



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GIOVANA MARTINS

EXPRESSÃO DE RNA DE PROTEÍNAS DO CLOROPLASTO DE TRIGO (*Triticum aestivum* VAR. LINI) CULTIVADO *IN VITRO* NA AUSÊNCIA DE NITROGÊNIO E NA PRESENÇA DA BACTÉRIA *Herbaspirillum seropedicae* SmR1

PALOTINA  
2022

GIOVANA MARTINS

EXPRESSÃO DE RNA DE PROTEÍNAS DO CLOROPLASTO DE TRIGO (*Triticum aestivum* VAR. LINI) CULTIVADO *IN VITRO* NA AUSÊNCIA DE NITROGÊNIO E NA PRESENÇA DA BACTÉRIA *Herbaspirillum seropedicae* SmR1

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Marise Fonseca dos Santos

PALOTINA  
2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO DE BIOCÊNCIAS  
Rua Pioneiro, 2153, - - Bairro Jardim Dallas, Palotina/PR, CEP 85950-000  
Telefone: 3360-5000 - <http://www.ufpr.br/>

## ATA DE REUNIÃO

Aos **17 dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e vinte e três, às catorze horas e quatro minutos**, na Sala virtual [Canal Giovana Martins apresentação de TCC](#) da **Plataforma Teams**, Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, realizou-se a Defesa Pública e Oral do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "**EXPRESSÃO DE RNA DE PROTEÍNAS DO CLOROPLASTO DE TRIGO (*Triticum aestivum* VAR. LINI) CULTIVADO IN VITRO NA AUSÊNCIA DE NITROGÊNIO E NA PRESENÇA DA BACTÉRIA *Herbaspirillum seropedicae* SmR1**" apresentado **pela** discente **Giovana Martins, orientada pela Profa. Dra. Marise Fonseca dos Santos**, como um dos requisitos obrigatórios para conclusão do curso de graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Iniciados os trabalhos, **a orientadora** e Presidente da Banca concedeu a palavra **à** discente, para exposição do seu trabalho. A seguir, foi concedida a palavra em ordem sucessiva aos membros da Banca de Exame, os quais passaram a arguir **a** discente. Ultimada a defesa, que se desenvolveu nos termos normativos, a Banca de Exame, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo atribuído **à** discente as seguintes notas: **Profa. Dra. Eliane C. G. Vendruscolo, nota: 95 (noventa e cinco)**, **Profa. Dra. Adriana Fiorini Rosado, nota: 100 (cem)**, e **Profa. Dra. Marise Fonseca dos Santos, nota: 98 (noventa e oito)**. A nota final **da** discente, após a média aritmética dos três membros da banca de exame, foi **98 (noventa e oito)**. As considerações e sugestões feitas pela Banca de Exame deverão ser atendidas **pela** discente sob acompanhamento de **sua orientadora**. Nada mais havendo a tratar foi lavrada a presente ata, que, lida e aprovada, vai por todos assinada eletronicamente.



Documento assinado eletronicamente por **MARISE FONSECA DOS SANTOS, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 17/02/2023, às 15:54, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **ELIANE CRISTINA GRUSZKA VENDRUSCOLO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 17/02/2023, às 15:55, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **ADRIANA FIORINI ROSADO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 17/02/2023, às 15:55, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **5306570** e o código CRC **8AC5C97E**.

## AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me permitido começar a me tornar uma cientista.

À minha família querida, por me dar suporte e incentivo durante todo o período acadêmico, e fora dele muito antes disso. Obrigada Pai, Mãe e irmão.

À minha querida orientadora, Dra. Marise Fonseca dos Santos, por ter confiado a mim uma parte do seu projeto, e acreditado que eu poderia fazer. Por toda orientação, não só profissional, mas também pessoal. A sua paciência, atenção, dedicação e coração estão sempre presentes na minha vida.

Aos colegas da graduação, que estiveram presentes comigo durante estes cinco anos, dentro e fora do campus, Acacio, Francielli, Maria, Nathalia e Pedro. Obrigada por tudo, cada momento com vocês foi especial, e levarei comigo para sempre a amizade que construímos. Amo vocês (até, e em especial ao Pedro).

Aos meus amigos e colegas de laboratório, que vivenciaram comigo o período de pesquisas deste projeto, me incentivando e me dando suporte, obrigado por cada risada e momento que tornaram mais leve, apenas por estarem presentes: Erika, Kawana, João, Maria e Pedro.

E por todos aqueles que me foi permitido conhecer por conta da Universidade, e que estiveram comigo em algum momento desta jornada, Gabriel, Hemilly e Lucas.

À Universidade Paranaense (UNIPAR), Campus Umuarama, por ceder o laboratório e equipamentos para nossos experimentos e com muito carinho à professora Dra. Silvia Graciele Hulse de Souza que me ensinou parte desse trabalho, por sua atenção, dedicação, muito obrigada.

Em especial ao meu namorado João Cândido de Marco Pires, que compartilhou cada sorriso meu e cada angústia.

## RESUMO

O nitrogênio (N) é um dos principais determinantes da produtividade da cultura do trigo, um dos maiores desafios enfrentados pela agricultura. E o uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) é uma forma de melhorar os índices de nitrogênio nas plantas. A aplicação de análises proteômicas em trigo tem sido realizada amplamente para avaliar as condições fisiológicas da planta e foi estudado por nosso grupo de pesquisa, os efeitos da ausência de N e/ou co-cultivo com a BPCV, *Herbaspirillum seropedicae* no meio de cultivo. Nesses estudos proteínas específicas do sistema antioxidante e dos fotossistema foram observadas, indicando respostas específicas quanto às variedades estudadas e a presença da bactéria. Entretanto análises da expressão gênica através dos níveis de RNA mensageiro (mRNA), são ferramentas que podem corroborar nos estudos sobre a função dos sistemas biológicos. O objetivo desse trabalho foi realizar a quantificação da expressão do RNAm de proteínas identificadas como presentes por análise proteômica nas folhas de 2 variedades de trigo quando co-cultivadas na presença de, *H. seropedicae*. A expressão dos genes *psbA*, *psaA*, *GSA* e *PPL1* nos diferentes ensaios foi avaliada por RT-qPCR, juntamente com o gene referência ACT1. Após a extração do RNA total das folhas de trigo, foi obtido o cDNA e a amplificação foi realizada por PCR em tempo real. A integridade dos produtos de PCR foi checada por eletroforese em gel de agarose. A expressão gênica relativa foi calculada pela fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , em que o gene alvo é normalizado com a expressão do gene referência (Actina), e na sequência comparado ao grupo controle. Os resultados para o gene *GSA* corroboraram com dados proteômicos, enquanto que a expressão para os genes *psaB*, *psaA* e *ppl1* foram opostos ao estudo realizado. A partir dos expressos avaliados é possível indicar que ausência de nitrogênio (condições SN e SNI) para a cv. CD 104 são situações de estresse que levam a menor atividade de expressão dos genes relacionados a fotossíntese. Ao contrário da cv. CD 120, que aparentemente está mais ativa em nos fotossistemas e na sua recuperação.

**Palavras-chave:** *psbA*, *psaA*, *GSA*, *PPL1*.

## ABSTRACT

Nitrogen (N) is a major determinant of wheat crop productivity, one of the biggest challenges facing agriculture. And the use of plant growth promoting bacteria (GPCB) is one way to improve nitrogen rates in plants. The application of proteomic analysis in wheat has been widely performed to evaluate the physiological conditions of the plant and it was studied by our research group, the effects of the absence of N and/or co-cultivation with the BPCV, *Herbaspirillum seropedicae* in the culture medium. In these studies, specific proteins of the antioxidant system and photosystems were observed, indicating specific responses as to the varieties studied and the presence of the bacteria. However, analysis of gene expression through the levels of messenger RNA (mRNA) are tools that can corroborate studies on the function of biological systems. The objective of this work was to quantify the mRNA expression of proteins identified as present by proteomic analysis in the leaves of two wheat varieties when co-cultivated in the presence of *H. seropedicae*. The expression of *psbA*, *psaA*, *GSA* and *PPL1* genes in the different assays was evaluated by RT-qPCR, together with the reference gene *ACT1*. After extraction of total RNA from wheat leaves, cDNA was obtained and amplification was performed by real-time PCR. The integrity of the PCR products was checked by agarose gel electrophoresis. Relative gene expression was calculated by the formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , in which the target gene is normalized with the expression of the reference gene (*Actin*), and in the sequence compared to the control group. The results for the *GSA* gene corroborated with proteomic data, while the expression for the *psaB*, *psaA* and *ppl1* genes were opposite to the study performed. From the expressions evaluated it is possible to indicate that absence of nitrogen (SN and SNI conditions) for cv. CD 104 are stress situations that lead to lower expression activity of photosynthesis-related genes. In contrast to the cv. CD 120, that apparently is more active in the photosystems and their recovery.

**Keywords:** *psbA*, *psaA*, *GSA*, *PPL1*.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - DIAGRAMA DE VENN.....	16
FIGURA 2 - EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE <i>PSBA</i> .....	23
FIGURA 3 - EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE <i>PSAA</i> .....	24
FIGURA 4 - EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE <i>GSA</i> .....	27
FIGURA 5 - EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE <i>PPLI</i> .....	28

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - SEQUÊNCIAS DE PRIMERS UTILIZADOS NA ANÁLISE DE PCR E qRT-PCR. ....	20
TABELA 2 - PROTEÍNAS SELECIONADAS PARA ANÁLISE .....	21

## LISTA DE ABREVIATURAS

- C - Carbono
- °C - Grau(s) Celsius
- cDNA - DNA Complementar
- CN - Experimento Controle com Nitrogênio
- CV - Coeficiente de Variação
- cv.(s) - Cultivar (es)
- DNA - Desoxirribonucleico
- dNTP - Desoxirribonucleotídeos fosfatados
- FBN - Fixação Biológica de Nitrogênio
- N - Nitrogênio
- pb - Pares de base
- PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
- PGPB - Plant Growth Promoting Bacteria (Bactérias promotoras de crescimento de plantas)
- PSII - Fotossistema II
- PSI - Fotossistema I
- RNA - Ácido Ribonucleico
- rpm - Rotação por minuto
- RT-qPCR- PCR Quantitativo em Tempo Real
- SN - Experimento Controle sem Nitrogênio
- SNI - Sem Nitrogênio Inoculado



## **LISTA DE SIGLAS**

LABIOGEN - Laboratório de Bioquímica e Genética

UFPR - Universidade Federal do Paraná

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2 OBJETIVO</b> .....	<b>12</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	12
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>13</b>
3.1 CULTURA DO TRIGO ( <i>TRITICUM AESTIVUM</i> ) .....	13
3.2 <i>HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE</i> .....	13
3.3 CLOROPLASTOS: EXPRESSÃO GÊNICA .....	14
3.4 ESTUDOS DE ANÁLISE PROTEÔMICA E USO DE Q-RT-PCR.....	15
3.5 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RNA .....	16
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
4.1 OBTENÇÃO DE FOLHAS DE TRIGO DAS CV. CD104 E CD120 NAS CONDIÇÕES DO ESTUDO.....	18
4.1.1 Cultivo das plantas.....	18
4.1.2 Condições de crescimento bacteriano e preparo do inóculo.....	19
4.1.3 Coleta de amostras.....	19
4.1.4 Extração do RNA e obtenção do cDNA .....	19
4.1.5 Análise quantitativa-real time(qRT-PCR) .....	19
4.1.6 Eletroforese dos produtos de amplificação.....	20
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>21</b>
5.1 Q-RT-PCR DE RNA DE PROTEÍNAS DO CLOROPLASTO DE TRIGO .....	22
5.1.1 Expressão do gene <i>psba</i> nas cv.s de trigo CD104 e CD120.....	22
5.1.2 Expressão do gene <i>psaA</i> nas cv.s de trigo CD104 e CD120 .....	24
5.1.3 Expressão do gene <i>gsa</i> nas cv.s de trigo CD104 e CD120.....	26
5.1.4 Expressão do gene <i>ppl1</i> nas cv.s de trigo CD104 e CD120 .....	27
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>30</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>31</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O trigo (*Triticum aestivum* L.) possui um importante papel no cenário agrícola mundial, sendo um dos cereais mais cultivados. O Brasil produziu aproximadamente 7,7 milhões de toneladas de trigo na safra 2021. O trigo destaca-se no sul do Brasil, principalmente no Paraná e no Rio Grande do Sul, sendo a principal cultura de inverno. No cenário nacional, a área cultivada foi de 2,74 milhões de hectares destinados ao plantio do cereal na safra 2021, sendo a região sul responsável por mais de 90% da área plantada (CONAB, 2022).

O nitrogênio (N) é o principal limitante da produção de poáceas de alto rendimento de grãos, como o milho e o trigo; portanto, a prática de adubação nitrogenada se faz comum e responsável pelo elevado custo da produção agrícola (MELLO, 2012). No entanto, esses sistemas de produção são conhecidos por impactar negativamente o meio ambiente e, como tal, muitos autores estão atualmente propondo uma "nova revolução verde" visando melhorar a produção de alimentos por meio de uma melhor compreensão das interações solo-planta e manejo de microrganismos benéficos do solo (GEWIN, 2010).

Uma alternativa sustentável para o mercado agrícola, visando à redução do uso de fertilizantes, conseqüente redução de custo de produção, é a utilização das bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) que vem ganhando espaço no campo e aceitação pelos agricultores. Prova disso é a venda de mais de 80 milhões de doses de inoculantes anualmente no mercado brasileiro (SOARES, 2018). Entre os benefícios confirmados das BPCV, quando associadas as plantas, estão: facilitação da aquisição de nutrientes como nitrogênio, fósforo, ferro, modulação e equilíbrio de hormônios vegetais produzidos pela planta, além de auxílio na redução de estresses bióticos e abióticos (BHARDWAJ et al., 2014).

Dentre as BPCV pode-se destacar as espécies *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*, as quais são bactérias fixadoras de nitrogênio que, quando associadas com as plantas podem promover benefícios como aumento significativo na altura e biomassa da planta, comprimento das raízes, matéria seca, produção e rendimento de grãos, bem como aumento da tolerância a estresses bióticos e abióticos (DI BENEDETTO et al., 2017; ÇAKMAKCI et al., 2017; NEHRA; CHOUDHARY 2015). Entretanto as respostas de associação para promoção do crescimento são distintas entre as variedades ou espécies vegetais de não leguminosas (AFZAL et al., 2019; IBORT et al., 2018; MIRSKAVA et al., 2022).

Em trigo (*Triticum aestivum* L.) de cultivares de origem da COODETEC, cv. CD 104 e cv. CD 120, apresentaram respostas distintas quanto a inoculação *in vitro* e a vaso com a bactéria *H.seropedicae* (NEIVERTH et al., 2014).

A RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) é atualmente uma das técnicas mais poderosas e sensíveis para analisar a expressão gênica e, entre suas diversas aplicações, é frequentemente usada para validar dados de saída produzidos por micro e macro-arrays de genomas completos e como uma fonte primária para detectar padrões de expressão de genes específicos (CALDANA et al., 2007; CZECHOWSKI et al., 2004; GACHON et al., 2004). A quantificação confiável por análise qRT-PCR dos níveis de expressão gênica requer a padronização e o ajuste fino de vários parâmetros, como: quantidade de amostra inicial, recuperação e integridade do RNA, eficiências enzimáticas da síntese de cDNA e amplificação por PCR, além da atividade transcricional geral dos tecidos ou células analisadas (GINZINGER, 2002). Obviamente, o sucesso deste procedimento depende da seleção de genes de controle apropriados, que seriam idealmente aqueles que apresentam expressão estável em várias condições experimentais e em diferentes tipos de tecidos.

No último trabalho de NEIVERTH-CHAGAS (2020), onde foi realizada análise proteômica nas folhas de 2 variedades de trigo co-cultivadas *in vitro* na presença de *Herbaspirillum seropedicae*, foram encontradas diversas proteínas, em especial de cloroplasto de trigo. Este trabalho, portanto, propõe avaliar a quantificação da expressão do RNAm de algumas das proteínas presentes e ausentes em tratamentos com e sem a presença da bactéria e/ou de nitrogênio no meio de co-cultivo vegetal.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Quantificação da expressão do RNAm de proteínas identificadas como presentes por análise proteômica nas folhas de 2 variedades de trigo quando co-cultivadas na presença de um BPCV, *Herbaspirillum seropedicae*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Para proceder extração de RNA, obter folhas de trigo das cv. CD 104 e CD 120 cultivadas *in vitro* em meio MS sem sacarose, sem fonte de nitrogênio e inoculada com a bactéria *H. seropedicae* SmR1, e para controle obter folhas de trigo das cultivares (cv.) CD 104 e CD 120 cultivadas *in vitro* em meio MS sem sacarose com e sem fonte de nitrogênio;
- Padronizar o método RT-PCR em tempo real, e realizar a amplificação e quantificação do RNA;
- Analisar as amostras por meio da ferramenta de diagnóstico molecular RT-PCR em tempo real;
- Comparar os resultados de expressão de RNAm com os dados proteômicos obtidos.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 CULTURA DO TRIGO (*TRITICUM AESTIVUM*)

O *Triticum aestivum* L. é uma espécie que pertence à família Poaceae, é uma planta autógama, ou seja, se autofecunda, possuindo de 5 a 6 folhas, porém pode variar de 3 a 8. Apresenta inflorescência do tipo espiga constituída por espiguetas, seu grão é chamado cariopse; seu ciclo completo pode variar de 100 a 170 dias de acordo com a cultivar e condições edafoclimáticas (BORÉM et al., 2015).

No Brasil, o cultivo de trigo é direcionado para a espécie *T. aestivum*, sobretudo por imposições edafoclimáticas (solo, clima, temperatura e foto exposição), sendo classificado como uma cultura de inverno. Apesar de ser uma cultura de baixa necessidade hídrica, a estiagem e a baixa precipitação diminuem o rendimento, bem como geadas na fase reprodutiva e altas temperaturas (CONAB, 2022). No entanto, os esforços dos programas de melhoramento genético e o aperfeiçoamento dos sistemas de produção proporcionaram aumento na produtividade do trigo (BORÉM et al., 2015). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), o trigo é o quarto maior grão em produção no país, atrás da soja (legumes; 125,47 Mt) milho (112,34 Mt) e arroz (10,56 Mt). A produção de trigo está estimada em cerca de 7,98 Mt para 2022, e ao contrário do que acontece com outros cereais, a produção brasileira não atende a demanda. O consumo atual, da ordem de 12,7 Mt, impõe a necessidade de importação de 6,5 Mt de trigo em 2022 (CONAB, 2022).

#### 3.2 *HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE*

*H. seropedicae* é uma bactéria Gram-negativa, endofítica, com formato podendo variar entre helicoidal e vibróide, possui de um a três flagelos, apresenta diâmetro da célula de 0,6 a 0,7  $\mu\text{m}$  e o comprimento da célula varia de 1,5 a 5  $\mu\text{m}$ . A cepa SmR1 é a mais estudada da espécie, mutante espontânea resistente ao antibiótico estreptomicina da linhagem Z78 (ATCC 35893) e teve seu genoma completo sequenciado e publicado sob número de acesso no GenBank NC\_014323.1 (PEDROSA et al., 2011; MONTEIRO et al., 2012).

Segundo um estudo realizado por CHI et al. (2005) as bactérias endofíticas são recrutadas principalmente pelas raízes e posteriormente alcançam o restante da planta. A associação das plantas com *H. seropedicae* pela raiz tem início com a quimiotaxia, que atrai a bactéria para a rizosfera. Após esse processo, "*H. seropedicae* entra em contato com o tecido radicular da planta, onde as bactérias irão aderir à superfície das raízes preferencialmente nos

pontos de emergência em raízes laterais. A penetração ocorre pelas fissuras radiculares laterais e pelas zonas de alongamento, atingindo os vasos do xilema e os espaços intercelulares, ocasionando uma colonização endofítica na planta que pode ser encontrada nas folhas, brotos e cavidades subestomáticas” (MONTEIRO et al., 2012).

Após a associação planta- bactéria estabelecida (ou não), *H. seropedicae* pode promover o crescimento vegetal por meio de diferentes mecanismos como fixação de nitrogênio, produção de sideróforos, liberação de fitormônios, indução de resistência das plantas às condições de estresse biótico e abiótico (PEDROSA et al., 2011; MONTEIRO et al., 2012).

### 3.3 CLOROPLASTOS: EXPRESSÃO GÊNICA

Os cloroplastos são os plastídios mais abundantes nas células foliares da maioria das angiospermas, cujo número pode chegar a centenas por célula, dependendo da espécie. Possuem várias cópias de seu genoma por célula, o que auxilia na produção e manutenção do aparato fotossintético durante o desenvolvimento da planta. Os cloroplastos possuem um genoma circular de fita dupla organizado na forma de um nucleóide, ancorado nas tilacóides e na membrana interna. Nucleóides consistem em grupos de aproximadamente 10 cópias de DNA plastidial. Eles são organelas semiautônomas, codificando e sintetizando algumas de suas próprias proteínas. Dentre as proteínas codificadas pelos cloroplastos, uma das mais abundantes é a subunidade maior da Rubisco, 55 kDa. A rubisco responde por 50% do teor total de proteína solúvel nas folhas e é considerada uma das proteínas mais abundantes do planeta. Seu padrão de degradação e substituição contínua explica o alto número de ribossomos presentes nos cloroplastos (SPREITZER et al, 2002).

Os cloroplastos são responsáveis pela fotossíntese e produção de hormônios e metabólitos (CHEN, et al., 2005; POGSON et al., 2011), que se desenvolvem a partir de plastídios presentes em células verdes de meristemas vegetais. A biossíntese dos cloroplastos inclui a interação de genes codificados por plastídios e núcleos (LEISTER, 2003). O processo de biogênese do cloroplasto acompanha a biossíntese de clorofilas, proteínas do cloroplasto, carotenoides e lipídios, e a montagem de complexos de proteínas fotossintéticas, incluindo o complexo de coletor de luz (Light Harvesting Complex-LHC), fotossistema I (PSI), fotossistema II (PSII), citocromo f/b<sub>6</sub> (cyt f/b<sub>6</sub>) e adenosina trifosfato (ATP) sintase (CHEN, et al., 2005). Muitos fatores têm efeitos diretos na biossíntese do cloroplasto, como luz, água, sal, idade da folha entre outros (WESTON et al., 2000).

O fotossistema II (PSII) é um complexo enzimático de várias subunidades que age como uma água plastoquinona-oxidoreductase movida a luz incorporada na membrana tilacoide de cianobactérias e cloroplastos (SHEN, 2015). O núcleo PSII inclui as subunidades de membrana central D1, D2, CP43, CP47 e muitas subunidades de baixo peso molecular. D1 e D2 formam o centro de reação fotoquímica onde ocorre a separação de cargas e a transferência de elétrons através da membrana (PAGLIANO et al., 2013). O núcleo PSII é composto por proteínas PsbO, PsbU e PsbV em cianobactérias e proteínas PsbO, PsbP e PsbQ em plantas verdes. Em plantas verdes, PsbO e PsbP são essenciais para o crescimento foto-autotrófico (IFUKU et al., 2005; YI et al., 2005). Acredita-se que PsbP e PsbQ sejam derivados de suas respectivas contrapartes cianobacterianas, CyanoP e CyanoQ (THORNTON et al., 2004), mas sua localização e papel aparentemente diferem daqueles de seus parentes cianobactérias (AOI et al., 2014; JUNEAU et al., 2016; KNOPPOVÀ et al., 2016).

A proteína 1 semelhante a PsbP (PPL1) é um dos homólogos de PsbP mais intimamente relacionados a CyanoP em análises filogenéticas. A análise de co-expressão de mRNA sugeriu que PPL1 é expresso junto com os genes relacionados a respostas relacionadas ao estresse. Na verdade, a atividade PSII do mutante *ppl1* é mais sensível à alta luz e em particular, a recuperação da atividade PSII foto-inibida é retardada na ausência de *PPL1* (ISHIHARA et al., 2007).

### 3.4 ESTUDOS DE ANÁLISE PROTEÔMICA E USO DE Q-RT-PCR

Técnicas proteômicas têm sido uma importante ferramenta para estudar os mecanismos de respostas das plantas e suas interações (CHENG; MCCONKEY; GLICK, 2010). Além de estabelecer uma ligação entre a expressão gênica e a abundância de proteínas, os estudos proteômicos estão ajudando a identificar proteínas-chave envolvidas em vias de interesse, como defesa vegetal e resistência a patógenos (ĀRYA et al. al., 2019). E pode ser primordial compreender processos fisiológicos que não podem ser esclarecidos no nível genômico (BERTINI et al., 2019).

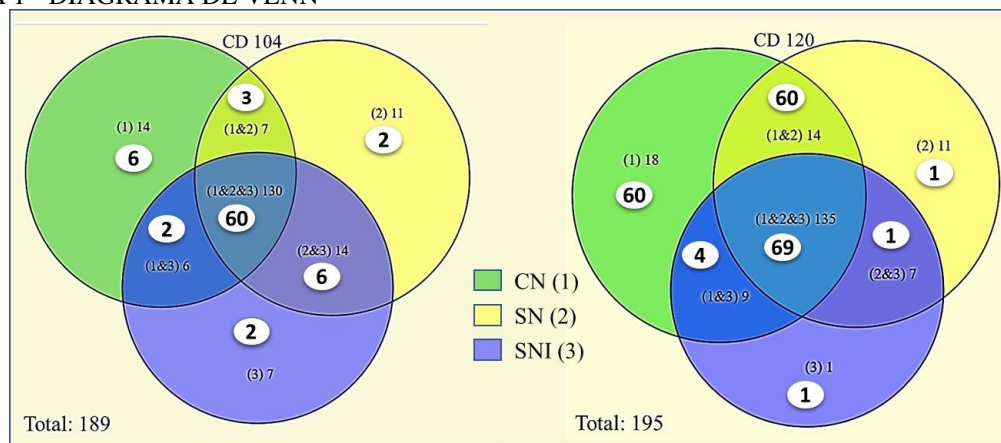
A análise da expressão gênica através dos níveis de RNA mensageiro (mRNA) ou dos níveis proteicos, são ferramentas significativas para entender a função dos sistemas biológicos. No entanto, o nível de mRNA não corresponde necessariamente à abundância de proteína devido à meia-vida do mRNA, às modificações pós-transcricionais que ocorrem no transcrito primário e à ativação ou não ativação da tradução do mRNA para a proteína. Essas modificações não são detectadas a nível de mRNA, mas desempenham papéis importantes na

estabilidade, localização, interações e mecanismo de ação da proteína (BERTUCCI et al., 2006).

A aplicação de análises proteômicas em trigo tem sido realizada amplamente para avaliar as alterações no proteoma da planta que vão desde o estudo da fertilização com nitrogênio (LANDOLFI et al., 2021; LIU et al., 2021) ou do estresse hídrico (MEHRI et al., 2020), até a busca por contaminação de trigo em outros grãos e detecção de glúten em alimentos (COLGRAVE et al., 2015; FIEDLER et al., 2014), contudo não há muitos experimentos utilizando a proteômica como ferramenta para investigar as alterações fisiológicas do trigo na interação com a bactéria promotora de crescimento vegetal.

Estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa utilizou *H. seropedicae* em co-cultivo em meio ausente de fonte de N, (NEIVERTH-CHAGAS et al., 2020) avaliou a expressão de proteínas foliares de cultivares de trigo brasileiras. Estes estudos identificaram respostas proteicas específicas em estágios iniciais de desenvolvimento foram acompanhados por estudos de emissão de fluorescência, que é relativo ao PSII. Foi observada um incremento de tolerância ao estresse da cv. CD 120 quando inoculada com *H. seropedicae*.

FIGURA 1 - DIAGRAMA DE VENN



Em destaque nos círculos branco o número de proteínas identificadas no estudo de proteoma de folhas de trigo (*Triticum aestivum* L.) das cv.s CD 104 e CD 120 em condições de cultivo in vitro em Meio MS sem sacarose: com (CN) e sem (SN) fonte de nitrogênio e SN com inoculação de *H. seropedicae* (SNI) por 21 dias.

Fonte: NEIVERTH-CHAGAS (2020)

### 3.5 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RNA

Existem no mercado diversos kits para o isolamento de RNA para diversos tipos celulares e tecidos vegetais, incluindo os vegetais. A grande maioria baseada no princípio da capacidade de ligação do RNA a uma resina de gel de sílica presente em uma coluna, a depender da

concentração salina. No entanto, além de serem caros, esses kits, muitas vezes, não proporcionam bom rendimento, principalmente por serem padronizados para o isolamento de plantas modelo, como *Arabidopsis thaliana*. A grande diversidade de composição química entre plantas, e até mesmo entre tecidos de uma mesma espécie, necessita de otimização dos protocolos de extração de RNA total para cada genótipo ou tipo de tecido. Muitas plantas são ricas em polissacarídeos, proteínas de reservas ou compostos secundários que podem se ligar e coprecipitar com o RNA durante sua extração, afetando sua pureza (SALZMAN et al., 1999). Os compostos fenólicos e outros compostos secundários também presentes em muitas espécies vegetais, sofrem oxidação, formando quinonas, que se ligam ao RNA promovendo sua degradação (GHAWANA et al., 2011). Outra limitação à extração de RNA de plantas são as barreiras físicas como a presença de cutículas espessas, pelos, espinhos, tubérculos, tecidos fibrosos ou sementes e grãos duros que oferecem resistência à maceração completa do material vegetal, o que também interfere na qualidade final do RNA isolado. Dadas essas particularidades, não é possível recomendar um protocolo universal para a extração de RNA de plantas.

O sucesso na obtenção de RNA intacto depende da rápida inativação de RNases endógenas em um estágio inicial do procedimento, em que as células são rompidas e nucleases celulares poderiam ter acesso a ácidos nucleicos. Além disso, para assegurar a obtenção do RNA de boa qualidade, é necessário seguir cuidados de limpeza na área de trabalho e no material.

A estimativa da quantidade e qualidade do RNA isolado é frequentemente realizada via espectrofotometria. A leitura em um comprimento de onda correspondente a 260 nm é utilizada para mensurar a quantidade de ácidos nucleicos, uma vez que esse é o comprimento de onda de máxima absorbância dessas moléculas. A razão entre as medidas a 260 nm e 280 nm indica a pureza do RNA, sendo valores próximos a 2,0 considerados ideais (BARBAS et al., 2007). Em comprimento de onda próxima a 280nm proteínas, fenóis ou outros compostos que absorvem, assim medidas inferiores para a razão 260/280 podem indicar contaminação. A razão entre as leituras a 260 nm e 230 nm é utilizada de forma complementar para a avaliação da pureza do RNA. Para amostras de boa qualidade, esperam-se valores entre 2,0 e 2,2, e superior ao obtido para a relação 260/280 (NANODROP, 2007). Valores abaixo dessa faixa podem indicar a presença de agentes contaminantes que absorvem luz a 230 nm, tais como EDTA, fenol, carboidrato, glicogênio ou guanidina (NANODROP, 2007). As medidas podem ser realizadas em espectrofotômetro com luz ultravioleta (UV) comum ou por nanoespectrofotômetros, que

possuem a vantagem de mensurar diretamente a amostra a partir de 1  $\mu$ L, dispensando a necessidade de diluições e uso de cubeta.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO DE FOLHAS DE TRIGO DAS CV. CD104 E CD120 NAS CONDIÇÕES DO ESTUDO.

Esse protocolo seguiu exatamente o proposto por NEIVERTH-CHAGAS., 2020. E segue transcrito abaixo.

#### 4.1.1 Cultivo das plantas

O experimento *in vitro* foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Genética (LABIOGEN) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) - Setor Palotina. As sementes de *T. aestivum* (cv. CD104 e cv. CD120.), foram oriundas do germoplasma da Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola (COODETEC, Paraná, Brasil), que foi extinta e atualmente estão armazenadas na EMBRAPA TRIGO e são propagadas pelo laboratório

As sementes foram esterilizadas conforme protocolo de (CAMILIOS-NETO et al., 2014), onde foram imersas em etanol 70% por 30s, sob agitação (120rpm). Em seguida, agitadas em solução de hipoclorito acidificado (NaOCl 0,5% (v/v) HCl concentrado 0,18% (v/v), Tween 80 0,01% (v/v) e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  7 mM) por 5 min. Então lavadas em água estéril 3 vezes sob agitação, por 1 min cada, seguindo por imersão durante 4hrs em água estéril. Em seguida as sementes foram colocadas novamente em solução de hipoclorito acidificado por 5 min, lavadas 3 vezes como anteriormente e deixadas 5 min em peróxido de hidrogênio 35% (v/v) e novamente lavadas 4 vezes em água estéril por um minuto cada, sob agitação. Em seguida, foram germinadas em placas que contenham ágar água a 30°C, na ausência de luz por 24 hrs. As sementes germinadas com vigor semelhante, foram, uma a uma, transferidas para tubos de ensaio de vidro estéreis (20 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro) contendo 25 mL de meio de cultivo MS (MURASHIGE et al., 1962) sem sacarose, com presença (CN) ou ausência de fonte de nitrogênio (SN). Esferas de polipropileno (cerca de 10 mL em volume) foram usadas no meio para servir de suporte às sementes e plantas.

O cultivo foi realizado em sala de crescimento sob condições de fotoperíodo de 14hrs luz/10hrs escuro em temperatura de 25 ( $\pm$ 2) °C, sendo os tubos acomodados em estantes

dispostas aleatoriamente em prateleiras. Após 24hrs da transferência das sementes germinadas parte dos tubos SN, foi feita a inoculação com 0,25 mL de suspensão de *H. seropedicae* SmR1 na concentração de  $1,5 \times 10^7$  UF. mL<sup>-1</sup> (tratamento SNI). Após 21 dias da transferência das sementes para os tubos, o experimento foi considerado encerrado.

#### 4.1.2 Condições de crescimento bacteriano e preparo do inóculo

O cultivo bacteriano de *H. seropedicae* SmR1 e o preparo do inóculo foi de acordo com protocolo proposto na literatura (KLASSEN et al., 1997) em meio NFbHP-malato contendo 20 mM NH<sub>4</sub>Cl com adição de estreptomicina (80 µg.mL<sup>-1</sup>).

As bactérias em meio líquido foram quantificadas por turbidimetria a 600 nm na fase exponencial, tomando como referência a relação 1,0 DO a 600 nm para  $4,4 \times 10^8$  células. mL<sup>-1</sup>. A quantidade necessária para uma concentração de  $1,5 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup> será centrifugada a 12.000 x g por 10 min a 4 °C, e o pellet ressuspenso em solução salina (MOUTIA et al., 2003). Posteriormente, feita a inoculação das sementes configurando o co-cultivo (SNI).

#### 4.1.3 Coleta de amostras

Após o cultivo *in vitro*, as plantas foram coletadas aleatoriamente, lavadas com água destilada, secas com papel toalha e a parte aérea destacada das raízes e pesadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e guardadas em ultra-freezer (-80°C).

#### 4.1.4 Extração do RNA e obtenção do cDNA

O RNA total de folhas foi extraído com o kit de extração *SV Total RNA Isolation System* (Promega®) e digerido com DNase (Promega®) de acordo com as instruções do fabricante. A integridade e qualidade do RNA foi analisada em eletroforese com gel de agarose 1,2%. A quantificação foi realizada no Nano drop 2000 (Thermo Fisher), A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir de 2 µg de RNA total utilizando o kit comercial GoScript® Reverse Transcription System (Promega™) e os oligos (dT)15 de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi extraído de três repetições biológicas para cada um dos tratamentos.

#### 4.1.5 Análise quantitativa-real time(qRT-PCR)

A qPCR foi amplificada em volume final de 10 µL com o kit SYBR Green PCR® (Qiagen™) contendo 1µL cDNA (diluído 1:10), 5 µL 2X SYBR Green PCR Master Mix

(Qiagen™), 0,7 µL de cada primer (10 mM), 2,6 µL de água. As reações foram realizadas em equipamento Rotor-GeneQ 5 plex + HRM® (Qiagen™) nas seguintes condições: 2 min a 95 °C seguido por 35 ciclos de 5 seg a 95 °C e 10 seg a 60 °C. Para o estudo da expressão gênica, foram desenhados primers específicos (Tabela 1).

Os resultados da expressão gênica foram avaliados pelo cálculo de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , uma forma de quantificação relativa, na qual o gene de interesse é primeiro normalizado para a expressão gênica de referência, sendo este à Actina (F-CAGTACTGCTGACTGAGGCG/R-TGCGTCCACTAGCATATAGGG) e depois comparado ao grupo controle (LIVAKA e SCHMITTGENB, 2001), onde Ct (threshold cycle) é o ciclo de PCR em tempo real, no qual a amplificação atinge a fase log, representando a diferença na expressão entre o gene alvo e o controle endógeno em uma determinada amostra e delta delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) corresponde à diferença entre o  $2^{-\Delta Ct}$  da amostra e o  $2^{-\Delta Ct}$  do controle.

TABELA 1 - SEQUÊNCIAS DE PRIMERS UTILIZADOS NA ANÁLISE DE PCR E qRT-PCR.

Gene	Primers	Sequências	Nº de bases
<i>PSBA</i>	<i>Forward</i>	5'-AGAGACGCGAAAGTACAAGC-3'	20
	<i>Reverse</i>	5'-CATCAAAACACCGAACCATCC-3'	21
<i>PSAA</i>	<i>Forward</i>	5'-TCTTTGAGGAATGGGCGAG-3'	20
	<i>Reverse</i>	5'-ATCAGCATGTAGGTTCCAGATC-3'	22
<i>GSA</i>	<i>Forward</i>	5'-GAAACCCTCTAGCTATGACTGC-3'	22
	<i>Reverse</i>	5'-TCTCATGAAATGTTTTAGCG-3'	20
<i>PPLI</i>	<i>Forward</i>	5'-CTACTCCTTCGTCTACCCATTC-3'	22
	<i>Reverse</i>	5'-TGTTGATGCTGACGCTCTC-3'	19

FONTE: O autor (2022).

#### 4.1.6 Eletroforese dos produtos de amplificação

Os produtos de amplificação das reações de RT-qPCR dos genes *PSBA*, *PSAA*, *GSA* e *PPLI*, os quais foram analisados em Termociclador em tempo real também foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE 1x (Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2 mM pH 8.0) e corado com 0,2 µg/ml de brometo de etídio para confirmar o tamanho de pares de bases do amplicon e a viabilidade da amostra. A análise semiquantitativa das

intensidades das bandas não foi realizada porque os dados de qPCR foram suficientes para estimar os níveis de expressão gênica. Foi utilizado o padrão de tamanho molecular 100 pb (Invitrogen™) e 4 µL de cada amostra com tampão de amostra (BlueJuice Gel Loading Buffer 1x) foi aplicado nos poços do gel. Após a corrida eletroforética (110 Volts por aproximadamente 40 minutos), o gel foi fotodocumentado utilizando o equipamento Locus Biotecnologia L.PIX.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Esse trabalho buscou relacionar dados obtidos por qRT-PCR de RNA de proteínas presentes no cloroplasto de trigo (*Triticum aestivum*) cv. CD 104 e CD 120, inoculadas com a bactéria *H seropedicae* SmR1 (Tabela 2), com dados de NEIVERTH et al., 2020. Estudos de proteínas em condições de suprimento de N são importantes para avaliar interações e observar evidências do efeito de bactérias na promoção do crescimento e possivelmente FBN.

TABELA 2 - PROTEÍNAS SELECIONADAS PARA ANÁLISE

Gene	ID UNIPROT	Descrição	Presença no proteoma (cv.)	
			CD 104	CD 120
<i>PSBA</i>	A0A3B5ZT76	Proteína D1 do PSII	CN&SN&SNI	CN&SN&SNI
<i>PSAA</i>	P58311	Clorofila a Apo A1 do PSI	SNI	CN&SN
<i>GSA</i>	A0A3B6TIX1	Glutamato-1-semialdeído 2,1-aminomutase,	CN	CN&SNI
<i>PPL1</i>	A0A3B6JED8	Proteína contendo domínio PsbP	SN	SNI

FONTE: O autor (2022)

A expressão dos genes *PSBA*, *PSAA*, *GSA*, *PPL1* foram comparadas com a do gene referência da actina (*Act1*), gene esse que foi adequado para normalização precisa em caso de ferrugem, salinidade, hormônio vegetal e tratamentos de estresse nutricional (LEKSHMY et al., 2017). Através dos resultados de expressão gênica do *Act1* foi possível padronizar os dados pelo cálculo de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  e obter resultados mais precisos e exatos da comparação da expressão gênica de amostras tratadas e não tratadas.

A técnica qPCR mede a intensidade de expressão de um determinado gene em uma amostra em condições biológicas específicas. Essa medida é expressa em ciclos (Ct) de PCR, um valor relativo que representa o número de ciclos em que a quantidade de DNA amplificado atinge o nível limite. Ct deve ser normalizado devido à variabilidade inter-experimental. A expressão diferencial é realizada gene por gene, comparando Ct normalizado ( $\Delta Ct$ ) e valores replicados entre dois grupos de amostras (duas condições). Como em cada ciclo de PCR (valor Ct), a quantidade de DNA é duplicada, o Ct é uma escala logarítmica e é inversamente proporcional à quantidade de material genético. Portanto,  $\Delta Ct$ s altos sinalizam baixa expressão, enquanto os genes superexpressos introduzem baixos  $\Delta Ct$ s. Comparando os valores normalizados ( $\Delta Ct$ ) de duas condições, é possível calcular a mudança de dobra na expressão ( $-\Delta\Delta Ct$ ).

### 5.1 Q-RT-PCR DE RNA DE PROTEÍNAS DO CLOROPLASTO DE TRIGO

Os valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  foram calculados para o gene e para suas condições experimentais e correspondem ao número de vezes em que a transcrição gênica aumentou ou diminuiu nas folhas de trigo em tratamentos da CD120 SN e SNI; CD104 SN e SNI em relação à condição controle (FIGURA 1, 2, 3, 4 e 5). Não foi encontrado um consenso sobre valores de *cut off* para as variações na expressão (*fold change*), embora alguns autores adotem a seguinte recomendação: valores acima de 2 indicam aumento e valores abaixo de 0,5, diminuição na expressão gênica.

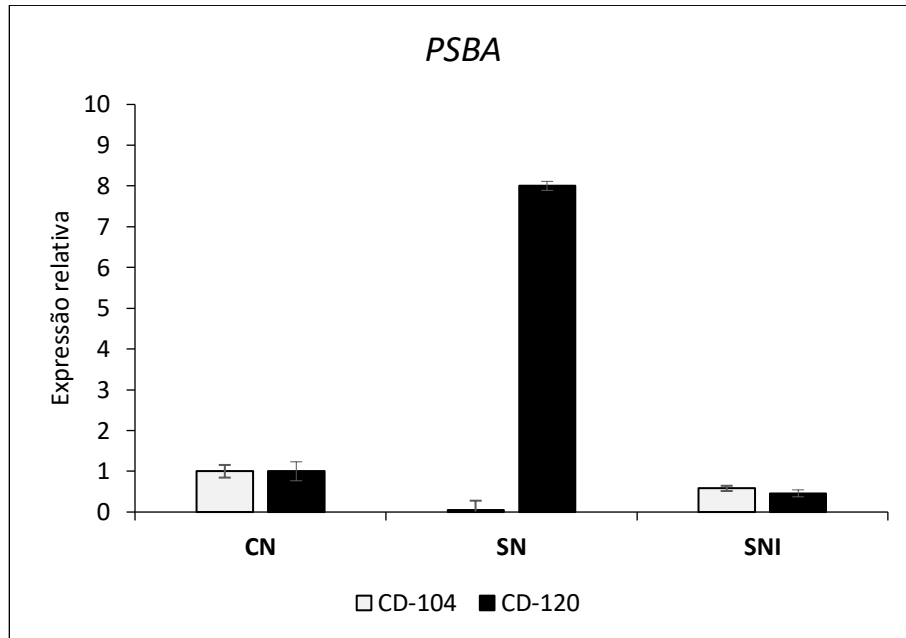
#### 5.1.1 Expressão do gene *PSBA* nas cv.s de trigo CD104 e CD120

De acordo com NEIVERTH-CHAGAS et al., 2020, foi identificado em seu estudo proteômico a proteína D1 do PSII (gene *PSBA*) como presente em todas as condições, tanto na cv. CD 104 quanto na cv. CD 120. Essa proteína está localizada no complexo de evolução de oxigênio (OEC) do PSII. Esse complexo central do PSII é composto pelas proteínas D1 e D2, as duas são principais na atividade de evolução do oxigênio que não é possível sem qualquer uma dessas subunidades. A proteína D1 constitui o núcleo do centro de reação PSII (ZHAO et al., 2011; CHEN et al., 2020), e muitos estudos indicaram que o centro PSII em cloroplastos é a parte que é mais facilmente danificada por estresses ambientais (CHEN et al., 2020).

Os resultados da avaliação quantitativa do RNAm mostram que a expressão do gene *PSBA* nas folhas das condições SNI CD104 e na cv. CD120 diminuiu em relação ao controle (Figura 1). O CD104 na condição SNI apresentou o mesmo resultado. Em contraste, o

tratamento SN CD120 apresentou expressão significativamente aumentada do gene *psba* em comparação com o controle. Enquanto a cv. CD104 na condição SN houve repressão significativa.

FIGURA 2 - EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE *PSBA*



Legenda: Dados quantitativos para o transcrito que leva a tradução da proteína D1 (gene *PSBA*) em folhas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CD104 e CD120, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose, com (CN) e sem (SN) adição de fontes de nitrogênio e, SN inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (SNI), mantidas em sala de crescimento a 24 ( $\pm$ 2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 20 dias a partir da inoculação. Os resultados são apresentados relativos aos respectivos controles (controle, 100%,  $n=4$ ). SN e SNI apresentaram valores significativamente diferentes. Fonte (o autor).

Com os resultados obtidos nesse trabalho, pudemos concluir que, apesar dos valores encontrados talvez não serem significativos no tratamento da cultivar CD104 nos tratamentos (SN e SNI), é possível observar um aumento na expressão desse transcrito em folhas da cultivar CD120 na condição SN. O que não está totalmente alinhado com os dados proteômicos, em especial quanto a repressão significativa do *PSBA* na cv. CD 104 na condição SN. Entretanto a ausência de expressão não implica o necessário desaparecimento da proteína.

*PSBA*, *PSBB* e *PSBD* são genes específicos do sistema PSII que codificam as proteínas D1, CP47 e D2 (SASI et al., 2018). A atividade do sistema PSII é limitada por vários estresses ambientais que afetam a síntese de proteínas necessárias para seu reparo e bom funcionamento. A expressão de *PSBA*, *PSB* e *PSBD* é reprimida em plantas de aveia em condições salinas, indicando danos ao sistema PSII (ALYAMMAHI et al., 2020), enquanto a aplicação de ácido

5-aminolevulínico (precurso da síntese de clorofila) aumenta a expressão de *PSBA* e *PSBD* em trigo sob condições de seca, indicando reparo de danos ao sistema PSII (WANG et al., 2018). Em nosso estudo, os níveis de expressão do gene *PSBA* são aumentados na cv. CD120 SN em comparação com o controle, o que indica reparo de danos PSII.

No geral, o aumento da expressão dos genes *Lhcb4.2*, *Lhcb6*, *PsbA*, *PsbB* e *PsbD* mostra um estabelecimento de fluxo consistente de elétrons e pode proteger a maquinaria fotossintética, melhorando assim a eficiência do sistema fotossintético. O que concorda com os dados de (NEIVERTH-CHAGAS, 2020) que demonstrou em dados de medidas de fluorescência de PSII onde a relação  $F_0/F_m$  é reduzida na cv. CD 104 na condição SN apenas, indicando estresse nutricional (KALAI et al., 2014).

Este resultado pode ser atribuído ao aumento da eficiência do transporte de elétrons em PSII e, portanto, à melhora na atividade do fotossistema em trigo, um mecanismo que ajuda as plantas a se adaptarem ao estresse externo. Assim é possível indicar uma possível tolerância de CD120 a ausência de N comparada ao CD104.

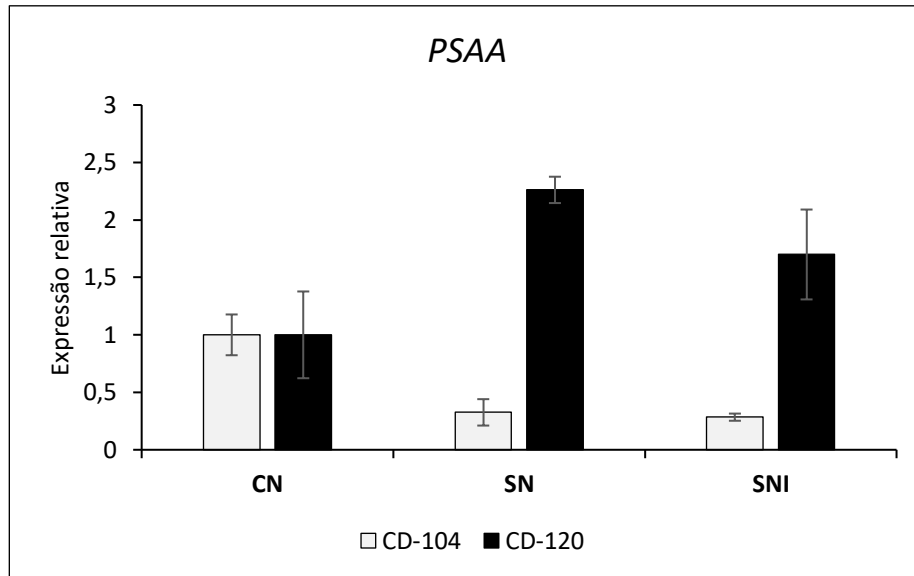
#### 5.1.2 Expressão do gene *PSAA* nas cv.s de trigo CD104 e CD120

NEIVERTH-CHAGAS, 2020, identificou a Apoproteína A1 (*PSAA*) associada a clorofila do PSI P700 como exclusivamente presente na condição SNI para o CD 104, isto é, não presente entre as proteínas das condições CN e SN; e na cv. CD120 CN e SN, isto é, proteína não estava presente na condição SNI na cv. CD120.

Cabe aqui a ressalva que ao buscar a sequência da proteína identificada (P58311) no banco de dados de genes preditos do blast (NCBI), estase alinhou com 99,99 % com uma ApoA1 de *Hordeum vulgare* e a partir dessa foi feito os estudos de definição do primer.

Os resultados sugerem que a expressão do transcrito para *PSAA* nas folhas do tratamento CD104 SN e SNI diminuiu significativamente em relação ao controle. Em contraste, nas folhas tratadas CD120 SN aumentou significativamente em comparação com o controle, enquanto a CD120 SNI aumentou, mas não estatisticamente comparado com o tratamento CD120 CN. Estes resultados não estão alinhados com os resultados proteômicos para a cv. CD 104 e cv. CD 120. Destacando que a análise proteômica realizada não atribuiu dados quantitativos, entretanto a qRT-PCR sim, desta forma é possível observar que a expressão dos transcritos.

FIGURA 3 - EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE *PSAA*



Legenda: Dados quantitativos para o transcrito que leva a tradução da Proteína apoproteína A1 (*PSAA*) da tilacóide do cloroplasto a PSI P700 em folhas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cv. CD104 e CD120, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose, com (CN) e sem (SN) adição de fontes de nitrogênio e, SN inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (SNI), mantidas em sala de crescimento a 24 ( $\pm 2$ ) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 20 dias a partir da inoculação. Os resultados são apresentados relativos aos respectivos controles (controle, 100%,  $n = 4$ ). Fonte (o autor).

Ainda não se sabe tudo sobre as partes estruturais e funcionalmente importantes dessa proteína. Segundo Massouh et al., (2016), o gene *PSAA* pertence aos chamados genes “classe I” nos quais as mutações são facilmente detectadas, pois levam a fenótipos brancos ou pálidos.

A biogênese do cloroplasto é um processo complexo que é fortemente regulado pela expressão coordenada de genes nucleares e plastidiais e fornece uma ligação entre o núcleo e o citoplasma. Há muitas evidências que mostram que o fenótipo variegado está intimamente relacionado ao nível reduzido de expressão do gene plastidial (CAMPOLI et al., 2019)

“*PSAA* e *PSAB* ligam P700, o doador primário de elétrons do fotossistema I (PSI), bem como os aceptores de elétrons A0, A1 e FX. O PSI é uma oxidoreductase plastocianina-ferredoxina, convertendo a excitação fotônica em uma separação de carga, que transfere um elétron do par de clorofila doador P700 para os aceptores caracterizados espectroscopicamente A0, A1, FX, FA e FB por sua vez. O P700 oxidado é reduzido no lado luminal da membrana tilacóide pela plastocianina” (BATEMAN et al., 2021).

Neste estudo, a expressão da cv. CD120 SN é aumentada com relação a CN, porém corrobora com os dados proteômicos no tecido do trigo. Porém a expressão do gene nessa cv. na condição SNI, não. Tampouco os dados da cv. CD 104 onde poderíamos esperar uma maior

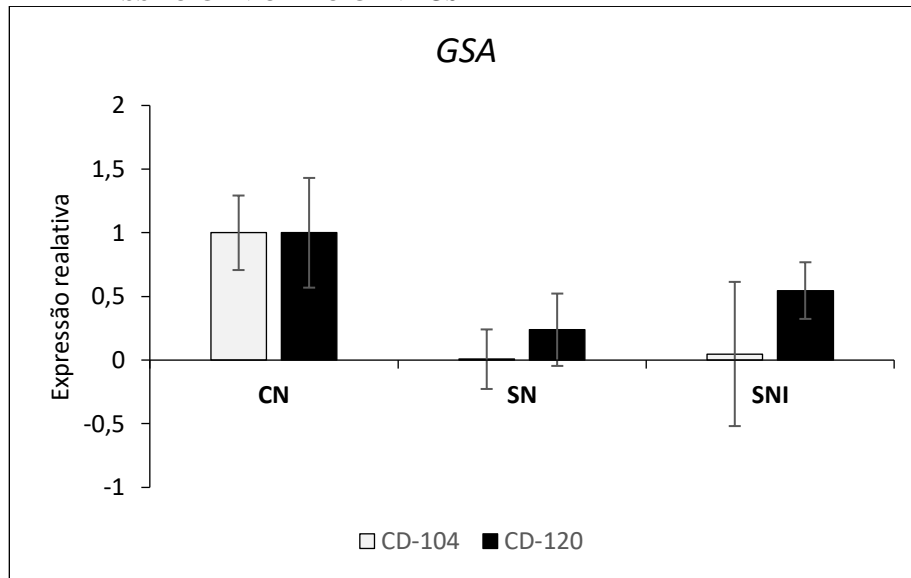
expressão desse gene na condição SNI, e repressão nas demais condições. De fato, se observa que repressão ocorre em SN comparada ao controle.

Um estudo realizado por (CANONGE et al., 2021; LOUDYA et al., 2021) sugerem fortemente que a formação e o desenvolvimento de cloroplastos requerem, como primeira etapa independente de luz, o acúmulo de alguns transcritos, proteínas e metabólitos essenciais dentro de proplastídeos indiferenciados. Esses elementos são essenciais para a formação das membranas tilacoides e dos complexos protéicos na percepção dos primeiros sinais luminosos. Durante o processo de androgênese do trigo, o aumento significativo nos níveis de expressão dos genes plastidiais *PSAA* e *PSBD*, e dos genes nucleares *FstZ*, *FtsH2*, *CHLH* e *PORA* que ocorre em suspensões de micrósporos de Pavon e Paledor entre D7 e D21 apresentaram se semelhantes os estudos, corroborando seus resultados. O aumento da expressão dos genes da fotossíntese *PSAA* pode estar ligado a um estabelecimento precoce dos primeiros constituintes do fotossistema.

### 5.1.3 Expressão do gene *GSA* nas cv.s de trigo CD104 e CD120

NEIVERTH-CHAGAS., 2020, identificou a Proteína Glutamato-1-semialdeído 2,1-aminomutase presente tanto na condição CN quanto em SNI da cv. CD120 e apenas na condição CN na cv. CD104. Essa é uma enzima que sintetiza o primeiro substrato na via de síntese da porfirina do HEME em mamíferos e da clorofila em plantas. Foi descrita como necessária para o reparo eficiente de PSII fotodanificado. Provavelmente contribuindo para maior eficiência do sistema fotossintético do CD 120 na condição inoculada (SNI) observada.

Os resultados de expressão dos transcritos de *GSA* concordam com o resultado da análise proteômica para a cv. CD104 pois, com relação à SN e SNI houve repressão significativa da expressão desse gene, apontando a sua presença apenas na CN para a síntese da *GSA*. Com relação a cv. CD 120 os resultados não apresentaram diferença estatística para qualquer afirmação, mas estão apontando para uma repressão da transcrição do gene em SN, o que concordaria com a ausência dessa proteína na condição e presença apenas na CN e SNI (Figura 4).

FIGURA 4 - EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE *GSA*

Legenda: Dados quantitativos para o transcrito que leva a tradução da Proteína Glutamato-1-semialdeído 2,1-aminomutase (*GSA*) em folhas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cv. CD104 e CD120, cultivadas in vitro em meio MS líquido sem adição de sacarose, com (CN) e sem (SN) adição de fontes de nitrogênio e, SN inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (SNI), mantidas em sala de crescimento a 24 ( $\pm 2$ ) C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 20 dias a partir da inoculação. Os resultados são apresentados relativos aos respectivos controles (controle, 100%,  $n = 4$ ). Fonte (o autor).

Em estudos como, de (CALZAVARA et al., 2018), observou que a deficiência de N diminuiu a concentração de moléculas orgânicas e inorgânicas de nitrogênio em quatro espécies vegetais, além de diminuir a atividade de enzimas envolvidas na assimilação de N (NRA e *GSA*). Da mesma forma, (LEMAÎTRE et al., 2008) em *Arabidopsis*, a limitação de N causou diminuição nos teores de  $\text{NO}_3^-$ , aminoácidos e N e diminuição de NRA, sem afetar o teor de  $\text{NH}_4^+$ . No entanto encontraram aumento de *GSA*, decorrente da remobilização de N (que libera  $\text{NH}_4^+$ ) induzida pela deficiência desse nutriente.

Em NEIVERTH-CHAGAS., 2020, foram observados efeitos benéficos da associação na cv. CD 120 onde os níveis de clorofila na SNI foram superiores na SN. Enquanto na cv. CD 104 foram semelhantes entre SNI e SN, porém e iguais na SNI da cv. CD 120.

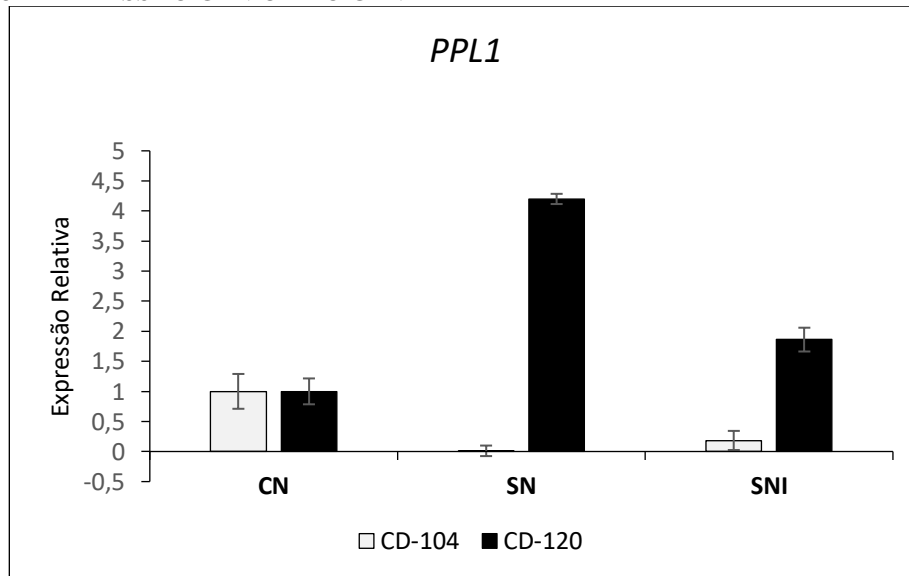
#### 5.1.4 Expressão do gene *PPL1* nas cv.s de trigo CD104 e CD120

No estudo realizado por NEIVERTH-CHAGAS., 2020, identificou a presença de uma Proteína 1 semelhante a PsbP cloroplástica (A0A3B6JED8), que por anotação foi identificada como *PPL1*, presente apenas no tratamento SN da cv. CD104 e SNI na cv. CD120. Essa

proteína, em seu estudo foi proposta como necessário para reparo eficiente de PSII fotodanificado, mas não fortemente associado ao complexo. Os dados de análise de fluorescência na cv. CD 104 indicam que as plantas desse tratamento estariam sofrendo danos no PSII, reflexo esse, do estresse causado pela ausência de N no meio de cultura.

Nossos resultados, ao contrário do que sugere a análise proteômica, que o transcrito de *PPL1* nas folhas tratadas SN na cv CD104 foi significativamente reprimido em relação ao controle CD 104 (Figura 5), e na SNI. Entretanto, com o tratamento SN e SNI CD120 a expressão do *PPL1* foi muito aumentada com relação à CN, em especial SN e não em SNI como se poderia esperar pelos dados proteômicos.

FIGURA 5 - EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE *PPL1*



Legenda: Dados quantitativos para o transcrito que leva a tradução da proteína 1 semelhante a PsbP em folhas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CD104 e CD120, cultivadas in vitro em meio MS líquido sem adição de sacarose, com (CN) e sem (SN) adição de fontes de nitrogênio e, SN inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (SNI), mantidas em sala de crescimento a 24 ( $\pm$ 2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 20 dias a partir da inoculação. Os resultados são apresentados relativos aos respectivos controles (controle, 100%,  $n = 4$ ). Fonte (o autor).

Proteínas, PPL1 e 2 do PSII estão envolvidos na resposta da fotossíntese em condições de estresse. Já foi relatado que um *ppl1* mutante de *Arabidopsis* foi mais sensível à luz de alta intensidade do que o tipo selvagem, e a recuperação da atividade do PSII após a fotoinibição foi atrasada em *ppl1* de plantas (ISHIHARA et al., 2007).

De fato, se observa que todas as expressões avaliadas para a cv. CD 104 foram inferiores ao controle, ou indicaram repressão dos genes pois apresentaram razão inferior a 0,5 quando comparados ao controle (CN).

Ao contrário a expressão avaliada para os mesmos genes foram ou igual ou superior a 1 em todas as condições (SN e SNI) comparadas a CN, exceto para a expressão de *GSA*.

## 6 CONCLUSÃO

É possível concluir que dos genes avaliados relacionados ao fotossistema I e II, e apresentam correlação menor em às presenças e ausências notadas das proteínas identificadas como em a relação entre PPL1 e *ppl1*.

A expressão avaliada para o gene *GSA* foi a que melhor se relacionou com os dados proteômicos.

Os estudos realizados confirmaram que os genótipos respondem diferentemente às mesmas condições.

Confirma-se ainda que os experimentos *in vitro* realizados existe atividade fotossintética após 21 dias de cultivo.

A partir dos expressos avaliados é possível indicar que ausência de nitrogênio (condições SN e SNI) para a cv. CD 104 são situações de estresse que levam a menor atividade de expressão dos genes relacionados a fotossíntese. Ao contrário da cv. CD 120, que aparentemente está mais ativa em nos fotossistemas e na sua recuperação.

## 7 REFERÊNCIAS

- AFZAL, I.; SHINWARI, Z. K.; SIKANDAR, S.; SHAHZAD, S. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. **Microbiological Research**, v. 221, p. 36–49, 2019.
- ALYAMMAHII, O.; GURURANI, M.A. Chlorophyll a fluorescence analysis reveals differential response of photosynthetic machinery in melatonin treated oat plants exposed to osmotic stress. *Agronomy* . 10, 1520, 2020.
- BARBAS III, C. F.; BURTON, D. R.; SCOTT, J. K.; SILVERMAN, G. J. Quantitation of DNA and RNA. **Cold Spring Harbor Protocols**, Bethesda, v. 1, n. 11, 2007.
- BATEMAN, Alex *et al.* UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D480–D489, 2021.
- BERTINI, Laura *et al.* Proteomic analysis of MeJa-induced defense responses in rice against wounding. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 10, p. 2525, 22 maio 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/20/10/2525>>.
- BERTUCCI, F.; BIRNBAUM, D.; GONÇALVES, A. Proteomics of breast cancer: principles and potential clinical applications. **Mol. Cell. Proteom.** v. 5, p. 1772-1786, 2006.
- BOREM, A.; SCHEEREN, P. L. Trigo: do plantio à colheita. **Embrapa Trigo-Livro técnico (INFOTECA-E)**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2015.
- BHARDWAJ, D. *et al.* Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2014. DOI: 10.1186/1475-2859-13-66. Disponível em: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-13-66>. Acesso em: 26 out. 2022.
- CALZAVARA, A.K.; PAIVA, P. H. G.; GABRIEL, L. C.; OLIVEIRA, A. L. M.; MILANI, K. S.; OLIVEIRA, H. C.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J. A.; OLIVEIRA, M. C. N.; DIAS-PEREIRA, J. STROLF-MOREIRA, R. Associative bacteria influence maize (*Zea mays* L.) growth, physiology and root anatomy under different nitrogen levels. *Plant Molecular Biology*. V. 20. P. 870-878, 2018.
- CAMILIOS-NETO, Doumit *et al.* Dual RNA-seq transcriptional analysis of wheat roots colonized by *Azospirillum brasilense* reveals up-regulation of nutrient acquisition and cell cycle genes. *BMC Genomics*, v. 15, n. 1, p. 378, 2014. Disponível em: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-15-378>. Acesso em: 06 de out. 2022
- CAMPOLI C, CAFARRIS S, SVENSSONv JT, BASSI R, STANCA AM, CATTIVELLI L, CROSATTI C. Parallel pigment and transcriptomic analysis of four barley albina and xantha mutants reveals the complex network of the chloroplast-dependent metabolism. *Plant Molecular Biology* 71(1–2):173–191, 2019.
- CANONGE J, PHILIPPOT M, LEBLANC C *et al.* Impedance flow cytometry allows the early prediction of embryo yields in wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore cultures. *Plant Science* 300:110586, 2020.
- ÇAKMAKÇI, R.; TURAN, M.; KITIR, N.; *et al.* The Role of Soil Beneficial Bacteria in Wheat Production: A Review. **Wheat Improvement, Management and Utilization**. p.116–149, 2017.
- CHEN, G.; Bi, Y.R.; Li, N. EGY1 encodes a membrane-associated and ATP-independent metalloprotease that is required for chloroplast development. **Journal of Plant Physiology**. 2005, 41, 364–375
- CHENG, Zhenyu; MCCONKEY, Brendan J.; GLICK, Bernard R. Proteomic studies of plant bacterial interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 42, n. 10, p. 1673–1684, out. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.05.033>>
- CHEN, J.H.; CHEN, S.T.; HE, N.Y.; WAN, Q. L.; ZHAO, Y.; GAO, W.; GUO, F.Q. Nuclear-encoded synthesis of the D1 subunit of photosystem II increases photosynthetic efficiency and crop yield. *Nature Plants* 2020, 6, 570–580.

CHEN, Y.E.; MAO, H.T.; WU, N.; MOHI UD DIN, A.; KHAN, A.; ZHANG, H.Y.; Yuan, S. Salicylic acid protects photosystem II by alleviating photoinhibition in *Arabidopsis thaliana* under high light. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 1229.

COLGRAVE, M. L.; GOSWAMI, H.; BYRNE, K.; BLUNDELL, M. et al. Proteomic profiling of 16 cereal grains and the application of targeted proteomics to detect wheat contamination. **Journal of Proteome Research**, 14, n. 6, p. 2659-2668, 2015. Article.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Trigo 2022**. 2022. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 06 de out. 2022.

CONAB. Acomp. safra brasileira de grãos. Brasília. v.9 - Safra 2021/22, n.5 - Quinto levantamento, p. 1-101, fevereiro 2022.

DI BENEDETTO, N. A.; CORBO, M. R.; CAMPANIELLO, D.; et al. The role of Plant Growth Promoting Bacteria in improving nitrogen use efficiency for sustainable crop production: a focus on wheat. **AIMS microbiology**, v. 3, n. 3, p. 413-434, 2017. AIMS Press.

FIEDLER, K. L.; MCGRATH, S. C.; CALLAHAN, J. H.; ROSS, M. M. Characterization of GrainSpecific Peptide Markers for the Detection of Gluten by Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 62, n. 25, p. 5835-5844, 2014/06/25 2014.

GEWIN, V. An underground revolution. **Nature**, v. 466, p. 552-553, 2010.

GHAWANA, S.; PAUL, A.; KUMAR, H.; KUMAR, A.; SINGH, H.; BHARDWAJ, P. K.; RANI, A.; SINGH, R. S.; RAIZADA, J.; SINGH, K.; KUMAR, S. An RNA isolation system for plant tissues rich in secondary metabolites. **BMC Research Notes**, London, v. 4, n. 85, 2011.

IBORT, P.; IMAI, H.; UEMURA, M.; AROCA, R. Proteomic analysis reveals that tomato interaction with plant growth promoting bacteria is highly determined by ethylene perception. **Journal of Plant Physiology**, v. 220, n. November 2017, p. 43-59, 2018. Elsevier.

ISHIHARA, S.; TAKABAYASHI, A.; IDO, K. et al. Distinct function for the two PsbP-like proteins PPL1 and PPL2 in the chloroplast thylakoid lumen. *Plant physiology*. P 668-679, 2007.

KALAI, H.M., SCHANSKER, G., LADLE, R.J. et al. Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues. *Photosynth Res* **122**, 121-158 (2014). <https://doi.org/10.1007/s11120-014-0024-6>

KLASSEN, G et al. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 43, n. 9, p. 887-891, 1 set. 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/m97-129>. Acesso em 06 de out. 2022.

LANDOLFI, V.; D'AURIA, G.; NICOLAI, M. A.; NITRIDE, C. et al. The effect of nitrogen fertilization on the expression of protein in wheat and tritordeum varieties using a proteomic approach. **Food Research International**, 148, p. 110617, 2021.

Leelavathi S, Bhardwaj A, Kumar S, Dass A, Pathak R, Pandey SS, Tripathy BC, Padmalatha KV, Dhandapani G, Kanakachari M, Solanke AU, Kumar PA, Cella R, Siva Reddy V. Genomewide transcriptome and proteome analyses of tobacco *psaA* and *psbA* deletion mutants. *Plant Molecular Biology* 76(3-5):407-423, 2011.

LEISTER, D. Chloroplast research in the genomic age. **Trends Genet.** 2003, 19, 47-56

Lekshmy, S., Jha, S.K. Selection of reference genes suitable for qRT-PCR expression profiling of biotic stress, nutrient deficiency and plant hormone responsive genes in bread wheat. *Ind J Plant Physiol.* 22, 101-106 (2017). <https://doi.org/10.1007/s40502-017-0282-3>

LEMAÎTRE, T.; GAUFICHON, L.; BOUTET-MERCEY, S.; CHRIST, A.; MASCLAUX-DAUBRESSE, C. Enzymatic and metabolic diagnostic of nitrogen deficiency in *Arabidopsis thaliana* Wassilewskija accession. *Planta Cell Physiol.* V, 49, p. 1056-1065, 2008.

- LOUDYA N, MISHRA P, TAKAHAGI K et al. Cellular and transcriptomic analyses reveal two-staged chloroplast biogenesis underpinning photosynthesis build-up in the wheat leaf. *Genome Biol* 22:151, 2021.
- MEHRI, N.; FOTOVAT, R.; MIRZAEI, M.; FARD, E. M. et al. Proteomic analysis of wheat contrasting genotypes reveals the interplay between primary metabolic and regulatory pathways in anthers under drought stress. *Journal of Proteomics*, 226, p. 103895, 2020.
- MELLO, N. **Inoculação de *Azospirillum brasilense* nas culturas de milho e trigo**. 2012, 98 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2012.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. **Brasil projeções do agronegócio 2018/19 a 2028/2029**. 10. ed. Brasília, DF, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/projecoes-do-agronegocio/projecoes-do-agronegocio-2018-2019-2028-2029>. Acesso em: 06 de out. 2022.
- MIRSKAYA, G. V.; KHOMYAKOV, Y. V.; RUSHINA, N. A.; et al. Plant Development of Early-Maturing Spring Wheat (*Triticum aestivum* L.) under Inoculation with *Bacillus* sp. V2026. *Plants*, v. 11, n. 14, 2022.
- MONTEIRO, R. A. et al. Herbaspirillum-plant interactions: Microscopical, histological and molecular aspects. *Plant and Soil*, v. 356, n. 1–2, p. 175–196, 2012. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-012-1125-7>. Acesso em: 03 dez. 2022.
- MOUTIA, J F Y et al. The role of diazotrophic bacteria in the nitrogen nutrition of sugar cane in Mauritius: Preliminary results. *AMAS - Food and Agricultural Research Council*, n. May 2003, p. 29±39, 2003.
- MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v. 15, n. 3, p. 473±497, jul. 1962. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>. Acesso em: 06 de out. 2022.
- NEHRA, V.; CHOUDHARY, M. A review on plant growth promoting rhizobacteria acting as bioinoculants and their biological approach towards the production of sustainable agriculture. , v. 9411, 2015.
- NEIVERTH, A. et al. Performance of different wheat genotypes inoculated with the plant growth promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae*. *European Journal of Soil Biology*, v. 64, p. 1–5, 2014.
- PEDROSA, F. O. et al. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. *Plos Genetics*, v. 7, n. 5, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002064>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1002064>. Acesso em: 03 dez. 2022.
- POGSON, B.J.; Albrecht, V. Genetic dissection of chloroplast biogenesis and development: An overview. *Plant Physiol*. 2011, 155, 1545–1551
- SALZMAN, R. A.; FUJITA, T.; ZHU-SALZMAN, K.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A. An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. *Plant Molecular Biology Reports*, Heidelberg, v. 17, p. 1117, 1999.
- SANTOS, Cristiane et al. Proteomic Analysis and Functional Validation of a Brassica oleracea Endochitinase Involved in Resistance to *Xanthomonas campestris*. *Frontiers in Plant Science*, v. n. April, 12 abr. 2019. <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2019.00414/full>>.
- SASI, S.; VENKATESH, J.; DANESHI, RF; GURURAN, MA. Photosystem ii extrinsic proteins and their putative role in abiotic stress tolerance in higher plants. *Plants*, 7, 100, 2018.
- SOARES, L. H. B. Tecnologias de Aplicação e Formulações: Estágio tecnológico da produção de inoculantes no país. **Anais da XIX RELARE**. 2018. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1098167/1/DOC3102019.pdf> Acesso em: 26 de out. 2022.

SPREITZER, R. J.; SALVUCCI, M. E. Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annual review of plant biology*. p. 449-475, 2002.

WANG, Y.; WEI, S.; WANG, J.; SU, X.; SUO, B.; QIN, F.; ZHAO, H. Exogenous application of 5-aminolevulinic acid on wheat seedlings under drought stress enhances the transcription of psbA and psbD genes and improves photosynthesis. *Brazilian journal of botany*, 41, 275–285, 2018.

WESTON, E.; Thorogood, K.; Vinti, G.; López-Juez, E. Light quantity controls leaf-cell and chloroplast development in *Arabidopsis thaliana* wild type and blue-light-perception mutants. **Planta**. P. 807–815, 2000.

ZHAO, H.J.; ZHAO, X.J.; MA, P.F.; WANG, Y.X.; HU, W.W.; LI, L.H.; ZHAO, Y.D. Effects of salicylic acid on protein kinase activity and chloroplast D1 protein degradation in wheat leaves subjected to heat and high light stress. *Acta Ecologica Sinica*. 2011, 31, 259–263.