresse em mudas de trigo. Foi avaliada a atividade de XTH sob os efeitos da desidratação e da exposição ao calor. A região apical da raiz foi o local mais afetado por ambos os estresses, sugerindo o papel desse órgão na percepção de estresse e sinalização para todo o organismo. A desidratação e o estresse térmico influenciaram de maneira diferente a atividade e ação de XTH em mudas de trigo. A desidratação provocou um aumento geral da atividade e ação XTH, enquanto o calor induziu uma diminuição. Isso sugere um envolvimento diferente das enzimas XTH nos mecanismos de respostas de estresse abiótico.

O gene *CaXTH3*, gene pertencente a subfamília XTH, foi induzido por estresses abióticos em plantas de pimenta, podendo ser um potencial alvo para melhorar a tolerância ao estresse das plantas de cultivo. Para avaliar essa hipótese, Choi et al (2011) inseriram o gene em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*). Foram analisadas a tolerância a seca e ao estresse salino das linhagens transgênicas e controle. As linhagens de tomate transgênico não apresentaram modificações fenotípicas como morfologia anormal e retardo de crescimento, em condições de crescimento normais. Porém, mostraram uma tolerância de sal fortemente aumentada com raízes mais longas. Provavelmente a atividade da XTH gerou um fortalecimento da parede celular das células mesófilas e remodelou a parede celular dos protegendo-as da perda excessiva de água

XTHs desempenharam papéis importantes no crescimento e aderência de frutas, contribuindo para a firmeza ou amolecimento pós-colheita de frutas, como kiwi, maçã, morango (ATKINSON, 2009; NARDI, 2014). Han et al (2017) inseriram em tomate e *Arabidopsis* o gene *DkXTH1* que codifica a enzima XTH. Esse gene foi

isolado de frutos de caqui, cuja expressão foi maior na fruta imatura, indicando que eles executam funções fundamentais para rápida divisão e expansão de células de frutos (HAN et al., 2015). *Arabidopsis* transgênica expressando *DkXTH1* apresentou folhas maiores em comparação com a planta de selvagem, além disso tiveram uma maior tolerância ao estresse abiótico. No tomate, a superexpressão de *DkXTH1* resultou em células maiores, com maior densidade de parede celular e espaços intercelulares. Essas mudanças resultaram em frutas de maior diâmetro e tornaram as células mais fortes para manter a integridade estrutural, assim, retardando o amolecimento das frutas.

Embora o gene XTH esteja envolvido nas resposta aos estímulos abióticos e abióticos, pouco se sabe sobre seu mecanismo cis-regulador. Iqbal et al, 2017 analisou a resposta do promotor XET na presença de fitohormônios e estresses abióticos. Para isso, um fragmento de *Populus euphratica* com promotor XET (*PeXET*) e gene repórter de b-glucuronidase (*gusA*), foi inserido em plantas de *Nicotiana tabacum* via *Agrobacterium tumefaciens*. As propriedades funcionais do promotor foram examinadas por análises quantitativas de coloração GUS e fluorescência. A análise da atividade GUS confirmou que o promotor *PeXET* é induzido pelos hormônios das plantas, bem como por vários estresses abióticos, principalmente iso-osmóticos, variações de temperatura e aumento de pH. Apesar de ser um promotor altamente indutível, o que confere características vantajosas para o desenvolvimento em condições ambientais distintas, o mecanismo molecular do *PeXET* precisar ser melhor compreendido.

3.3.3. Atuação da XTH na formação da madeira

Para entender os papéis de diferentes genes *XTH* durante a formação da madeira, Nisikubo et al (2011) identificaram genes *XTH* expressos em tecidos formadores de madeira de um híbrido de álamo (*Populus tremula* × *tremuloides*) e determinaram os padrões de expressão durante a biossíntese da parede primária e secundária. Além disso, desenvolveram linhagens transgênicas superexpressando o gene *PtxtXET16-34* com o objetivo de avaliar o papel de XTH no desenvolvimento

de madeira. Foram encontrados pelo menos 16 genes codificando XTHs sendo expressos no desenvolvimento de madeira, a maioria teve alta expressão no floema e *XET16-34* foi mais expresso em xilema de paredes primárias. Nenhum gene analisado mostrou expressão preferencial no xilema de parede secundária. Nas linhagens transgênicas a superexpressão de XTH promoveu o crescimento do elemento vaso, mas não a expansão da fibra. Percebeu-se também que a atividade de XTH induziu mudanças no xiloglucano da parede celular. Durante a transição do estágio primário para o paramento secundário das células de madeira, todo o xiloglucano torna-se fortemente ligado às microfibrilas de celulose.

Pelo exposto, o papel das XTHs está fortemente relacionado à construção e modificação da arquitetura da parede celular dos tecidos em crescimento. Mas sua ação na formação de paredes secundárias, em particular, é menos compreendida. Em 2001, O'Donoghue analisou a atividade de XTH em *Asparagus officinalis* e observou que a enzima estava presente em todas as áreas de tecido primário, porém houve grande atividade nos locais onde o crescimento do tecido já havia cessado. Nesse contexto provavelmente a XTH desempenha um papel na degradação da parede ou em rearranjos de xiloglucanos mal definidos. A XTH também pode estar presente durante os estágios iniciais da síntese da parede secundária, quando o xiloglucano está sendo depositado na lamela média. Em um ensaio de imunolocalização de XTH in situ em hastes de álamo, Bourquin et al (2002) mostrou que os níveis da enzima aumentaram na borda entre as camadas de parede primária e secundária no momento da deposição da parede secundária. Esses dados sugerem que a XTH tem um papel de reestruturação criando e reforçando as conexões entre as camadas de parede primária e secundária. Contudo, as informações ligadas à atuação da enzima na estruturação da parede secundária ainda são escassas, sendo necessário um maior estudo na área.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material biológico

Plantas de *Nicotiana tabacum* variedade Havana foram transformadas por Medeiros (2009) com o gene *EucXET* dirigido sob a expressão do promotor CAMV35S, via *Agrobacterium tumefaciens* seguindo protocolo estabelecido por Brasileiro e Carneiro (1998) (Figura 3).

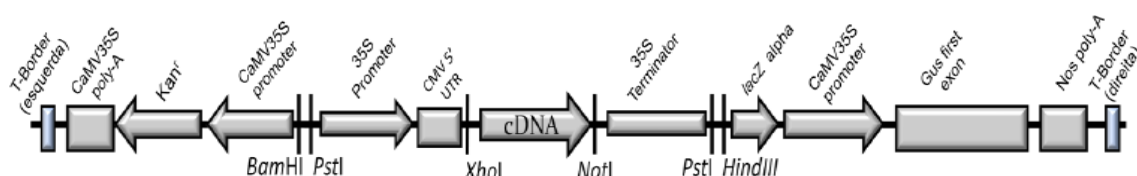


Figura 3. Esquema da região de transferência (T-DNA) do vetor binário pCambia 2301 ligada ao cassete de super-expressão (Medeiros, 2009).

Quatro transformantes independentes foram selecionados, ao acaso, para os estudos posteriores. Essas linhagens foram denominadas L1, L2, L3 e L4. Após diagnóstico molecular, as plantas foram levadas para a casa de vegetação e cultivadas até a obtenção das sementes. Todos os experimentos descritos nesse trabalho foram realizados utilizando a T1 das plantas GM.

Estas plantas, junto com a controle não transformada (NT) foram mantidas em regime de cultura de tecidos (sala de crescimento com temperatura constante à 28° C e intensidade luminosa alternada entre 16/8 horas de fotoperíodo luz/escuro) em meio MS.

4.2. Extração de DNA

Sementes representativas da T1 das linhagens transgênicas foram germinadas em meio MS (MURASHIGUE E SKOOG, 1962) acrescido de canamicina

a 100 mg/mL. Foram germinadas também sementes de planta não transformada, controle, em meio MS sem adição de antibiótico. Após 30 dias de crescimento, folhas das plantas foram isoladas e utilizadas para confirmação da integração do transgene. Para tanto, 100mg de folha das linhagens transgênicas (L1 a L4) e controle, não transformado (NT), foram submetidas à extração de DNA genômico utilizando o método CTAB (DOYLE E DOYLE, 1987), com modificações. Resumidamente, o material vegetal obtido foi transferido para um almofariz contendo nitrogênio líquido e macerado até obtenção de um pó fino. Cerca de 100 mg do material macerado foi transferido para microtubos e a este foi adicionado 400 µL do tampão EB-CTAB (Tris-HCl pH 9,0 100 mM; CTAB 2%; EDTA 25 mM; NaCl 2 M; PVP 2%; espermidina 0,5 g/L). O extrato foi incubado por 20 minutos a 60° C. Terminado o tempo de incubação adicionou-se 400 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), seguido de centrifugação por 5 minutos a 12000 rpm. Cerca de 300 µL do sobrenadante foi transferido para novo tubo e o mesmo volume de isopropanol gelado foi adicionado. A mistura foi incubada por 30 minutos a -20°C. O material foi novamente centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos e o precipitado foi lavado com etanol 70%. O *pellet* foi seco ao ar e ressuspenso em 40 µL de água ultrapura autoclavada. As amostras de DNA foram tratadas com RNase (10 mg/mL) por 30 minutos a 37° e visualizadas em gel de agarose 1%, coradas com GelRed®.

4.3. Reação em Cadeia da Polimerase

O DNA extraído e tratado foi utilizado com molde para a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) visando à amplificação do gene codificante das proteína neomicina fosfotransferase (*nptII*) para confirmação do estado transgênico das plantas selecionadas. Os *primers* utilizados foram: *nptII* -F (5'-ATGGGGATTGAACAAGATGGATTG-3') *nptII*-R e (5'-TCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGC-3'). As reações de amplificação, foram feitas com tampão *Taq* DNA polimerase (1x), MgCl₂ (50 mMol), dNTPs (5 mMol), *primer forward* (5 pMol), *primer reverse* (5 pMol), DNA (200 ng), *Taq* DNA polimerase (3 U), e o volume final foi ajustado para 20 µL com água ultrapura autoclavada. Uma reação desprovida de amostra de DNA, mas composta por todos os demais

elementos da PCR, foi preparada afim de compor o controle negativo das ampliações. Já para o controle positivo foi usado como molde o DNA plasmidial pCAMBIA2301. Para o par de *primers* específico foi utilizado o seguinte programa de ciclagem: 94 °C – 3 min, 40 ciclos { 94 °C – 1 min, 58° C – 1min, 72 °C – 1 min 30s}, 72 °C – 10 min.

Os produtos obtidos pela técnica da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed®. Aplicou-se uma carga elétrica de 80 volts por 30 minutos, decorrido esse período, o gel foi colocado sobre iluminação ultravioleta, fotografado e analisado pelo programa Kodak ID 290.

4.4. Medidas de crescimento

Três clones de cada linhagem de planta transgênica expressando *EucXET* (L1 a L4) e plantas controle (NT) foram aclimatados e transferidas para a casa de vegetação. As plantas foram transplantadas em vasos de 10 L contendo substrato tipo plantmax misturado 1:1 com terra vegetal. Após plantio, os vasos foram distribuídos aleatoriamente sobre uma bancada. A rega com água foi mantida diariamente. Em intervalos de 3 dias as plantas eram medidas com auxílio de trena. A altura observada era entre o solo (base do caule) e o meristema apical das plantas. As medições foram feitas até as plantas o florescerem. Os dados, representativo das 3 réplicas biológicas, foram tabulados e analisados estatisticamente. O caule e a folha de cada tratamento foram coletados, congelados com nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C para posteriores análises moleculares.

4.5. Indução de calogênese

Para analisar a influência do *EucXET* na divisão celular, explantes de tecido caulinar de plantas transgênicas (L1 a L4) e NT, mantidas in vitro por 60 dias, sob condições controladas, foram isolados e transferidos para tubos de ensaio contendo

o meio MS sólido acrescido de cinetina (1mg/mL) e naftalenoacético ([ANA] 1mg/mL). Os tubos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura constante à 25° C e intensidade luminosa de 32 μ moles de fótons.m.s e fotoperíodo de 16/8 horas de luz/escuro. Após 30 dias, os calos foram fotografados.

Para se obter a taxa de divisão celular de células em suspensão, os calos foram transferidos para erlenmeyers contendo meio líquido para *Nicotiana tabacum* (NT1) acrescido de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Os erlenmeyers foram mantidos em sala de crescimento, sob agitação.

4.6. Análise protéica

Amostras de folha (terceira folha completamente expandida) e caule (região mediana) foram isoladas de 3 réplicas biológicas de cada linhagem de planta transgênica e NT, após 60 dias em casa de vegetação.

As amostras foram liofilizadas e as réplicas biológicas foram maceradas juntas na presença de N₂ líquido e 1% de polivinilpirrolidona (PVP), formando um pool para cada planta. A extração foi realizada segundo Pirovani et al (2008). Os extratos protéicos obtidos foram quantificados através do 2-D Quant-kit (GE Healthcare) utilizando albumina do soro bovino (BSA), como padrão. Alíquotas com concentrações equivalentes 35 μ g de folha e caule de cada amostra foram separadas por SDS-PAGE (12,5%) e transferidas para a membrana de nitrocelulose utilizando o sistema mini Trans-Blot (BioRad) de acordo com as instruções do fabricante. A membrana foi bloqueada com uma solução de leite em pó a 2,5% em TBS-T 1x, por 30 minutos e em seguida incubada com anticorpo anti-EucXET (diluição 1:1000), produzidos em coelho por Medeiros (2009), durante 1h à temperatura ambiente. Como anticorpo secundário foi utilizado o IgG cabra anti-coelho conjugada com fosfatase alcalina (Invitrogen), (diluição 1:5000). O 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) e o p-nitrozol tetrazólio (NBT) (Promega) foram utilizados como substratos para a reação colorimétrica da atividade da fosfatase alcalina.

4.7. Indução de estresse osmótico

As sementes das 4 linhagens de plantas transgênicas (L1 a L4) e controle, não transformada, foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 2% e plaqueadas em meio MS contendo canamicina 100mg/mL. As placas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura constante à 25° C e intensidade luminosa de 32 μ moles de fótons.m.s e fotoperíodo de 16/8 horas de luz/escuro. Após 15 dias, oito plantas cada linhagem transgênica e NT foram transferidas para microplacas contendo meio MS líquido acrescido com NaCl, Manitol ou PEG (polietilenoglicol 6000), em concentrações para impor um potencial hídrico de -1MPa. Como controle plantas transgênicas e NT foram transferidas para meio MS sem indutores. As placas foram vedadas e as plantas foram mantidas em sala de crescimento por 15 dias. No final deste período foram avaliados aspectos fenotípicos como clorose foliar e comprimento das plantas.

4.8. Detecção de ROS

Para avaliar o acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi utilizado 3,3-diaminobenzidina (DAB) (THORDAL-CHRISTENSEN et al., 1997). Três discos foliares foram isolados das folhas mais jovens de plantas transgênicas e NT mantidas *in vitro* por 60 dias, sob condições controladas. O material vegetal foi imerso em solução de 1 mg/mL de DAB com pH 7,5 e infiltrado a vácuo por 20 min. Em seguida as amostras foram mantidas no escuro, a temperatura ambiente por 24 h. Após esse período foram fervidas em uma solução de etanol 96% por 20 min e lavadas duas vezes com etanol 50%. As imagens foram capturadas em Lupa Leica EZ4, com 4,5 x de aumento.

4.9. Atividades enzimáticas

Para realizar a determinação das atividades enzimáticas das peroxidases, foi coletado cerca de 100 mg de material vegetal fresco isolado de folhas jovens das plantas transgênicas (L1 a L4) e NT, mantidas *in vitro*. As amostras foram maceradas em 800 µL do tampão de extração específico para cada ensaio enzimático. Em seguida foram sonicadas em ultrassonicador de sonda (Ultrasonic processor Gex 130, 130 W), com amplitude 70%, durante 40 segundos, com intervalos de tempo de 5s ON e 10s OFF e submetidas a centrifugação a 14000 rpm por 10 min à 4°C. Os extratos enzimáticos foram dosados por Bradford 1976.

As atividades enzimáticas foram realizadas em triplicata experimental e os resultados foram analisados utilizando o teste T de Student.

4.9.1. Peroxidase do ascorbato (APX)

A atividade da APX foi determinada seguindo metodologia descrita por Nakano e Asada (1981), com modificações. A atividade é expressa pela quantidade de enzima que catalisa a redução de H_2O_2 a H_2O através da oxidação do ascorbato. O tampão de reação consistiu de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,3), 0,1 mM de EDTA, 0,5 mM de ascorbato e 5 µL do extrato bruto. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplacas (Spectramax) no comprimento de onda de 290 nm.

4.9.2. Peroxidase do guaiacol (GPX)

A atividade da GPX foi determinada pelo aumento do consumo de guaiacol em µmol s⁻¹ g⁻¹ de biomassa fresca. A atividade foi realizada em microplacas contendo 140 µL de tampão de reação GPX 2x [40 mmol/L de guaiacol, H_2O_2 a 0,06% e fosfato de sódio (20 mmol L⁻¹, pH 6,0)], 138,5 µL de tampão fosfato (50 mmol/L, pH 6,0) e 1,5 µL de extrato enzimático bruto. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplacas (Spectramax), no comprimento de onda de 470 nm.

4.10. Análise filogenética

Para análise filogenética as sequências de proteínas XTH encontradas em *N. tabacum* (WANG et al., 2018) e a sequência de EucXET de *E. grandis* foram alinhadas e comparadas. Os alinhamentos das sequências de aminoácidos foram realizadas usando o software ClustalW (THOMPSON et al., 1994) e a árvore filogenética foi construída com base no método Neighbor-Joining Tree (1000 testes bootstrap) utilizando o software MEGAX (KUMAR et al., 2018). As sequências das proteínas utilizadas para o alinhamento encontram-se no anexo

4.11. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o software BioEstat 5.3. Diferenças estatísticas entre as plantas controle (não transformadas) e linhas transgênicas foram avaliadas com base na análise de variância (ANOVA) e as médias foram separadas pelo teste T de Student, com um valor crítico de $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ e $p \leq 0,001$.

5. RESULTADOS

5.1. Comprovação do estado transgênico das plantas transformadas e regeneradas

O sistema de transformação mediado por *A. tumefaciens* favorece a integração dos genes de seleção e de interesse, uma vez que ambos estarão localizados no mesmo T-DNA (DNA de transferência) artificial do vetor binário. Essa região será inserida no genoma da planta por intermédio da ação de proteínas codificadas por genes de virulência localizados no plasmídeo indutor de tumor (Ti).

O diagnóstico molecular, comprovando a integração do transgene no genoma das plantas regeneradas após o evento de transformação, foi realizado por meio da

amplificação do gene de seleção *nptII* também presente no T-DNA do vetor binário de transformação de plantas pCAMBIA2301. Os fragmentos de DNA amplificados nas reações de PCR foram visualizados em gel de agarose após eletroforese (Figura 4). A presença do DNA amplificado nas linhagens L1 a L4 indicaram a integração do transgene nas plantas testadas, confirmando seu estado transgênico. O DNA plasmidial do vetor pCAMBIA 2301 foi utilizado como controle positivo descartando a possibilidade de ter ocorrido resultados falsos positivos. As bandas observadas nas linhagens transformadas e no controle positivo apresentaram aproximadamente 654 pares de base, tamanho esperado para o produto da amplificação do *nptII*. Não foi observada amplificação na reação que não continha DNA genômico, confirmando que as bandas observadas nas demais amostras não foram devidas à contaminação das reações durante o preparo da PCR.

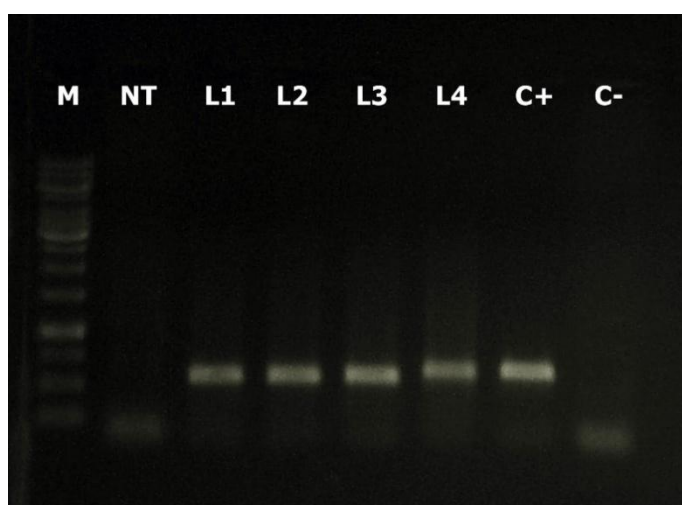


Figura 4. Diagnóstico do estado de transgenia das plantas de *Nicotiana tabacum*. DNA genômico foi extraído de folhas de *N. tabacum* e submetido à reação de PCR com *primer* específico para *nptII*. M: marcador Gene Ruler de 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific); NT: planta não transformada; L1 – L4: linhagens independentes de *N. tabacum* transformadas com *EucXET*; C+: DNA plasmidial de pCAMBIA 2301 (controle positivo); C-: reação de PCR sem conter DNA (controle negativo).

5.2. Expressão de *EucXET* altera o crescimento das plantas e a indução de calogênese

Três clones de cada linhagem transgênica e das plantas controle foram mantidos em casa de vegetação por 60 dias. Durante esse período a altura das plantas foi medida em intervalos de 3 dias. Foi observado que todas as plantas transgênicas *EucXET* iniciaram o processo de florescimento uma semana antes das plantas controle (Figura 5). Foi observado também que a altura média das plantas, no momento do florescimento, foi 9cm superior ao observado no controle. Nesse contexto, as linhagens L1 e L2 foram as que mais se desenvolveram apresentando crescimento final com diferença significativa ($p \leq 0.05$) em relação aos demais genótipos (Figura 6).

Resultado semelhante foi observado na indução de calos in vitro. Esses foram induzidos a partir da medula de plantas mantidas na sala de crescimento do laboratório de cultura de tecidos (clones das observadas em casa de vegetação). Foi observado que, apesar da calogênese das plantas transgênicas iniciar após as plantas controle, a velocidade na formação dos calos foi maior nas linhagens transgênicas resultando em calos transgênicos maiores do que os não transgênicos (controle) (Figura 7). Esse resultado sugere que a expressão do gene *EucXET* possivelmente está relacionada com taxa de divisão celular, porém ainda não foi possível medir a taxa de divisão de cada plantas, pois cultura de células em suspensão ainda não foi estabelecida.



Figura 5. A expressão de *EucXET* induz florescimento precoce em plantas de *Nicotiana tabacum* (círculo vermelho). Foto representativa do florescimento observado nas plantas expressando *EucXET* (planta B) enquanto as plantas controle se apresentavam na fase vegetativa (planta A). Foto ilustrativa de 3 réplicas biológicas registrada após 7 semanas em casa de vegetação

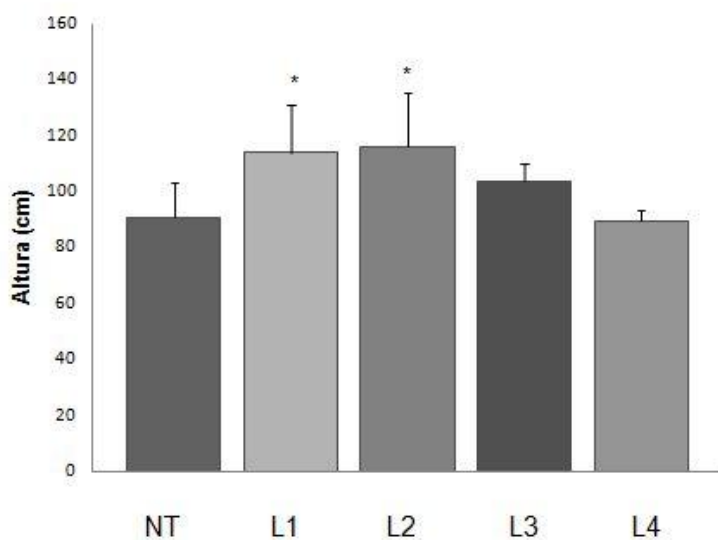


Figura 6. A superexpressão de *EucXET* induz o crescimento em plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum*. Gráfico representativo da altura final, em cm,

atingida pelas plantas controle, não transformadas (NT) e linhagens expressando *EucXET* (L1 a L4). Gráfico representativo de 3 réplicas biológicas.



Figura 7. A expressão de *EucXET* induz divisão celular. Foto representativa de 3 réplicas biológicas da cultura de calos das plantas NT e transgênicas (L1 a L4) após 30 dias em sistema de cultura de tecidos, com condições controladas.

5.3. Análise de imunodeteção

Para analisar o acúmulo do produto protéico exógeno, as proteínas totais do caule e da folha das plantas transformadas e controle foram extraídas e uma alíquota de 35 µg para cada amostra foi separada em SDS-PAGE 12,5%, resultando em géis espelho com proteínas com distribuição de 14 kDa a 97 kDa (Figura 8 A e B). As amostras de proteínas separadas e imobilizadas no SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose para hibridização e observação de bandas pelo método de *western blot*.

No *western* utilizando amostras protéicas extraídas de folha, duas bandas de tamanhos próximos ao esperado (33,7 kDa) foram reveladas nas amostras das linhagens transgênicas e apenas uma banda nas amostras controle (não transformadas). Para as plantas transformadas foi observada variação na intensidade das bandas para todas as linhagens, sendo L3 mais intensa, L1 com intensidade intermediária e L2 e L4 menos intensas (Figura 8 C). Nas amostras protéicas representativa do caule foi observada apenas uma banda para cada

amostra, sendo que essas apresentaram uma variação na intensidade das bandas reveladas, inversa a encontrada nas amostras de folha. As linhagens L2 e L4 foram as que apresentaram bandas com maior intensidade, L1 com intensidade intermediária e ausência de bandas na planta L3 (Figura 8 D).

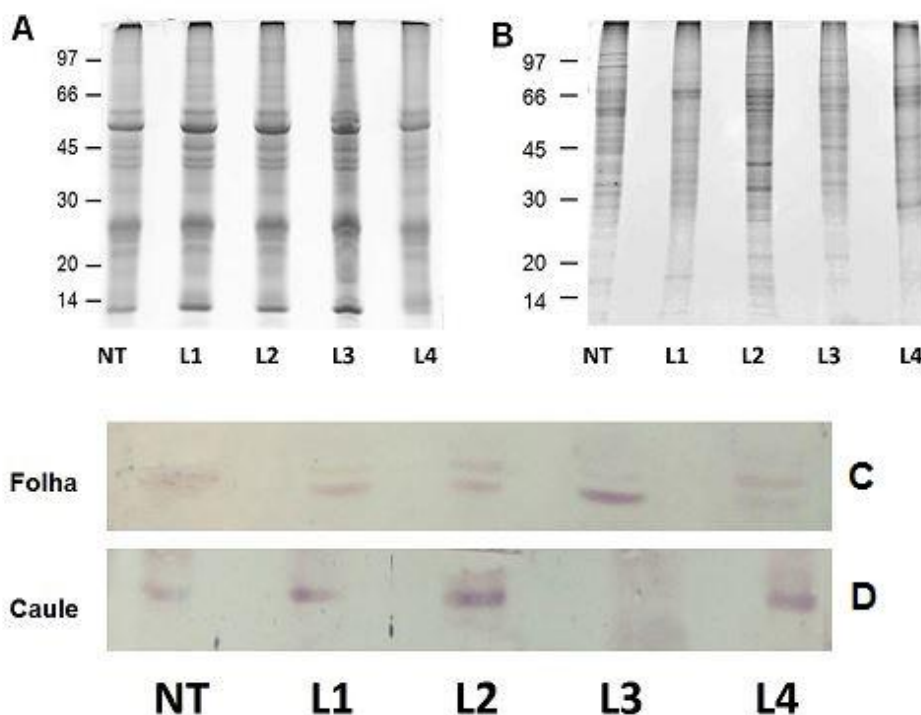


Figura 8. Transformação com *EucXET* induz mudanças no perfil protéico de *N. tabacum* e influencia no acúmulo de XET endógeno. 35µg de proteínas totais extraídas de folha (A) ou caule (B) de *Nicotiana tabacum* foram separadas em SDS-PAGE e visualizadas após coloração com comassie coloidal. Géis similares foram transferidos para membrana de nitrocelulose posteriormente sondada com anticorpo contra EucXET. NT: planta não transformada, L1 a L4: linhagens transgênicas de *N. tabacum*.

5.4. A expressão de *EucXET* aumenta a tolerância de plântulas de tabaco a estresse osmótico

Plântulas com 15 dias de germinação, representativas das 4 linhagens transgênicas expressando *EucXET* (L1 a L4) e plantas controle (não transformadas) foram submetidas a agentes indutores de estresse osmótico. Foram testados 3

indutores diferentes: NaCl, PEG e manitol, todos em concentração que fornecesse um potencial osmótico ao meio de 1Mpa. Após 15 dias de estresse, foi possível observar que as linhagens de plantas *EucXET* (L1 a L4) apresentaram a tolerância aos diferentes indutores de estresse aumentada em comparação com as plântulas controle. Todas as linhagens transgênicas testadas conseguiram manter o crescimento na presença do indutor de estresse, apesar de mais vagaroso quando comparado com as plantas mantidas em meio MS (controle) (Figura 9). As plantas não transformadas com *EucXET* (NT) não resistiram a nenhum dos tratamentos. Foi observado que o crescimento das NT estagnou assim que as plântulas foram submetidas aos indutores de estresse e as mesmas apresentavam-se completamente cloróticas ao final dos 15 dias.

As diferenças na taxa de crescimento entre as linhagens de plantas transgênicas (L1 a L4) e não transformadas (NT) foram observadas mesmo no tratamento controle (sem indutores de estresse). Nele, as plantas transgênicas apresentam um crescimento mais acentuado chegando a ter, depois de 15 dias, um tamanho até 2 vezes maior do que a planta NT. Apesar do potencial osmótico do meio de cultura ter sido ajustado para -1Mpa em todos os tratamentos, foi possível observar que a linhagem L3 foi a menos impactada pelo tratamento com NaCl visto que conseguiu manter o crescimento mais acelerado em comparação tanto com as plantas controle (NT) quanto com as demais linhagens transgênicas, L1, L2 e L4 (Figura 9).

Os tratamentos com PEG e manitol afetaram de uma maneira mais severa o crescimento das plantas transgênicas quando comparados com o tratamento controle, induzindo clorose mais severa, impactando mais no crescimento e folhas mais murchas. Entre as plantas transgênicas a L3 apresentou um maior tamanho para todos os tratamentos.

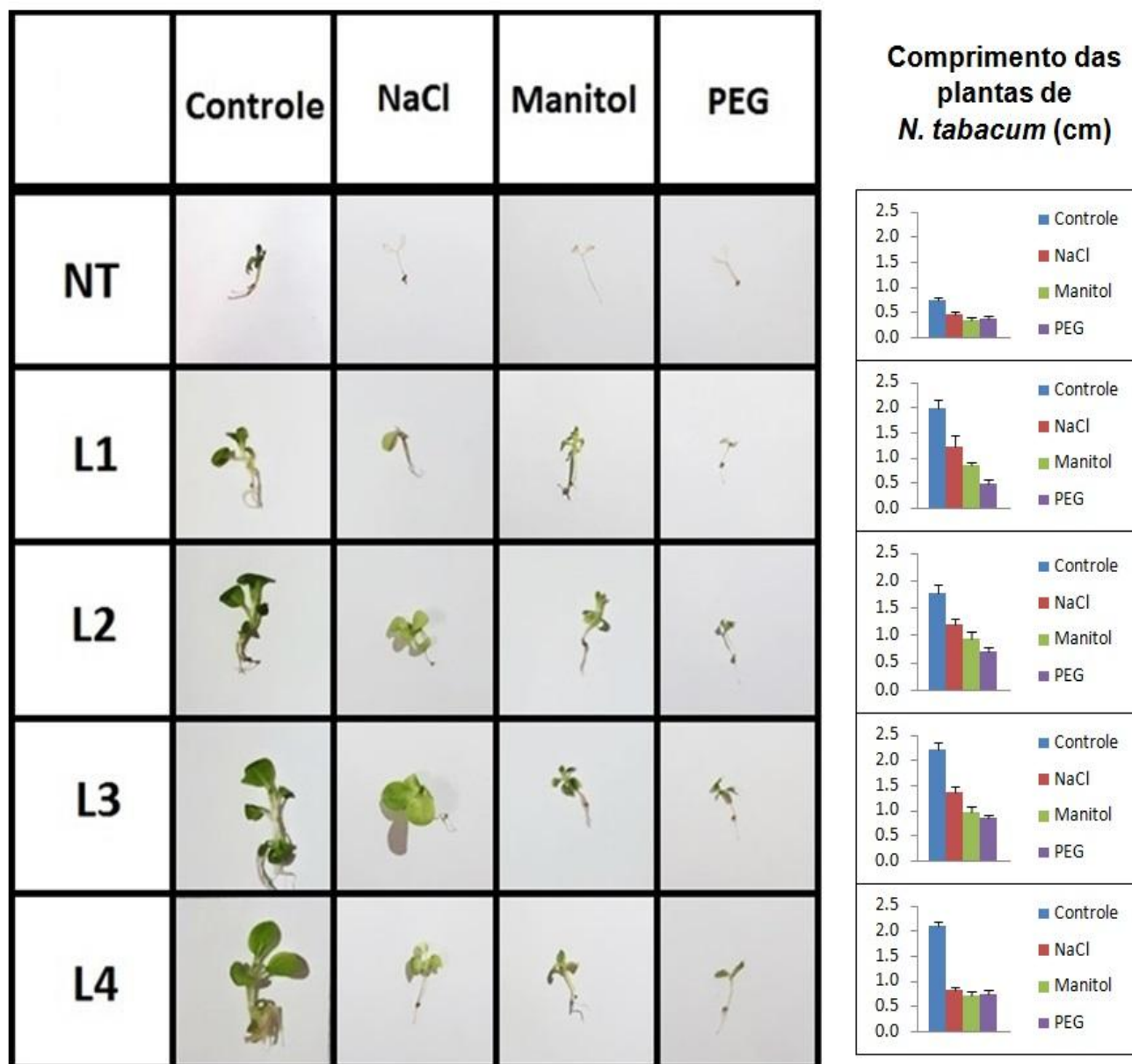


Figura 9. Expressão de *EucXET* induz, em plantas de tabaco, aumento na tolerância a estresse osmótico. Plântulas de *N. tabacum* NT (não transformada) ou expressando *EucXET* (L1 a L4) sob tratamento com cloreto de cálcio (NaCl), Manitol ou Polietilenoglicol (PEG). Fotos e gráficos de comprimento representativos de 8 réplicas biológicas, após 15 dias de tratamento.

5.5. Detecção de ROS

Visando avaliar se a superexpressão de *EucXET* em plantas de tabaco modificou a produção/acúmulo de H_2O_2 , discos foliares isolados das linhagens transgênicas (L1 a L4) e controle (NT) foram submetido ao ensaio com DAB. Nesse ensaio, o H_2O_2 presente nos tecidos vegetais reage com o DAB formando precipitados de coloração marrom. Foi possível, com este teste, identificar que comparativamente com as plantas NT, as plantas das linhagens transgênicas, com exceção da L2, apresentaram-se mais marrons. Sendo que os tons variaram entre as linhagens analisadas. As amostras isoladas da planta L3 foram as que apresentaram tonalidade marrom mais intensa, seguida das amostras de L1, com intensidade moderada de marrom e a linhagem L4 com menor intensidade (Figura 11)

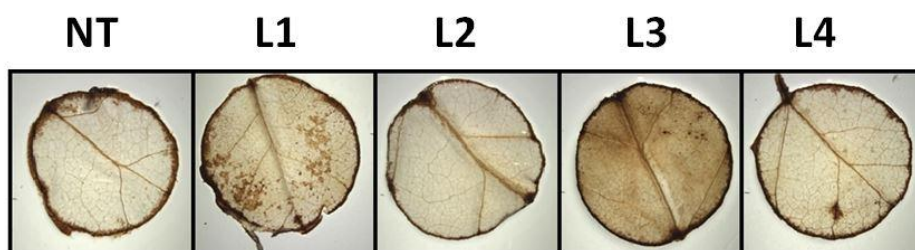


Figura 10. Nível de peróxido de hidrogênio em folhas de *N. tabacum* modifica após transformação com *EucXET*. Discos foliares de *N. tabacum* isolados de plantas mantidas *in vitro* não transformadas (NT) ou transformadas com *EucXET* (L1 a L4) foram submetidos a tratamento com 3,3-diaminobenzidine (DAB). Coloração marrom significa presença de H_2O_2 . Fotos capturadas em Lupa Leica, 4,5x e representativa de 3 réplicas biológicas.

5.6. Ensaio enzimáticos

As atividades das enzimáticas oxirredutoras foram dosadas em amostras representativas de caule e folhas das 4 linhagens de plantas transgênicas *EucXET* e plantas não transformadas (NT). A atividade de APX (peroxidase do ascorbato) em folhas foi maior em todas linhagens transgênicas, sendo que as plantas das

linhagens L3 e L2 tiveram uma atividade de 4 e 5 vezes, respectivamente, maior do que a planta controle (NT) (Figura 12 A). A APX nas amostras extraídas de caule foram muito menores do que as observadas em folha, diminuindo em até 30 vezes sua atividade. Em caule a atividade encontrada na planta NT foi maior do que a observada nas plantas transgênicas, onde L1 e L3 apresentaram menor atividade com diferença significativa de $p \leq 0,01$ e $p \leq 0,05$ (Figura 12 B).

A atividade da GPX (peroxidase do guaiacol) também foi dosada nas mesmas amostras utilizadas para a quantificação de APX. A figura mostra que em folhas o padrão de expressão da GPX seguiu a mesma tendência do observado para APX (Figura 12 A e 12 C). Não houve diferença significativa entre as atividades de GPX nas plantas NT e linhagem L1. A linhagem L4 teve um leve incremento na atividade de GPX, seguido pela linhagem L2 e a linhagem L3 foi a que apresentou a maior atividade ($p < 0,001$) dentre todas as plantas analisadas (Figura 12 C). A atividade de GPX em caules também se mostrou inferior ao observado nas folhas. Em caule a atividade encontrada na planta NT foi superior a encontrada nas linhagens transgênicas, com exceção da L3 que teve uma atividade de 1,5 vezes maior do que a NT, apresentando uma diferença significativa de $p \leq 0,001$ (Figura 12 D).

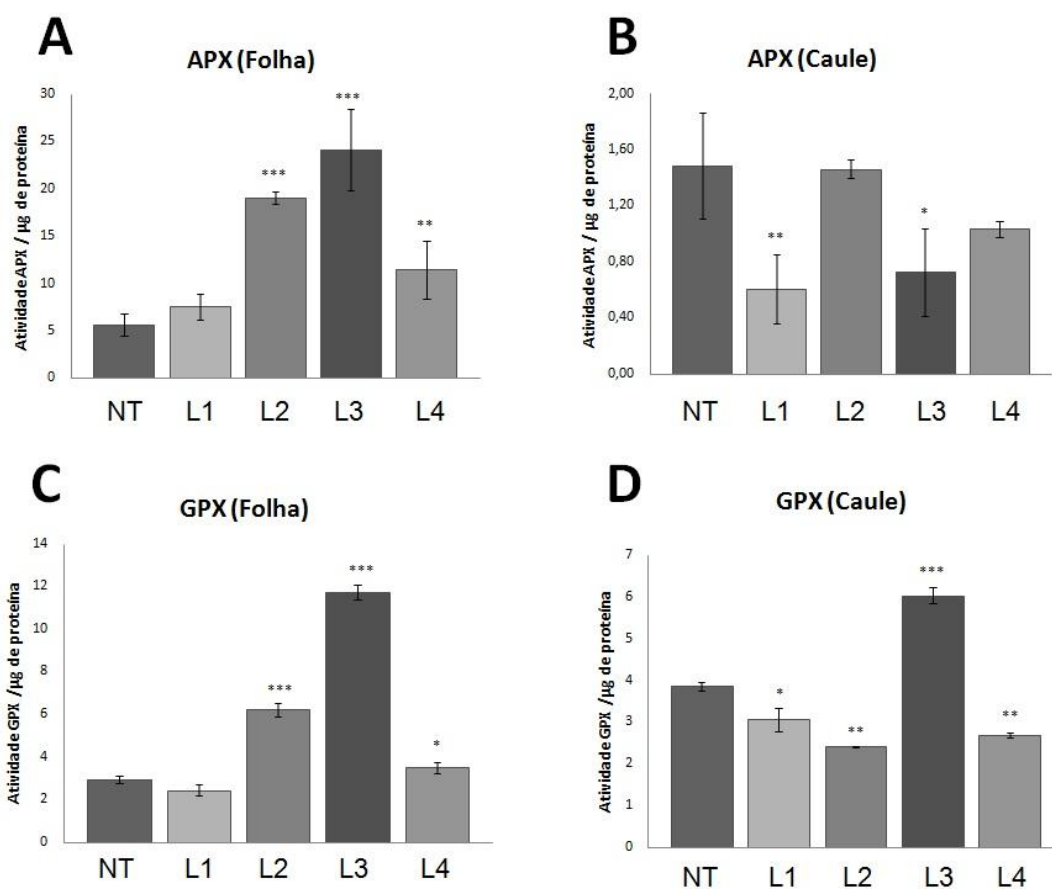


Figura 11. Atividade de peroxidases modifica em plantas transformadas com *EucXET*. Atividade das enzimas oxidorrredutoras Peroxidase do Ascorbato (APX, A e B) e Peroxidase do Guaiacol (GPX, C e D) foram dosadas em extratos protéicos extraídos de folhas e caules de plantas NT (não transformada) e transformadas com *EucXET* (linhagens L1 a L4). Plantas mantidas em sistema de cultura de tecidos. A barra de erros é representativa da triplicata. Diferenças estatísticas significativas para $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) e $p \leq 0,001$ (***).

5.7. Análise filogenética

Para gerar uma árvore filogenética, foram utilizadas a proteína *EucXET* alvo do nosso trabalho e as 56 proteínas XTH de *N. tabacum* (WANG et al., 2018). A análise filogenética revelou que a árvore foi dividida em três grupos principais. A maioria das XTHs de tabaco bem como a *EucXET* foram associadas ao grupo 1 e 2.

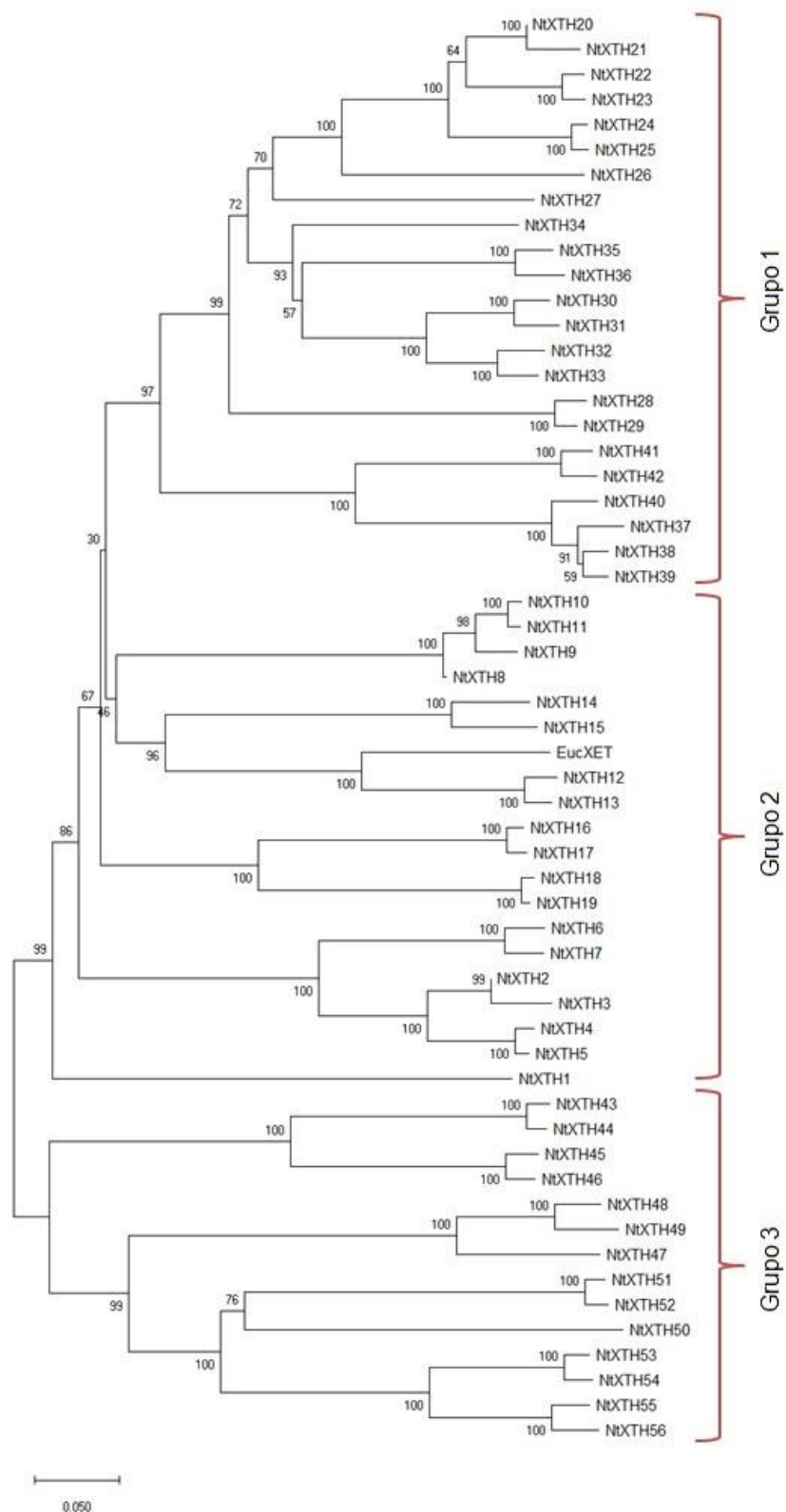


Figura 12. Neighbor-Joining - Filograma não enraizada de seqüências protéicas de xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase de *N. tabacum* (NtXTH) e *E. grandis* (EucXET)

6. DISCUSSÃO

As enzimas da família dos genes XET são consideradas enzimas-chave na regulação da expansão da parede celular durante o crescimento celular (COSGROVE, 2005). As XETs são responsáveis pela clivagem e rearranjo dos esqueletos de xiloglucano nas plantas e estão envolvidas em diversas funções como: alongamento da raiz primária, crescimento de hipocótilo, abertura de flores, abscisão de pétalas e formação de madeira (WU, et al., 2005; OSATO et al., 2006; HARADA et al., 2010; NISHIKUBO et al., 2011; SINGH et al., 2011).

Visando avaliar a função molecular de *EucXET*, plantas de *Nicotiana tabacum* foram transformadas com o gene no sentido senso. Foi observado que todas as linhagens mantidas em casa de vegetação apresentaram maior crescimento do que o observado nas plantas controle, sugerindo que o aumento no nível de XET deve se relacionar com mudanças impostas em nível de parede celular. Corroborando com essa hipótese, trabalhos realizados em Harada et al, 2010 conseguiram relacionar a atividade de XET à brotação e crescimento das flores, principalmente no estágio de abertura floral, pois envolve modificações na parede celular para provocar o alongamento, a expansão e a curvatura das pétalas (O'DONOGHUE et al., 2002; HARADA, et al., 2010). De maneira similar, observamos que as todas as linhagens transgênicas floresceram precocemente, quando comparadas com as plantas controle. Mudanças impostas na parede celular dessas plantas devem de fato ter ocorrido, visto que observamos que os caules das linhagens transgênicas apresentaram mais resistência ao corte com bisturi realizado à mão livre (dados não mostrados).

A análise de *western blot* de folha e caule mostram variações no acúmulo da proteína de XET, visualizada através das diferenças nas intensidades de banda (Figura 8). Embora as observações das intensidades das bandas nos experimentos de *western blot* tenham sido apenas qualitativa, estas medidas são representativas do acúmulo da proteína de interesse. Foi observado que apenas uma banda foi revelada nas amostras protéicas representativas de folha das plantas controle. Contudo, duas bandas foram observadas nas linhagens transgênicas. Visto que tabaco também possui XET, estimamos que uma das bandas seja representativa da

hibridização do anticorpo anti-EucXET com a proteína XET de *N. tabacum* (XP_016465066.1) . Através de um blast realizado no banco de dados do NCBI foi observado que essa proteína endógena apresenta 80% de similaridade com a XET de *E. grandis* e possui um peso molecular de 33,9 kDa (Tabela 1).

Tabela 1. Dados da proteína endógena de *Nicotiana tabacum* obtidos pelo blast no NCBI a partir da sequência de EucXET de *Eucalyptus grandis*

Proteína	Espécie	E value	Identidade	Código de acesso	Sequência FASTA
xiloglucano endotransglicosilase / hidrolase 9	<i>Nicotiana tabacum</i>	4e-78	80%	XP_016465066.1	<pre> MVSFPMEFKCVFLGISLIMVGLVSSSRF EELYQPSWATDHLTNEGEILRMKLDNL SGAGFSSKNKYMFGKVTVQIKLVEGDS AGTVTAFYMSSEGPTHNEFDFFLGNT TGEPYSVQTNVYVNGVGNREQRLNLW FDPSK EFHSYSILWNQRRVFLVDDTPIRVHSN LEHKGIPFPKDQAMGVYSSIWNADDWA TQGGRVKTDW SHAPF IASYRGFEIDGCECPATVAAAENSKRCS SSAVKRYWWDEPVMSELSLHQSHQLI WVRANHVMVYDYCTDTA RFPVAPVEQCQHHQHKFHN </pre>

O gene *EucXET* foi inserido no genoma de tabaco sob o controle do promotor CAMV35S (MEDEIROS, 2009), um promotor forte e constitutivo. Sendo assim, as mudanças observadas no acúmulo de XET nas plantas de tabaco transgênicas sugerem que, assim como outros genes, há regulação endógena da expressão de XET em plantas. Nossos dados sugerem que o nível de XET disponível na célula é um dos fatores que regula a cascata de sinalização. Sendo assim, as plantas com maior acúmulo de EucXET, apresentam menor acúmulo da XET endógena. Interessantemente, no *western blot* utilizando proteínas isoladas de caule apenas uma banda foi observada (Figura 8). Em conjunto nossos resultados sugerem que ser possível existir XETs diferentes a depender do tecido vegetal. Esse mecanismo é possível visto que em tabaco existem aproximadamente 56 genes identificados a

partir do banco de dados genômico de tabaco que codificam para XET (SIERRO et al., 2014; WANG et al., 2018). Além disso, as características qualitativas, como composição, e quantitativas, como espessura, da parede celular de caules e folhas são diferentes. Visto que a XET atua na expansão celular e rigidez, espera-se que o acúmulo dessas proteínas bem como as XETs produzidas nas plantas varie em função do tecido estudado (EDWARDS et al., 2010; WANG et al., 2018).

As variações no acúmulo de proteínas na folha e no caule indicam também uma possível ocorrência de alteração em nível transcricional seja por variação em número de cópias do transgene ou por ação de mecanismos de regulação gênica. A quantidade de cópias inseridas na mesma região do genoma, assim como o grau de similaridade dos transgenes com os genes endógenos do receptor podem gerar o silenciamento dos genes homólogos. Esses mecanismos de regulação são estratégias evolutivas usadas para defender o genoma vegetal contra genes invasores. A inserção do transgene em locais aleatórios do genoma também pode resultar em diferentes níveis de expressão (PINHEIRO et al., 2000; BORÉM, 2001).

Nossas análises englobaram também uma avaliação de tolerância das plantas à estresse abiótico. Nesse trabalho testamos apenas o estresse osmótico. Foram testados três indutores que possibilitaram comparar as respostas das plantas a estresses osmóticos de diferentes maneiras. O NaCl induz o estresse hídrico e salino que ocasionam perturbações tanto pela seca fisiológica produzida, como pelo efeito tóxico, resultante da concentração de íons no citosol (TOBE et al., 2000). O manitol e o polietilenoglicol (PEG) são considerados compostos inertes e não tóxicos, induzem estresse hídrico, porém eles apresentam algumas diferenças. O manitol é um açúcar alcoólico que consegue penetrar através das membranas dessa maneira ocorre um pouco de difusão (Neto, 2006). Já o PEG possui alto peso molecular o que impede a penetração através das membranas celulares, além de reduzir a disponibilidade de oxigênio em virtude de sua alta viscosidade (BRADFORD, 1995). Foi possível observarmos que, independente do indutor de estresse utilizado, todas as linhagens transgênicas conseguiram manter o crescimento. Em contraste, todas as plantas controle não conseguiram se desenvolver e ficaram completamente cloróticas. Esses resultados sugerem que o nível de *EucXET* está relacionado com o nível de tolerância das plantas a estresses

osmóticos (Figura 9). De fato, a linhagem L3, que no *western blot* foi a que mostrou maior acúmulo de EucXET, foi a que se revelou mais resistente ao estresse. Resultados semelhantes foram encontrados na superexpressão de *CaXTH3*, gene da subfamília xiloglucano endotransglicosilase responsivo ao estresse hídrico, originalmente isolado de pimenta e analisado usando plantas transgênicas de *Arabidopsis* e tomate (CHO et al., 2006; CHOI et al., 2011). As plantas transgênicas superexpressando *CaXTH3* mostraram melhor tolerância à seca e alta salinidade em comparação com plantas controle, indicando que o *CaXTH3* desempenha um papel na resposta a estresse abiótico. Os autores sugeriram que XET atua no remodelamento da parede celular do mesófilo e estômatos, evitando a perda excessiva de água.

Foi também mensurado o acúmulo de H_2O_2 , nas plantas transgênicas e controle. Esse teste foi realizado com o objetivo de quantificar o nível de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas plantas. Observamos que as plantas da linhagem L3 apresentaram um maior nível de peróxido de hidrogênio, seguidas pelas plantas da linhagem L1 (Figura 10). Ao se analisar os dados do teste de DAB com o acúmulo da proteína XET revelado pelas análises de western blot, é possível fazer um paralelo relacionando o nível de XET com o nível de peróxido de hidrogênio. Esses resultados sugerem que as modificações impostas, devido a expressão do gene *EucXET* nas plantas de *N. tabacum*, induzem o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) como o H_2O_2 . As ROS atuam como moléculas sinalizadoras na regulação das respostas a estresse biótico e/ou abiótico. Essas cascatas moleculares regulam, entre outros genes, os envolvidos na produção de enzimas antioxidantes que protegem os tecidos vegetais dos danos oxidativos. Sendo assim, pode-se afirmar que a atividade das enzimas oxirredutores está diretamente associada com o aumento da tolerância aos estresses abióticos (DAT et al., 2000; LIU et al., 2014).

A tolerância à estresse osmótico mediada por *EucXET* pode também estar associada as respostas bioquímicas e moleculares desencadeadas devido ao aumento nos níveis de ROS nas plantas. O H_2O_2 também é considerado um componente essencial na reação formação oxidativa de lignina, dessa maneira, células em processo de lignificação apresentam maior quantidade deste substrato.

Dessa maneira, o maior acúmulo de H_2O_2 na planta L3 também pode ser associado a maior atividade de GPX de folha dessa linhagem (Figura 11 C), uma vez que o guaiacol é uma enzima atuante na rota de lignificação (SCHOPFER, 1994, MITTLER, 2002; ALAGAR et al., 2010).

O remodelamento da parede imposto por XET é possível graças a uma ação conjunta com as enzimas peroxidases, que podem apresentar atividades antagônicas como a peroxidase do ascorbato (APX) e a peroxidase do guaiacol (GPX). Comparando as análises enzimáticas realizadas na folha, percebe-se um balanço favorável para APX (Figura 11A, 11C), com uma atividade duas vezes maior do que a encontrada na GPX. A APX é uma peroxidase classe I utiliza o ascorbato como doador de elétrons específico para reduzir o H_2O_2 à água. Essa enzima está envolvida na defesa contra o ataque de patógenos e na regulação do alongamento celular através da regulação da concentração de H_2O_2 local e inibição algumas outras peroxidases da parede celular como a GPX (CORDOBA-PEDREGOSA, et al., 1996; 2003; SHIGEOKA et al, 2002; PASSARDI, et al., 2004,). Já nas análises enzimáticas de caule há um balanço favorável para a GPX com uma atividade três vezes maior do que a encontrada na APX (Figura 11B e 11D). A enzima GPX é uma peroxidase de classe III que participa do processo de lignificação oxidando os monolignóis com o uso de H_2O_2 e incorporando esse polímero de forma aleatória na parede celular, durante esse processo há uma redução na expansão celular (HIRAGA, 2011; MARJAMAA et al., 2009).

As XTHs são enzimas modificadoras de parede que se dividem em três grupos distintos (CAMPBELL e BRAAM, 1999; ROSE et al., 2002). Esse agrupamento pode estar associado com os mecanismos de ação das enzimas, uma vez que podem ter atividade endotransglicosilase (XET) e endo-hidrolase (XEH), acredita-se que os membros dos grupos 1 e 2 exibem predominantemente atividade XET, como é o caso do gene *EucXET* (SALADIÉ et al., 2006). Todos os membros do grupo 1 e 2 de NtXTH de tabaco, inclusive o NtXTH13 que possui alta similaridade com o *EucXET* (Tabela 1), estão localizados na membrana plasmática, enquanto que mais da metade dos membros do grupo 3 possuem localização extracelular. Esse fato condiz com a capacidade de modificação da parede celular da XET (WANG et al., 2018)

7. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados sugerem que *EucXET* é um bom alvo para estratégias de engenharia genética para o melhoramento de eucalipto e de outras culturas de importância econômica, uma vez que sua expressão em plantas de *Nicotiana tabacum* confere tolerância a estresse osmótico, sendo que essa está relacionada ao acúmulo da proteína exógena EucXET nas linhagens transformadas.

EucXET se relaciona com a taxa de crescimento de tabaco tanto em fase de plântula como nas plantas estabelecidas na casa de vegetação.

A expressão de *EucXET* modifica o acúmulo de H_2O_2 em plantas de tabaco, bem como aumenta a atividade de enzimas da classe das peroxidases.

8. ANEXO

Sequências das proteínas XTH de *Nicotiana tabacum* (WANG et al., 2018) e EucXET de *Eucalyptus grandis* (MEDEIROS, 2009) utilizadas o alinhamento e montagem da árvore filogenética.

>NtXTH1

MNNFSTLIFFVTAFIYLFHITLASIVSTGDFNKDFIVPWSPNHVNTSADGHTRSLIFDK
ESGSGIASNDTYLFGQFDMKIKLIPGNSAGTVVAFYLTSYQPNRDEVDFEFLGNVPG
KPYTLQTNVYVDGLDDREQRINLWFDPTQDFHTYSILWNLHQIVFMVDRVPIRTYRN
HADKGAKEYPRWQPMALQISIWNGESWATDGGKTKIDWSKAPFVASLGNYTIDACV
WKGNAFCRGESENNWWNKEKFSTLTWTQRRLFKWVRKYHLTYDYCMDNQRFQ
NNLPIECSLPKY

>NtXTH2

MKLKLVGGDSAGVVTAYYMCTEDGAGPTRDEVDFEFLGNRTGEPYLIQTNVYKNG
TGGREMRHVLWFDPTEDFHSYSLLWNSHQLVFFVDEVPIRVYKNANYTNNFFPNE
KPMYLFSSIWNADDWATRGGLEKTDWKNAPFVSTYKDFSVDGCQWEDPFPTCVS
TTTKNWWDQYNSWHLSSDQKLNYAWVQRNLVIYDYCQDTKRYPEKPEECWLSPW
D

>NtXTH3

MANLLLI AVLIAIYCSLSQAEVKGSFDDNFSKSCPESHFKTSEDGQIWYLSLDHKAGC
GFMTRQKYRFGWFSMKLKLVGGSAGVVTAYYMCTEDGAGPTRDEVDFEFLGNR
TGEPYLIQTNVYKNGTGGREMRHVLWFDPTEDFHSYSLLWNSHQLVFFVDEVPIRV
YKNTNYTNNFFPNEKPMYLFSSIWNADDWATRGGLEKTDWKNAPFVSTYKDFSVD
GCQWEDPFPPSCVSTTTENWWDQYNSWHLSSDQKLDYAWVQRNLVIYDYCQDTE
RYPEKPEECWLSPWD

>NtXTH4

MERMSSSIPKFLIIALITVLFTLTQAEVQGSFDDNFSKSCPETHFKTSEDGQIWYLSL
DKKAGCGFMTRQKYRFGWFSMKLKLVGGSAGVVTAYYMCTEDGAGPTRDELDF
EFLGNRTGEPYTIQTNVYKNGTGNREMRHILWFDPTEDFHTYSILWNTHQIVFFVDR
VPIRVYKNANYTNNFFPNEKPMYLFSSIWNADDWATRGGLEKTNWKNQPFVSSYK
DFSVDGCQWKDPFPACVSTTTKNWWDQYNSWHLSSDQKMDYAWVQRNLVTYDY
CQDTERFPKKPEECWLNPWD

>NtXTH5

MEKMASSIPKILLIIALITVLFSLTQAEVQGSFDDNFSKSCPETHFKTSEDGQIWYLSL
DKKAGCGFMTKQKYRFGWFSMKLKLVGGSAGVVTAYYMCTEDGAGPTRDELDF
EFLGNRTGEPYTIQTNVYKNGTGNREMRHILWFDPTEDFHTYSILWNTHQIVFFVDR
VPIRVYKNANYTNNFFPNEKPMYLFSSIWNADDWATRGGLEKTNWKNQPFVSSYK
DFSVDGCQWKDPFPACVSTTTKNWWDQYNSWHLSSDQKMDYAWVQRNLVTYDY
CQDTERFPKKPEECWLNPWE

>NtXTH6

MERNASSMADLFFTAALMAALFSSSHAELIKGAFENNFSSKSCPGTHFKTSQDGQIW
YLTLDQISDCGFITKQSYRFGWFSTKLKLVGGDSAGVVTAFYMCSEVEAGPLRDEID
FEFLGNRTGQPYLIQTNVYNNGSGGREMRHLLWFDPTQDFHTYSILWNSHQIVFFV
DKVPIRVYKNANHTNFFPAERPMPYVFSSIWNADNWATRGGLDKINWTSAPFIASY
KDFILDACQWKDPFPACVSTTTQHWWDQYNAWHLSSKQKIDYAWVQRNFVVYDY
CQDSVRNRYKPKQECWLSALD

>NtXTH7

MERNMGDLLLLFAALVATLFSSSHAQLIKGAFENTFSKSCPGTHFKTSQDGQIWYLT
DQVSDCGFITKQSYRFGWFSTKLKLVGGDSAGVVTAFYMCSEVEAGPLRDEIDFEF
LGNRTGQPYLIQTNVYNNGSGGREMRHLLWFDPTQDFHTYSILWNSHQIVFFVDKV
PIRVYKNANHTNFFPAERPMPYVFSSIWNADNWATRGGLDKINWTSAPFVASYKEF
TLDACQWKDPFPACVSTTTQHWWDQYNAWHLSSKQKIDYTWVQRNFVVYDYCQ
DSVRNRYKPKQECWLSPLD

>NtXTH8

MKQVIEYRCLLILGCGFASKSKYLFGRVSMKIKLVPGDSAGTVTAFYMNSTDNVRD
ELDFEFLGNRSGQPYTVQTNVYVHGKGDKQEQRLNWFDPADSFHTYTILWNHHHTV
FYVDAVPIRVYKNNEAKGIPFPKFQPMGVYSTLWEADDWATRGGLEKINWSKSPFY
AAYKDFDIEGCAMPGPANCASNPRNWWEGANYQQLSAVEARQYRWVRTNHMIYD
YCTDKSRNPVPPPECVAGI

>NtXTH9

MISSSLKYSTVIPILLYALTFSFVSARPATFLQDFKVAWADSHIKQIDGGKAIQLILDQ
NSGCGFASKSKYLFGRVSMKIKLVPGDSAGTVTAFYMNSTDNVRDELDFEFLGNR
SGQPYTVQTNVYVHGKGDKQEQRLNWFDPADSFHTYTILWNHHHTVFYVDAVPIRV
YKNNEAKGIPFPKFQPMGVYSTLWEADDWATRGGLEKINWSRSPFYAAYKDFDIEG
CAMPGPANCASNPRNWWEGANYQQLSAVEAKQYRWVRMNHMIYDYCTDKSRNP
VTPPECVAGI

>NtXTH10

MGKLTSLKYSAAILILLYALTFSFVSARPATFLQDFKVSWAYSHIKQIDGGGAIQLILD
QNSGCGFASKSKYLFGRVSMKIKLVPGDSAGTVTAFYMNSTDNVRDELDFEFLG
NRSGQPYTVQTNVYVHGKGDKQEQRVNLWFDPADSFHTYTILWNHHHHAVFYVDAVP
IRVYKNNEAKGIPFPKFQPMGVYSTLWEADDWATRGGLEKINWSKSPFYAAYKDFD
IEGCAMPGPANCASNPRNWWEGANYQQLSAVEARQYRWVRMNHMIYDYCTDKS
RNPVTPPECVAGI

>NtXTH11

MARLTSLKYSAAILILLYALTFSFVSARPATFLQDFKVSWSDSHIKQIDGGGAIQLILD
QNSGCGFASKSKYLFGRVSMKIKLVPGDSAGTVTAFYMNSTDNVRDELDFEFLG
NRSGQPYTVQTNVYVHGKGDKQEQRVNLWFDPADSFHTYTILWNHHHHAVFYVDAVP
IRVYKNNEAKGIPFPKFQPMGVYSTLWEADDWATRGGLEKINWSKSPFYAAYKDFD
IEGCAMPGPANCASNPRNWWEGANYQQLSAAEARQYRWVRMNHMIYDYCTDKS
RNPVTPPECVAGI

>NtXTH12

MVSFPMFEFKWVFLGISLMLVGLVSSSRFEELYQPSWATDHLTNEGEILRMKLDNLS
GAGFSSKNKYMFGKVTQIKLVEGDSAGTVTAFYMSSEGPTHNEFD FEFLGNTTGE

PYSVQTNVYVNGVGNREQRLNLWFDPSNEFHSSYSILWNQHRVVFLVDETPVRVHS
NLEHKGIPFPKDQAMGVYSSIWNADDWATQGGRVKTDW SHAPFIASYRGFEIDGC
ECPATVAAAENSKRCSSSAEKRYWWDEPTMSELSLHQSHQLIWVRANHMVYDYC
TDTARFPVAPVEQCQHHQHKTNRN

>NtXTH13

MVSFPMFEFKCVFLGISLIMVGLVSSSRFEELYQPSWATDHLTNEGEILRMKLDNLSG
AGFSSKNKYMFGKVTQIKLVEGDSAGTVTAFYMSSEGPETHNEFD FEFLGNTTGEP
YSVQTNVYVNGVGNREQRLNLWFDPSKEFHSSYSILWNQRRVVFLVDDTPIRVHSNL
EHKGIPFPKDQAMGVYSSIWNADDWATQGGRVKTDW SHAPFIASYRGFEIDGCEC
PATVAAAENSKRCSSSAVKRYWWDEPVMSELSLHQSHQLIWVRANHMVYDYCTD
TARFPVAPVEQCQHHQHKFHN

>NtXTH14

MPSSMIVFLILAMLLNTGVGVNFAEVFESSWAPDHITVVGDQVMLTLDNASGCGFQ
SKNKYLF GKASVQIKLVGGDSAGTVIAFYMSSEGANHDELDFEFLGNVSGEPYLVQ
TNVYANGTG DREQRHSLWFDPTTDFHTYSFFWNHHTIIFSVDDIPIRVFQNKENKGV
AYPKNQGMGIY GSLWNADDWATQGGRVKTNW SHSPFVATFRAFEIDACDLSGED
TVAAGAKCGKLAECWWDKPAVKQLNKS KKRQFKMVQSKHLVYDYCKDTARFTQM
PKECLD

>NtXTH15

MRRKSCMLTTVPWLPLKHSLARWVG VNFTEVFESSWSPDHITVVGDQVMLTLDNA
SGCGFQSKNKYMFGKASAQIKLV DGDSAGTVIAFYMSSEGANHDELDFEFLGNVS
GEPYLVQTNVYANGTG DREQRHSLWFDPTAD FHTYSFFWNHHTIIFSVDDIPIRVFK
NTEKKG VAYPKNQGMGVY GSLWNADDWATQGGRVKTNW SHSPFVATFRAFEIDA
CDLSGEDTVAAGAKCGKLAQCWWDK PAMRELNKS KKRQFKMVQSKHLVYDYCKD
TARFTQMPKECLD

>NtXTH16

MGMNMLLV CVLVVGAMAAAPKKPMDVPFGRNYENTWAPDHVKYFN GGSEIQLFL
DNRTGTGFQSKGSYLF GHFAMHIKMVAGDSAGTVTAFYLSSQNNEHDEIDFEFLGN
KTGEPYVVQTN IYTGGKGDKEQRIYLWFDPTKDYHTYSVLWNLHQIVFFVDEYPIRT
FKNSKDLGVKFPFDQPMKIYSSLWEADDWATRGGLEKIDWSNAPFVASYKGFHIDG
CEASVNAKLCANQGKKWWDQKEFQDL DKQQWRLLRRVRDKYTIYNYCTDKKRFA
TLPKECRRNRDVPRKSSSKSP

>NtXTH17

MGFKWMNMLLFCALFVVGAMAAAPKKPMDVPFGRNYENSWAPDHVKYFN GGSEI
QLFLDNRTGTGFQSKGSYLF GHFAMHIKMVAGDSAGTVTAFYLSSQNNEHDEIDFE
FLGNKTGEPYVVQTNVYTGGKGDKEQRIYLWFDPTKDYHTYSVLWNLHQIVFFVDE
YPIRTFKNSKDLGVKFPFDQPMKIYSSLWEADDWATRGGLEKIDWSNAPFVASYKG
FHIDGCEASVNAKYCSNQGKKWWDQKEFQDL DKQQWRLLRRVRDKYTIYNYCTD
KKRFATMPKECRRNRDVPRKSSSKSP

>NtXTH18

MGLKGLLFSIVLINLSLLGLCGYPRKPVDVPFWKNYEPSWASHHIKYLNGGSTADLV
LDRSSGAGFQSKKSYLF GHFSMKLRLVGGDSAGVVTA FYLSSNNAEHDEIDFEFLG
NRTGQPYILQTNVFTGGKGDREQRIYLWFDPTKGYHSYVLWNTFQIVIFVDDVPIR
AFKNSKDLGVKFPFNQPMKIYSSLWDADDWATRGGLEKTDWSNAPFTASYTSFHV

DGCEAATPQEVQVCNTKGMRWWDQKAFQDLDALQYRRLRWVRQKYTIYNYCTDR
KRYPTLPPECTKDRDI

>NtXTH19

MGVKGLLFSIVLINLSLLGLCGYPRKPVDPFWKKNYEPSWASHHIKYLSSGGSTVDLV
LDRSSGAGFQSKKSYLFGHFMSMKLKLVGSDSAGVVTAFYLSSNNAEHDEIDFEFLG
NRTGQPYILQTNVFTGGKGDREQRIYLFWDPTKGYHSYSVLWNTFQIVIFVDDVPIR
AFKNSKDLGVKFPFNQPMKIYSSLWDADDWATRGGLEKTDWSNAPFTASYTSFHV
DGCEAATPQEVQVCNTKGMRWWDQKAFQDLDALQYRRLRWVRQKYTIYNYCTDR
KRYPTLPPECTKDRDI

>NtXTH20

MQLKLVPGNSAGTVTTFFLSSQGAGHDEIDFEFLGNVSGQPYTVHTNVYSQGKGN
KEQQFHLWFDPTAAFTYSIIWNAQKIIFLVDNSPIRVYNNHESAGIPFPKSQPMKVY
CSLWNADEWATQGGRVKTDWTHAPFTAYYRNFNIDGCAVTSGASSCKSTDSANN
ARPWQNQELDAKGRNRLRWVQSRHVMVNYCADSKRFPQGFSHECKRSRFL

>NtXTH21

MSPRFSFKMLILPIVMASLWAAASAGNFYNLADITWGEGRGKITEGGRGLSLSLDKL
SGSGFQSKNEYLFGRFDMQLKLVPGNSAGTVTTFFLSSQGAGHDEIDFEFLGNVSG
QPYTVHTNVYSQGKGNKEQQFHLWFDPTAAFTYSIIWNAQKIIFLVDNSPIRVYNN
HESNGIPFPKIQPMKVYCSLWNADEWATQGGRVKTDWTHVPFTAYYRNFNIDGCA
VTSGTSSCKSTDSANNARPWQNQELDAKGRNRLRWVQSRHVMVNYCADSKRFP
QGFSHECKRSRFL

>NtXTH22

MASHLFLISILMGSLVAASANFNNLAEITWGEGRGKITEGGKGLSLSLDKLSGSGFQ
SKNEYLFGRFDMQLKLVPGNSAGTVTTFFLSSQGEGHDEIDFEFLGNTTGEPYTVH
TNVYSQGKGNKEQQFHLWFDPTAAFTYTIVWNSNRIVFLVDNIPIRVYNNHENNGI
PFPKSQPMKVYCSLWNADEWATQGGRVKTDWTHAPFTAYYRNFKIDGCAVTSGA
SSCKSTDSAGNAKAWQNQELDAKGRNRVRWVQSRHVMVNYCADKKRFPQGYSH
ECKSSRF

>NtXTH23

MASHFLLISILMGSLVVASANFNNLAEITWGEGRGKITEGGKGLSLSLDKLSGSGFQ
SKNEYLFGRFDMQLKLVPGNSAGTVTTFFLSSQGKGHDEIDFEFLGNTTGEPYTVH
TNVYSQGKGNKEQQFHLWFDPTAAFTYTIVWNANRILFLVDNIPIRVYNNHESNGI
PFPKSQPMKVYCSLWNADEWATQGGRVKTDWTHAPFTAYYRNFKIDGCAVTSGA
SSCKSTDSAGNAKAWQNHeldaKGRNRVRWVQSRHVMVNYCADKKRFPQGYSH
ECKSSRF

>NtXTH24

MASKFSSVMLLLCIIMSIQLLAASAGNFYRDAVITWGEGRGKIQEGGRGLALTLDKLS
GSGFQSKNEYLFGRFDMQLKLVPGNSAGTVTTFFLSSQGEGHDEIDFEFLGNVSG
QPYTVHTNVYTQGKGNKEQQFHLWFDPTAAFTYTIVWNPHRIVFLVDNSPIRVYN
NHESIGIPFPKSQAMRVYCSLWNADEWATQGGRVKTDWTLAPFTAYYRNINIDGCA
VLSGTSSCKSSNSANNAKPWQTHELDGKGRNRLRWVQSRHVMVNYCADSKRFPQ
GFSAECKSSRF

>NtXTH25

MASKFSSAMLLLCILMSIQLLAASAGNFYRDTVITWGEGRGKIQEGGRGLALTLDKL
SGSGFQSKNEYLFGRFDMQLKLVPGNSAGTVTTFFLSSQGEGHDEIDFEFLGNVSG
QPYTVHTNVYTQGKGNKEQQFHLWFDPTAAFHTYTIVWNPHRIVFLVDNSPIRVYN
NHENIGIPFPKSQAMRVYCSLWNADEWATQGGRVKTDWTLAPFTAYYRNINIDGCA
VLSGTSSCKSSNSANNAKPWQTHELDGKGRNRLRWVQSRHVMVNYCADSKRFPQ
GFSEECKRSRF

>NtXTH26

MSLSSASSRIPKMFLQLSVLAVFLLCTACADNFYQDATVTWGDQRAHIQEGGRLLTL
SLDKISGSGFQSKSEFLFGRFDMQLKLIPGNSAGTVTTFFYLSSQGAGHDEIDFEFLG
NSSGQPYTVHTNVYSQGKGNKEQQFHLWFDPTTSFHTYSIIWNAQRRIIFLVDNIPIRV
YNNHEALGVAFPKNQAMRVYASLWNADDWATQGGRVKTDWSMAPFTASYRNFN
TNACVWSAASSTSSCGGSKSTDSANNDQTWQTQELDANGRNRLRWVQQKYMTY
NYCTDAQRFNQVIPPECKRSRF

>NtXTH27

MGSRIFLVLALVFSSCMVSYGGNFFQEFDFTWGGNRAKIFNGGQLMSLSLDKVSGS
GFQSKKEYLFGRIDMQIKLVAGNSAGTVTTYLSSQGPETHDEIDFEFLGNVTGEPYIL
HTNIYAQGKGNKEQQFYLWFDPTKNFHTYSIIWKPQHIIIFLVDNTPIRVYKNAESIGV
PPFKNQPMRIYSSLWNADDWATRGGGLVKTDWSKAPFTAYYRNFNSQTFSSSQFSN
EKWQNQELDANGRRRLRWVQRNFMIIYNYCTDFKRFPQGFPECKRF

>NtXTH28

MARFSSSSSRSSRLPYIVLLFVAALFVFKIDVIISQTFSSARRNLENTPNRILVKSKS
QETDDSIPIVVLVNGTFHRHFILSWGDDRGIHENGELLTSLDKQSGSGFQSKKEYL
FAKIDMQIKLVPGNSAGTVTTFFYLSSQGNKHDEIDFEFLGNSTGNPYTLHTNIFSLGQ
GNREQQFFLWFDPTADYHTYSILWNPCKIIFYVDGTPIREFKNAEKIGVPFLKYQPM
RLYSSLWNADDWATQGGRVKTNWKLAPFIASYKNFTYEACIYSRLTSSSSCNINSP
PFGNNAWLTHELDRRSRAKMKILQKKHMIYDYCKDKWRFPKGPAPPECKLQ

>NtXTH29

MARFSSSSSRSSRLPYIILLFVAALFVFKIDVIISQSFSSARRNLENTPNHILVKSKSQ
ETDDSIPIVVLVNGTFHRHFILSWGDDRGIHENGELLTSLDKLSGSGFQSKKEYLF
AKIDMQIKLVPGNSAGTVTTFFYLSSQGNKHDEIDFEFLGNSTGNPYTLHTNIFSLGQ
GNREQQFFLWFDPTADYHTYSILWNPCKIIFYVDGTPIREYKNAEKIGVPFPKYQPM
RLYSSLWNADDWATQGGRIKTNWKLAPFIASYKNFTYDACIYSRLTSSSSCNINSP
FGNDSWLTHELDRRSRAKMKILQKKHMIYDYCNDKWRFPKGPAPPECKLQ

>NtXTH30

MMKTSSCMFSFLFLSFLVLVALAENFNQEFDVTWGDGRVKILENGQLLTLSLDKTS
GSGFRSKRQYMFGKIDMKIKLVPGNSAGTVTTYLSSLGPTHDEIDFEFLGNLSGDP
YILHTNVFVQGGGEREQQFYLWFDPTKDFHTYSILWNPRSIIFSVDGTPIRQFKNLEA
SRGIPYPKNQPMWIYSSLWDAEDWATRGGGLVKTDWSKAPFIASYRNFNAQACVWS
SGSTSSCSINSTANSWITESLDNSGQARIKWVQKNYMVNYCTDTKRFPQGFPLEC
SLN

>NtXTH31

MMKTSISCIISFLFLSFLLVMAALAGDFNQEFDVTWGDGRVKILENGQLLTLSLDKT
SGSGFRSKRQYMFGKIDMKIKLVPGNSAGTVTTYLSSLGPTHDEIDFEFLGNLSGD
PYILHTNVFTQGGKDREQQFYLWFDPTKDFHTYSILWNPRSIIFSVDGTPIRQFKNLE

TSMGIPYPKNQPMWIYSSLWDAEDWATRGGGLVKTDWSQAPFVASYRNFNAQACV
WSSGSTSSCSRNSTANSWITESLDNSGQARIKWVQKNYMVYNYCTDIKRFPQGFP
LECSLN

>NtXTH32

MMKSFLFQMMFLVVAFAGNFNQNFDITWGDGRAKILENGQLLTLSLDKTSGSGFRS
KNQYLFGKIDLKIKLVPGNSAGTVTTYLSSIGSSHDEIDFEFLGNLSGDPYILHTNVF
TQGKGNREQQFYLWFDPTKYFHTYSILWNPQSIIFSVDGTPIRQFKNLEASGIPYPK
NQPMWIYSSLWNADDWATRGGGLVKTDWSKAPFIASRYNYNAQACVWSSTSSSSC
SPNNSTENSWLSESLDNTGQSKIKWVQNNYMIYNYCTDTKRFPQGFPECSLN

>NtXTH33

MMKSFLFLMIFLVVALAGNFNKDFDITWGDGRAKILENGQLLTLSLDKTSGSGFRSK
NQYLFGKIDLKIKLVPGNSAGTVTTYLSSIGSSHDEIDFEFLGNLSGDPYILHTNVFT
QGKGNREQQFYLWFDPTKDFHTYITILWNPQSIIFSVDGTPIRQFKNLEASGIPYPKN
QPMWIYSSLWNADDWATRGGGLVKTDWSKAPFIASRYNYNAQACVWSSSSSSSCT
SNSSTGNSWLSESLDSTGQSRIKWVQSNYMIYNYCTDTKRFPQGFPECSLN

>NtXTH34

MSSFSSKLVLALIVSAFAIAIAGTIDENFEITWGEGRAKMLNNGELLTLSLDKISGSGF
QSKNEYLFQKIDMQLKLVPGNSAGTVTAYYLSSQGPTHDEIDFEFLGNLSGDPYTLH
TNVFSQGKGNREQQFHLWFDPTADFHHTYSILWNPQRIIFYVDGTPIREYKNAESIGV
SYPKKQPMRIYSSLWNADDWATRGGGLIKTDWSKAPFSASYRNFKSATSTSAATSNS
WLNEELDNTSQRERLKWVQKNYMVYNYCNDKSRFPQGFPCAM

>NtXTH35

MASLLAQYLVFLALCSLQYHSLAYNNFNQDFDVTWGDGRAKVLNNGKLLTLSLDKA
SGSGIQSKREYLFGRIDMQLKLVGRNSAGTVTTYLSSQGATHDEIDFEFLGNLSGD
PYIHTNVYTQGKGDKQQFYLWFDPTAGFHTYSILWNPQTIIIFYVDGTPIRVFKNMK
SRGIPYPNKQPMRVYASLWNADDWATRGGGLIKTDWSNAPFIASFRNFKANACVWE
FGKSSCNSSTNPWFFQELDSTSQAQLQWVQKNYMVYNYCTDIKRFPQGFPLECNF
NSTTS

>NtXTH36

MASLLVQCLNFLALCSLQYHILASSNFNQDFDVTWGDGRAKVLNNGKLLTLSLDKA
SGSGIQSKREYLFGRIDMQLKLVRENSAGTVTTYLSSQGATHDEIDFEFLGNLSGD
PYIHTNVYTQGKGDKQQFYLWFDPTAGFHTYSILWNPQTIIIFYVDGTPIRVFKNMK
SSGVPYPTNQPMRVYASLWNADDWATRGGGLIKTDWSKAPFIASFRNFKANACVWE
FGKSSCNSSTNSTKPWFFQELDSTSQARLQWVQKNYMVYNYCTDIKRFPQGLPQE
CNFNSTTS

>NtXTH37

MAKFIAFNSLVLIATFAFHCAIVNAKISSSMYINWGAHHCQMLGDDLQLVLDKSAGS
GAQSKRTFLFGSFEMLIKLVPNNSAGTVTTYLSSSTGTHDEIGFEFLGNVSGQPYII
HTNIYTQGVGNKEQQFYFPWFDPTADFHNYTIHWNPNNAVWYIDGIPIRVFRNYQLK
GIPFPNQQGMRIYSSLWNADEWATRGGGRDKIDWTNAPFIATYRKFRPRACYWNGP
LSIVQCAIPTKSNWWNFPLYSKLSAPKVDQMNSIRSKYMIYDYCKDTTRFKGVMPTE
CTLPQN

>NtXTH38

MAKFIAFNSLVLIATIAFHCAIVNGKISSSMYVNWGAHHCQMLGDDLQLVLDKSAGS
GAQSKRTFLFGSFEMLIKLPNNSAGTVTTYLSSTGTHDEIDFEFLGNVSGQPYIL
HTNIYTQGVGNREQQFYFWDPTADFHNYTIHWNPNAVWYVDGIPIRVFRNYQFK
GIPYPNQGMRIYSSLWNADEWATRGGDKIDWTNAPFIATYRKFRPRACYWNGP
LSIVQCAIPTKSNWWNSPLYSKLSAPKVDQMNSIRSKYMIYDYCKDTRFKGVMP
IECSLPQY

>NtXTH39

MAKFVAFNSLVLIATIAFHCAIVNGKISSSMYVNWGAHHCQMLGEDLQLVLDKSAG
SGAQSKRTFLFGSFEMLIKLPNNSAGTVTTYLSSTGTHDEIDFEFLGNVSGQPYI
LHTNIYTQGVGNREQQFYFWDPTADFHNYTIHWNPNAVWYVDSIPIRVFRNYQL
KGIPFPNQGMRIYSSLWNADEWATRGGDKIDWTNAPFIAKYRKFRPRACYWNG
PLSIVQCAIPTKSNWWNSPLYSKLSAPKVDQMNSIRSKYMIYDYCKDTRFKGVPT
TECSLPQN

>NtXTH40

MAKFITFSLVLIATFAFRCTLVNGKISSSMYINWGAHHCQMGGDDLQLVLDKSAGSG
AQSKRTFLFGSFEMLIKLPNNSAGTVTTYLSSTGTHDEIDFEFLGNVSGQPYI
HTNIYTQGVGNKEQQFYFWDPTADFHNYTIHWNLNAVWYVDGIPIRVFRNYELKGI
PFPNQGMRIYSSLWNADEWATRGGDKIDWTNAPFIATYRNFRPRACYWNGPLS
IGQCAIPTKSNWWNSPLYNKLAPKVDQMNSIRSKYMIYDYCKDTRFKGVPTTEC
SLPQN

>NtXTH41

MFKIMASSRLLSLANLFI LAIAFHLVSVNGMFSDNMYIGWGAHHSWMQGNLQLVL
DQSSSGSVQSKGAFLFGSIQM QIKLVPGNSAGTVTAYYLSSTGDKHDEIDFEFLGN
VSGHPYIIHTNIFTQGAGGREQQFYFWDPTADYHNYTIHWNPNAVWYVDDIPIRV
YKNYQSQGILYPNAQGMGVYSSLWNADNWATRGGDKIDWTNAPFIAKYRNFA
PRACPWYGP GSISHCAAPTPNNWYTSPEYSQLSYAKQGQMNWVRNNYMIYDYCKDT
TRFNGQIPGECFKPQF

>NtXTH42

MFKIMASSRLLSLSNLFILAIAFHLVSVNGMFSDNMYINWGAHHSWMQGNLQLVL
DQSAGSGVQSKGAFLFGSIEMQIKLVPGNSAGTVTAYYLSSTGDKHDEIDFEFLGNV
SGQPYIIHTNIFTQGAGGREQQFYFWDPTADYHNYTIHWNPNAVWYVDGIPIRVY
KNYQSQGILYPNAQGMKVYSSLWNADNWATRGGDKIDWTNAPFIAKYRNFA
PRACPWYGP GSIRQCAAPTPNNWYTSYEYSQLSYAKQGQMNWVRNNYMIYDYCKDT
RFNGQIPGECFKPQI

>NtXTH43

MAIFFLHFLLLLIVVPSTNAGYWPPSPGYYPSSKFRSMSFYQGFRNLWGPNHQNV
DNGINIWLDRNSGSGFKSIKPF RSGYFGASIKLQPGYTAGVITAFYLSNNEAHPGYH
DEV DIEFLGTTFGKPYTLQTNVYIRGSGDGKIVGREMKFHLWFDPTKEFH HYAILWS
PREIIFLVDDVPIRRYARKSIATFPLRPMWLYGSIWDASSWATEDGKYKADYRYQPF
YGKFTNFKASGCTAYSSRWCHPV SASPSRSGGLTRQQRQAMNWVHSHYLAIDYC
RDSKRDHSLTPECWR

>NtXTH44

MSIFFLPFLLFLIVLPSTNAGYWPPSPGYYPSSKFKSMSFYQGFKNLWGPNHQNV
DNGINIWLDRNSGSGFKSIKPF RSGYFGASIKLQPGYTAGVITAFYLSNNEAHPGYH

DEV DIE FLGTTFGKPYTLQTNVYIRGSGDGKIIGREMKFHLWFDPTKDFHHYAILWS
PREIIFLVDDVPIRRYARKSIATFPLRPMWLYGSIWDASSWATEDGKYKADYRYQPF
YGKFTNFKASGCTAYSSRWCHPV SASPSRSGGLTRQQRQAMNWVHSHYLAYDYC
RDSKRDHSLTPECWR

>NtXTH45

MANLFLLSLLLIFLNFSSNAQGPLSPGYYPSSKVVQSLGFNQGFRLNWGPQHQS LDQ
SALT IWLDKTS GSGFKSLENYRSGYFGTSVKLQPGYTAGIITSFYLSNNQDYPGNH
DEIDIEFLGTTPNKPYTLQTNVYIRGSGDGNIIIGREMKFHLWFDPTKAYHNYAILWDP
NEIIFVDDVPIRRYPRKNDATFPQRPMYVYGSIWDASSWATEEGRIKADYRYQPFV
GKYNNFKIAGCTANENPWCGRSPSSSSPSRAGGLSRQQAAMLWVQRNYKVYDYC
RDPRRDHTHTPEC

>NtXTH46

MALFLLSLLLLIFLNFSSNAQGPPSPGYYPSSKVVQSLGFSQCFRNLWGPQHQS LDQS
ALTIWLDKTTGGSGFKSLKNYRSGYFGTSVKLQPGYTAGIITSFYLSNNQDYPGNHD
EIDIEFLGTTPNKPYTLQTNVYIRGSGDGNIIIGREMKFHLWFDPTQAYHNYAILWNP
EIIFFVDDVPIRRYPRKNDATFPQRPMYVYGSIWDASSWATEEGRIKADYRYQPFV
KYNNFKIAGCTANENPWCGRSPSSSSSRAGGLSRQQAAMLWVQRNYKVYDYCR
DPRRDHTHTPEC

>NtXTH47

MDFFHHNKTFLLSQFLIFCMIVVSCRGPVYKPPEVEKLTDFHSRLSVNQGYNVFFG
GANVRMTNNGSSADLILDKSSGSLISKEKYYYGFFNAALKLPAHFTSGVVIAFYMS
NSDVFPNHDEIDFELLGHDKRRDWVLQTNLYGNNGSVHTGREEKFYLWFDPTLDF
HDYITLWNNHHIVFLVDNVPPIREVHNTAISSVYPSKPM SVIATIWDGSEWATHGGK
YPVNYQYAPFVTSMKEVELEGCVRQQNTSATSTCFRRSTSSLD PVDGEEFMKLSQ
QQMTGLDWVRRKHM FYSYCQDTNRYKVL PPECTSN

>NtXTH48

MEFYHQHKTCLFSGFLIFCMIAVASSLGPIYTPPEAERLTDRFSRLSVNQGYNVFFG
GANVRLTNNGSNADLILDKSSGSLVSRDKYYYGFFNAALKLPANFTSGVVVAFYLS
NQNIFFPHNHDELD FELLGYDKRRDWVLQTNLYGNNGSVSTGREEKFYLWFDPTQDF
HDYSILWNNHHILFLVDNVPVREVVNNTTISSVYPSKPM SIYATIWDGSQWATRGGK
YPVNYTYAPFVT SIKGVELEGCVSEQNASAASACARRSTSSLD PVDGEEFVKLSQQ
QMTGLDWARRKHM FYSYCQDTRRYKVL PPECTAT

>NtXTH49

MEFFHQHNTLLLSEFLIFCMISVASSLGPIYTPPEVERLTDRFSRLSVNQGYNMFFG
GVNVRLTNNGSSADLILDKSSGSLVSRDKYYYGFFNAALKLPANFTSGVVVAFYLS
NQNIFFPHDHDELD FELLGYDKRRDWVLQTNLYGNNGSVSTGREGKFYLWFDPTQDF
HDYITLWNNHHILFLVDNVPVREVHNTAISSVYPSKPM SIYVTIWDGSQWATRGGK
YPVNYTYAPFVT SIKGVELEGCVSEQNGSAATACARRSTSSLD PVDGEEFVKLSQQ
QMMGLDWARRKHM FYSYCQDTRRYKVL PPECTAT

>NtXTH50

MDYRVLSSLSKSLTPFSLLMLLYIFPAAETATATTAKAFNLSTITFEEGYSP LFSDFN
ERSPDDTSFRLLLNRFSGSGVISTEYNYGFFSASIKLPAIYTAGIVVAFYTSNVDTFE
KNHDELDIEFLGNVNGQPWRFQTNLYGNNGSVSRGREERYRMWFDPSNDFHHYSIL
WTPKNIIFYVDETPIREVNRNPAMGGDFPSKPM SLYATIWDASSWATNGGKAKVDY

KHEPFATEFKDLVLEG CIVDPIEQISSSTNCTDRIARLLSQNYSIMTPERRKSMKWFRE
RYMYSSYCYDNIRYPVPPPECVIVQSERDLFKDSGRLRQKMKFGGSHSRKHRPG
RSSRRRNRAAGGGSSKSGQAAAM

>NtXTH51

MDFIRKKICLSVFLFFHWWFSTALNVSTIPFSDGFSHLFGEGNILHATDDKSLQLHLN
QRTGSGFKSSDLYNHGFFSAKIKLPDYSYTAGIVVAFYTTNGDLFTKTHDELDFEFLG
NIRGKAWRFQTNMYGNGSTSRGREERYYLWFDPSKEFHRYLSILWTNKNIIFYIDDV
PIREIVRNDAMGGDYPSPKPMGLYATIWDASDWATSGGKYKTNYKYAPFIAEFTDLVL
NGCAMDPLEQVVNNPSCDEKDELQKADFSRITPRQRMAMKRFRSKYMYSSYCY
DSLRYSVPPPECEIDPIEQQHFKETGRLKFNKHHHRHPKRTKSQVLDARNYGNQDE
E

>NtXTH52

MDFIRKKICLSVFLFFHVCFITADAALNVSTIPFSDGFSHLFGEGNILHATDDKSLQLH
LNQRTGSGFKSSDLYTHGFFSAKIKLPDYSYTAGIVVAFYTTNGDLFTKTHDELDFEFL
GNIRGKAWRFQTNMYGNGSTSRGREERYYLWFDPSKEFHRYLSILWTIKNIIFYIDDV
PIREIVRNDAMGGDYPSPKPMGLYATIWDASDWATSGGKYKTNYKYAPFIAEFTDLVL
NGCAMDPLEQVVNNPSCDEKDELQKADFSRITPRQRMAMKRFRSKYMYSSYCY
DSLRYSVPPPECEIDHVEQQHFKETGRLKFNKHGHHRHAKRTRSQVLDARNHGNQ
DEE

>NtXTH53

MVNYHLVTFIFFSVVELVYGSSRNLPILAFDEGYSHLFGDDNVMILKDGKSAHISLDE
RTGAGFVSQDLYLHGFFSASIKLPADYTAGVVVAFYMSNVDMFEKNHDEIDFEFLG
NIRGKDWRIQTNIYGNGSTSVGREERYGLWFDPSSEDFHHYSILWTENFIIFYVDNVPI
REIKRTEAMGGDFPSKPMGLYATIWDGSGWATNGGKYKVNYKYAPYIAKFSDFVLH
GCAVDPIELSSKCDTAPKTASIPTGITPDQRRKMEKFRKKQMQYSYCYDKTRYKVP
PPECVIDPKEAERLRAFDPVTFGGSRHHHGKQHRRSRSRAEGDISFL

>NtXTH54

MVNYHLVIFIFFSVVELVYGSSRNLPILAFDEGYSHLFGDNNLMILKDGKSAHISLDER
TGAGFVSQDLYLHGFFSASIKLPADYTAGVVVAFYMSNVDMFEKNHDEIDFEFLGNI
RGKDWRIQTNIYGNGSTSF GREERYGLWFDPSSEDFHHYSILWTENFIIFYVDNVPIR
EIKRTEAMGGDFPSKPMGLYATIWDGSGWATNGGKYKVNYKYAPYIAKFSDFVLHG
CAVDPIELSSKCDTAPKTSSIPTGITPDQRRKMENFRKKQMQYSYCYDKTRYKVPPT
ECVIDPKEAERLRVFDPVTFGGSRHHHGKRRHSRSRAEGDVSFL

>NtXTH55

MVNFRLEIFILCSFLVLVCGSSKQLQTLPFDEGYSQLFGHDNLMVLEDGKSVHLSLD
ERTGAGFVSQDLYLHGYFSASIKLPADYTAGVVVAFYMSNGDMFEKNHDEIDFEFL
GNIRAKKWRIQTNIYGNGSTNVGREERYGLWFDPSSEDFHQYSILWTESQIIFYVDNI
PIREIKRTKAMGGDFPSKPMGLYATIWDGSSWATNGGKYKVNYKYAPYVAKFSDFIL
HGCAVDPIELSPKCDTTPNSASIPTSISPDQRRKMESFRKKYLQYSYCYDRTRYNVP
LSECVDPKEADRLRGFDPVTFGGVQRHHHQRQSRREDTSSE

>NtXTH56

MVNFRLGIFILCSFLVLVSGSSKKLQTLPFDEGYSQLFGHDNLMVLEDGKSVHISLDE
RTGAGFVSQDLYLHGYFSASIKLPADYTAGVVVAFYMSNGDMFEKSHDEIDFEFLG
NIRAKNWRIQTNIYGNGSTNVGREERYGLWFDPSSEDFHQYTLWTESQIIFYVDNIPI

REIKRTKAMGGDFPSKPMSLYATIWDGSSWATNGGKYKVNYKYAPYVAKFSDFVL
HGAVDPIELSPKCDTAPKSAFVPTGISPDQRRKMESFRKKYLQYSYCYDRTRYNV
PLSECVIDPKEADRLQGFDPVTFGGVQRHHSKRRRQRQSRREDASSE

>EucXET

MAVPVFSKVSVSFGLFVGLALLVGLVAGARFEELYQPGWAMDHFVYEGEVLKCLKLD
NYSGAGFGSKSKYMFVKVTIQIKLVEGDSAGTVTAFYMSSDGNHNEFDFFEFLGNT
TGEPYLVQTNVYVNGVGNREQRLGLWFDPTTDFHSYSVLWNQRQVFLVDETPIR
VHTNLEHRGIPYPKDQPMGVYSSIWNADDWATQGGRIKTDWTHAPFITSYRNFEID
ACECPATMAAADNAKRCSSAGRERRYWWDEPTVSELHQNHLKWWQAHHMV
YDYCKDTARFPVMPAECEHHRH

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAGAR, M., et al. Feeding-induced changes in defence enzymes and PR proteins and their implications in host resistance to *Nilaparvata lugens*. *Journal of applied entomology*, 134(2), 123-131, 2010

ATKINSON, Ross G. et al. Analysis of xiloglucano endotransglucosylase/hydrolase (XTH) gene families in kiwifruit and apple. **Postharvest Biology and Technology**, v. 51, n. 2, p. 149-157, 2009.

BORÉM, A. Escape gênico & transgênicos. **Rivista Bio tecnologia**, 2001

BOURQUIN, Veronica et al. Xiloglucano endotransglicosilases have a function during the formation of secondary cell walls of vascular tissues. **The Plant Cell**, v. 14, n. 12, p. 3073-3088, 2002.

BRADFORD, Kent J. Water relations in seed germination. **Seed development and germination**, v. 1, n. 13, p. 351-396, 1995

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, 72(1-2), 248-254, 1976

BRASILEIRO, A. C. M., & CARNEIRO, V. D. C. Manual de transformação genética de plantas. *Brasília*, **Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen**, 1998

CAMPBELL, Paul; BRAAM, Janet. Xiloglucano endotransglicosilases: diversity of genes, enzymes and potential wall-modifying functions. **Trends in plant science**, v. 4, n. 9, p. 361-366, 1999.

CHO, S. K., et al. Constitutive expression of abiotic stress-inducible hot pepper CaXTH3, which encodes a xiloglucano endotransglucosylase/hydrolase homolog, improves drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. **FEBS letters**, 580(13), 3136-3144, 2006

CHOI, Jun Young et al. Constitutive expression of CaXTH3, a hot pepper xiloglucano endotransglucosylase/hydrolase, enhanced tolerance to salt and drought stresses without phenotypic defects in tomato plants (*Solanum lycopersicum* cv. Dotaerang). **Plant cell reports**, v. 30, n. 5, p. 867-877, 2011.

CORDOBA-PEDREGOSA, M. D. C. et al. Role of apoplastic and cell-wall peroxidases on the stimulation of root elongation by ascorbate. **Plant Physiology**, v. 112, n. 3, p. 1119-1125, 1996.

CÓRDOBA-PEDREGOSA, M. D. C. et al. Zonal changes in ascorbate and hydrogen peroxide contents, peroxidase, and ascorbate-related enzyme activities in onion roots. **Plant Physiology**, v. 131, n. 2, p. 697-706, 2003.

COSGROVE, Daniel J. Growth of the plant cell wall. **Nature reviews molecular cell biology**, v. 6, n. 11, p. 850, 2005.

COSGROVE, Daniel J.; JARVIS, Michael C. Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls. **Frontiers in plant science**, v. 3, 2012.

DAT, J., et al. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, 57(5), 779-795, 2000

DONG, J., et al. Isolation of a novel xiloglucano endotransglucosylase (OsXET9) gene from rice and analysis of the response of this gene to abiotic stresses. **African Journal of Biotechnology**, 10(76), 17424-17434, 2011

DOYLE, J. J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem Bull Bot Soc Am**, 19, 11-15, 1987

EDWARDS, Kieron D. et al. TobEA: an atlas of tobacco gene expression from seed to senescence. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 142, 2010.

FEHÉR, A., ÖTVÖS, K., PASTERNAK, T. P., & PETTKÓ-SZANDTNER, A. The involvement of reactive oxygen species (ROS) in the cell cycle activation (G0-to-G1 transition) of plant cells. **Plant signaling & behavior**, 3(10), 823-826, 2008

FRY, S. C. The structure and functions of xyloglucan. **Journal of Experimental Botany**, v. 40, n. 1, p. 1-11, 1989

FRY, S. C. et al. Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. **Biochemical Journal**, v. 282, n. 3, p. 821-828, 1992.

HAN, Ye et al. Analysis of xiloglucano endotransglicosilase/hydrolase (XTH) genes and diverse roles of isoenzymes during persimmon fruit development and postharvest softening. **PloS one**, v. 10, n. 4, p. e0123668, 2015.

HAN, Ye et al. Overexpression of persimmon DkXTH1 enhanced tolerance to abiotic stress and delayed fruit softening in transgenic plants. **Plant cell reports**, v. 36, n. 4, p. 583-596, 2017.

HARADA, Taro et al. Cloning, characterization, and expression of xiloglucano endotransglucosylase/hydrolase and expansin genes associated with petal growth and development during carnation flower opening. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 2, p. 815-823, 2010

HIRAGA, Susumu et al. A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, v. 42, n. 5, p. 462-468, 2001

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES – Relatório Anual 2016 ano base 2015. Brasília : IBÁ, 2016

IQBAL, A. et al. Identification and functional characterization of the promoter driving “xiloglucano endotransglucosylase/hydrolase gene (XET)” gene for root growth in the desert *Populus euphratica*. **South African Journal of Botany**, v. 112, p. 437-446, 2017

IURLARO, Andrea 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. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1686, 2016

JOHANSSON, Patrik et al. Crystal structures of a poplar xiloglucano endotransglicosilase reveal details of transglycosylation acceptor binding. **The Plant Cell**, v. 16, n. 4, p. 874-886, 2004

KEEGSTRA, Kenneth. Plant cell walls. **Plant physiology**, v. 154, n. 2, p. 483-486, 2010.

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

LE GALL, Hyacinthe et al. Cell wall metabolism in response to abiotic stress. **Plants**, v. 4, n. 1, p. 112-166, 2015.

LIU, Y. H., OFFLER, C. E., & RUAN, Y. L. A simple, rapid, and reliable protocol to localize hydrogen peroxide in large plant organs by DAB-mediated tissue printing. **Frontiers in plant science**, 5, 745, 2014

MEDEIROS, A. O. S. Avaliação da expressão gênica em xilemas de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus globulus* e estudos funcionais de genes, visando a qualidade da madeira. 2009.113 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ihéus, 2009.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in plant science**, 7(9), 405-410, 2002

MORALES, A. M. A. P. et al. Expressão de genes envolvidos na resistência da soja a *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 33, n. 3, p. 226-234, 2009

MURASHIGE, T., & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, 15(3), 473-497, 1962

NAKANO, Y., & ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and cell physiology**, 22(5), 867-880, 1981

NARDI, Cristina F. et al. Expression of FaXTH1 and FaXTH2 genes in strawberry fruit. Cloning of promoter regions and effect of plant growth regulators. **Scientia Horticulturae**, v. 165, p. 111-122, 2014.

NETO, C. P. Química da madeira de *Eucalyptus globulus*: especificidades e impacto nos processos de cozimento e de branqueamento. *Pasta e papel*, v. 7, p. 32-42, 2005

NETO, N. B. M., CUSTÓDIO, C. C., COSTA, P. R., & DONÁ, F. L. Deficiência hídrica induzida por diferentes agentes osmóticos na germinação e vigor de sementes de feijão1. **Revista Brasileira de Sementes**, 28(1), 142-148, 2006

NISHIKUBO, Nobuyuki et al. Xiloglucano endo-transglycosylase-mediated xiloglucano rearrangements in developing wood of hybrid aspen. **Plant Physiology**, v. 155, n. 1, p. 399-413, 2011

NISHITANI, K; TOMINAGA, R. Endo-xyloglucan transferase, uma nova classe de glicosiltransferase que catalisa a transferência de um segmento da molécula de xiloglucano para outra molécula de xiloglucano. *Journal of Biological Chemistry* , v. 267, n. 29, p. 21058-21064, 1992.

NISHITANI, Kazuhiko. The role of endoxiloglucano transferase in the organization of plant cell walls. **International review of cytology**, v. 173, p. 157-206, 1997.

O'DONOGHUE, Erin et al. A. Organization of cell walls in *Sandersonia aurantiaca* floral tissue. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 368, p. 513-523, 2002.

O'DONOGHUE, Erin M. et al. Xiloglucano endotransglicosilase: a role after growth cessation in harvested asparagus. **Functional Plant Biology**, v. 28, n. 5, p. 349-361, 2001.

OSATO, Yasue; YOKOYAMA, Ryusuke; NISHITANI, Kazuhiko. A principal role for AtXTH18 in *Arabidopsis thaliana* root growth: a functional analysis using RNAi plants. **Journal of plant research**, v. 119, n. 2, p. 153-162, 2006.

PASSARDI, Filippo. et al. Christophe. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. **Trends in plant science**, v. 9, n. 11, p. 534-540, 2004.

PAUX, Etienne et al. Identification of genes preferentially expressed during wood formation in *Eucalyptus*. **Plant molecular biology**, v. 55, n. 2, p. 263-280, 2004.

PEREIRA, José Carlos Duarte et al. Características da madeira de algumas espécies de eucalipto plantadas no Brasil. Colombo: **Embrapa Florestas**, 2000.

PINHEIRO, Márcia Margis; GERHARDT, Liliane; MARGIS, Rogério. Uma tecnologia com múltiplas aplicações. Hist. cienc. saude-Manguinhos, Rio de Janeiro , v. 7, n. 2, p. 465-479, Oct. 2000

PIROVANI, C. P. et al. Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of the witches' broom disease. **Electrophoresis**, 29(11), 2391-2401, 2008

POPPER, Zoë A.; FRY, Stephen C. Primary cell wall composition of pteridophytes and spermatophytes. **New Phytologist**, v. 164, n. 1, p. 165-174, 2004.

ROSE, Jocelyn KC et al. The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. **Plant and Cell Physiology**, v. 43, n. 12, p. 1421-1435, 2002.

RUPRECHT, Colin et al. Analyzing Xiloglucano endotransglicosilases by Incorporation of Synthetic Oligosaccharides into Plant Cell Walls. **ChemBioChem**, 2018.

SALADIÉ, Montserrat et al. Characterization of a new xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) from ripening tomato fruit and implications for the diverse modes of enzymic action. **The Plant Journal**, v. 47, n. 2, p. 282-295, 2006.

SANTAROSA, E.; Penteado Junior, J. F.; Goulart. Transferência de tecnologia florestal: cultivo de eucalipto em propriedades rurais: diversificação da produção e renda. Embrapa Florestas-Fôlder/Folheto/Cartilha (INFOTECA-E), 2014

SIERRO, Nicolas et al. The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. **Nature communications**, v. 5, p. 3833, 2014.

SINGH, Amar Pal et al. Petal abscission in rose is associated with the differential expression of two ethylene-responsive xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase

genes, RbXTH1 and RbXTH2. **Journal of experimental botany**, v. 62, n. 14, p. 5091-5103, 2011.

SCHOPFER, P. Histochemical Demonstration and Localization of H₂O₂ in Organs of Higher Plants by Tissue Printing on Nitrocellulose Paper. **Plant Physiology**, 104(4), 1269–1275, 1994

SHIGEOKA, S. et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of experimental Botany**, 53(372), 1305-1319, 1991

SMITH, R. C.; FRY, S. C. Endotransglycosylation of xyloglucans in plant cell suspension cultures. **Biochemical Journal**, v. 279, n. 2, p. 529-535, 1991.

SOUZA, C. R; ROSSI, L. M. B.; AZEVEDO, C. P.. Comportamento da *Acacia mangium* e de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em plantios experimentais na Amazônia Central. **Scientia Forestalis**, n.65, p.95-101, 2004

TAIZ, Lincoln et al. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. **Artmed** Editora, 2017.

TENHAKEN, Raimund. Cell wall remodeling under abiotic stress. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 771, 2015.

THORDAL-CHRISTENSEN, H., ZHANG, Z., WEI, Y., & COLLINGE, D. B.. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley—powdery mildew interaction. **The Plant Journal**, 11(6), 1187-1194, 1997

THOMPSON, Julie D.; HIGGINS, Desmond G.; GIBSON, Toby J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TOBE, K., LI, X., & OMASA, K.. Seed germination and radicle growth of a halophyte, *Kalidium caspicum* (Chenopodiaceae). **Annals of Botany**, 85(3), 391-396, 2000

VAN Sandt, VICKY ST et al. XET activity is found near sites of growth and cell elongation in bryophytes and some green algae: new insights into the evolution of primary cell wall elongation. **Annals of Botany**, v. 99, n. 1, p. 39-51, 2006.

WAKABAYASHI, K., SOGA, K., & HOSON, T.. Phenylalanine ammonia-lyase and cell wall peroxidase are cooperatively involved in the extensive formation of ferulate network in cell walls of developing rice shoots. **Journal of plant physiology**, 169(3), 262-267, 2012

WANG, Meng et al. Genome-Wide Identification and Expression Profiling Analysis of the Xyloglucan Endotransglucosylase/Hydrolase Gene Family in Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). **Genes**, v. 9, n. 6, p. 273, 2018.

WU, Yajun et al. Change in XET activities, cell wall extensibility and hypocotyl elongation of soybean seedlings at low water potential. **Planta**, v. 220, n. 4, p. 593-601, 2005.

ZHANG, Jing et al. The formation of wood and its control. **Current opinion in plant biology**, v. 17, p. 56-63, 2014.