



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
CURSO DE AGRONOMIA**

**AVALIAÇÃO DE LINHAGENS TRANSGÊNICAS DE *Nicotiana tabacum*
SUPEREXPRESSANDO UMA AQUAPORINA DE ORIGEM FÚNGICA PARA
TOLERÂNCIA A ESTRESSES ABIÓTICOS**

OTACÍLIO ANTÔNIO DE SOUZA NETO

**BRASÍLIA
2017**

OTACÍLIO ANTÔNIO DE SOUZA NETO

**AVALIAÇÃO DE LINHAGENS TRANSGÊNICAS DE *Nicotiana tabacum*
SUPEREXPRESSANDO UMA AQUAPORINA DE ORIGEM FÚNGICA PARA
TOLERÂNCIA A ESTRESSES ABIÓTICOS**

Monografia apresentada à Faculdade de Agronomia
e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília,
como parte das exigências do curso de Graduação
em Agronomia, para a obtenção do título de
Engenheiro Agrônomo

Orientador:
PROF. Dr. **FRANCISCO JOSÉ LIMA ARAGÃO**
Co-orientadora:
Dr^a. **MIRELLA PUPO SANTOS**

BRASÍLIA
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Souza Neto, Otacílio Antônio de.

Avaliação de linhagens transgênicas de *Nicotiana tabacum* superexpressando uma aquaporina de origem fúngica para tolerância a estresses abióticos / Otacílio Antônio de Souza Neto. Orientação: Francisco José Lima Aragão, Brasília, 2017.

Monografia – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2017.

93 p. : il.

Aquaporina. 2. Estresse hídrico. 3. Estresse abiótico. 4. Gene fúngico. 5. Plantas transgênicas. I. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária / Universidade de Brasília. II. Título.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

SOUZA NETO, O. A. **Avaliação de linhagens transgênicas de plantas de *Nicotiana tabacum* superexpressando uma aquaporina de origem fúngica para tolerância a estresses abióticos.** 2017. 93p. Monografia (Curso de Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: OTACÍLIO ANTÔNIO DE SOUZA NETO

AVALIAÇÃO DE LINHAGENS TRANSGÊNICAS DE *Nicotiana tabacum* SUPEREXPRESSANDO UMA AQUAPORINA DE ORIGEM FÚNGICA PARA TOLERÂNCIA A ESTRESSES ABIÓTICOS

GRAU: Bacharel

ANO: 2017

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia de graduação e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia de graduação pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor.

Autor: Otacílio Antônio de Souza Neto

Endereço: *Campus* Universitário Darcy Ribeiro, Brasília-DF

CEP: 70910-900

Telefone: +55 (61)3107-2676

OTACÍLIO ANTÔNIO DE SOUZA NETO

Avaliação de linhagens transgênicas de *Nicotiana tabacum* superexpressando uma aquaporina de origem fúngica para tolerância a estresses abióticos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, como parte das exigências do curso de Graduação em Agronomia, para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Aprovado em de de

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco José Lima Aragão
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)
Universidade de Brasília
Orientador

Prof^a Dr^a. Nara Oliveira Silva Souza
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária –
Universidade de Brasília
Examinador

Prof. Dr. Ricardo Carmona
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária –
Universidade de Brasília
Examinador

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, familiares e amigos

EXPRESSO AQUI, MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus.

Aos meus pais que não pouparam esforços para me apoiar e incentivar sempre a seguir em frente.

Aos meus familiares e amigos que sempre estiveram ao meu lado.

Ao Dr. Francisco José Lima Aragão, meu orientador, pela excelência científica, ensinamentos e disponibilidade.

À Dra. Mirella Pupo Santos, minha co-orientadora, pelas oportunidades, acompanhamento, ensinamentos, incentivo e apoio durante todo o período de trabalho.

Aos amigos da Universidade de Brasília, em especial, do curso de Agronomia: Bruna, Gabriel, Felipe, Henrique, Lennon, Maycon, Otávio, Thallisson e de todos os demais que não faltaram com apoio, companheirismo e pelo aprendizado adquirido.

Aos professores do curso de Agronomia da Universidade de Brasília, em especial, à professora Selma Regina Maggioto pelo apoio, conselhos, incentivo e paciência.

À *Universidad Nacional Del Sur* pela oportunidade e suporte durante período do intercâmbio e à Capes por viabilizar a experiência adquirida na universidade supracitada.

Ao CNPq por auxiliar na concretização da minha experiência na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e também por dar suporte ao desenvolvimento do presente objeto.

Aos colegas de laboratório da EMBRAPA-CENARGEM pelo apoio, paciência e ensinamentos.

À Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília pela oportunidade concedida para realização do Curso de Agronomia.

EPÍGRAFE

Não sabendo que era impossível, ele foi lá e fez.

Jean Cocteau

RESUMO

AVALIAÇÃO DE LINHAGENS TRANSGÊNICAS DE *Nicotiana tabacum* SUPEREXPRESSANDO UMA AQUAPORINA DE ORIGEM FÚNGICA PARA TOLERÂNCIA A ESTRESSES ABIÓTICOS

A agricultura é uma atividade extremamente dependente das condições ambientais e disponibilidade de água. A ocorrência de períodos de déficit hídrico é um dos principais responsáveis por perdas na produção. Diante disso, a obtenção de novas estratégias para a adaptação a esses cenários se faz necessária. A engenharia genética é um importante aliado nesse processo e possui diversos desafios. Dentre eles está a identificação de genes para uso em programas de melhoramento para resistência a estresses abióticos em plantas. As aquaporinas são importantes moduladores do transporte de água nas membranas celulares se mostram como potenciais agentes no aumento da tolerância de plantas a estresses abióticos. Com base nisso, o gene *ThAQP* foi isolado a partir de *Trichoderma harzianum* e inserido em plantas de *Nicotiana tabacum* através do uso de técnica de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Neste trabalho, as plantas selecionadas foram submetidas a um período de déficit hídrico, no qual diversos aspectos biométricos e fisiológicos foram aferidos. Os dados obtidos mostram que durante condições normais de disponibilidade de água, as linhagens transgênicas não demonstraram diferenças relacionadas a seu desenvolvimento quando comparadas ao controle. Porém, quando avaliadas sob estresse hídrico, observou-se que as plantas transformadas apresentaram maiores taxas de transpiração, condutância estomática, eficiência fotossintética e recuperação do potencial hídrico após re-irrigação mais rápida que as plantas controle. Os resultados observados indicam *Trichoderma harzianum* como uma fonte de genes com grande potencial para aplicação biotecnológica em programas de obtenção de plantas tolerantes a estresses hídricos.

Palavras-chave: Aquaporina, estresse hídrico, gene fúngico, plantas transgênicas, estresse abiótico

ABSTRACT

EVALUATION OF *Nicotiana tabacum* TRANSGENIC LINES OVEREXPRESSING AN AQUAPORINE OF FUNGAL ORIGIN FOR TOLERANCE TO ABIOTIC STRESSES

Agriculture is an activity extremely dependent on environmental conditions and water availability. The occurrence of periods of water deficit is one of the main factors responsible for production losses. Given this, new strategies for adaptation to these scenarios is demanded. Genetic engineering is an important tool in this process and it has several challenges. The identification of genes for use in breeding programs for resistance to abiotic stress in plants is among them. The aquaporins are important modulators of water transport in cell membranes and they are considered as potential agents in increasing the tolerance of plants to abiotic stresses. Based on this, the gene (*ThAQP*) was isolated from *Trichoderma harzianum* and inserted into plants of *Nicotiana tabacum* using *Agrobacterium tumefaciens*. In this work, the selected plants were subjected to a period of water deficit and many biometric and physiological aspects were measured. The data obtained shows that during normal conditions of water availability, the transgenic lines did not demonstrate differences related to its development when compared to the wild type. However, when evaluated under drought conditions, it was observed that the transgenic plants presented higher rates of transpiration, stomatal conductance, photosynthetic efficiency and faster recovery of the water potential after re-watering than wild type. The results indicate *Trichoderma harzianum* as a source of genes with great potential for biotechnological application in programs of obtainment of tolerant plants to drought stress.

Key words: Aquaporin, drought stress, fungal gene, transgenic plants, abiotic stress

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Produção global de cereais.....	23
Figura 2 – Representação esquemática do cassete de transformação.....	31
Figura 3 – Taxa fotossintética.....	33
Figura 4 – Concentração intercelular de gás carbônico.....	34
Figura 5 – Condutância estomática.....	35
Figura 6 – Taxa de transpiração.....	36
Figura 7 – Uso eficiente da água.....	37
Figura 8 – Potencial hídrico das folhas.....	38
Figura 9 – Teor relativo de água das folhas.....	39
Figura 10 – Massa fresca e seca da parte radicular.....	40
Figura 11 – Massa fresca e seca da parte aérea.....	40
Figura 12 – Comprimento da raiz principal e da porção aérea.....	41
Figura 13 – Conteúdo relativo de água no solo/ potencial hídrico na recuperação...	42
Figura 14 – Nível relativo de expressão do gene <i>ThAQP</i>	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EUA	Eficiência do uso da água
MF	Massa fresca
MS	Massa seca
MT	Massa túrgida
<i>PCR</i>	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEG	Polietileno-glicol
TRA	Teor relativo de água
<i>WT</i>	<i>Wild type</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

<i>A_n</i>	Taxa fotossintética
<i>E</i>	Evapotranspiração
<i>C_a</i>	Concentração de gás carbono na atmosfera
<i>C_i</i>	Concentração de gás carbono na cavidade subestomática
<i>C_c</i>	Concentração de gás carbono no estroma do cloroplasto
<i>g_s</i>	Condutância estomática
<i>g_m</i>	Condutância mesofílica
<i>E</i>	Evapotranspiração
Ψ_w	Potencial hídrico
<i>WT</i>	Wild type

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivos gerais	21
2.2	Objetivos específicos	21
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1	Agricultura	22
3.2	Déficit hídrico e a agricultura.....	23
3.3	Engenharia genética e sua contribuição	24
3.4	Aquaporinas	25
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	Local de realização do experimento.....	28
4.2	Teste de estresse hídrico	28
4.3	Conteúdo de água no solo	28
4.4	Potencial hídrico e teor relativo de água nas folhas (TRA)	28
4.5	Medições das trocas gasosas	29
4.6	Análises biométricas e reidratação	29
4.7	Análises estatísticas.....	29
5	RESULTADOS	31
5.1	Resultados anteriores	31
5.2	Resultados obtidos.....	32
6	DISCUSSÃO	43
7	CONCLUSÕES.....	47
8	PERSPECTIVAS	47
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
10	ANEXO	55

1 INTRODUÇÃO

O estresse hídrico é um dos maiores fatores abióticos que provocam perdas na produção de alimentos e confere uma das mais importantes limitações para expansão das áreas agrícolas em todo o mundo (BOYER, 1982; CHAVES & OLIVEIRA, 2004). O cenário de mudanças climáticas sugere que no futuro haverá aumento de eventos extremos em várias localidades do globo, incluindo períodos de seca prolongados (IPCC, 2001).

A ocorrência frequente de estresses hídricos e a conscientização a respeito do uso da água têm aumentado a pressão sobre o uso sustentável desse recurso. Com isso, a necessidade de otimização de uso do solvente universal se faz presente nos sistemas produtivos, seja pela adoção de culturas menos exigentes do ponto de vista hídrico e/ou por aumento da tolerância e eficiência quanto ao uso da água (MORISON et al., 2008).

O melhoramento genético convencional e o realizado por meio da engenharia genética tem resultado em enorme ganho de produtividade e aumento de tolerância a estresses bióticos e abióticos. A engenharia genética tem atribuído às culturas características que vão além da barreira natural do melhoramento convencional, por meio da introdução de gene (s) alvo (s), propiciando a obtenção de organismos geneticamente modificados que são menos exigentes e mais tolerantes a condições ambientais adversas (TESTER & LANGRIDGE, 2010).

Na tentativa de obtenção de plantas resistentes a estresses abióticos, alguns trabalhos com expressão de genes oriundos de *Trichoderma spp.* em plantas foram realizados. A inserção de um gene que confere a síntese da proteína de choque térmico *HSP70*, além do gene *Thkel1* de *Trichoderma harzianum* foram superexpressos em plantas de *Arabidopsis* e observou-se que as linhagens obtidas foram mais tolerantes ao calor, a estresses osmóticos, além de estresses salino e oxidativo (HERMOSA et al., 2011; MONTERO-BARRIENTOS et al., 2010).

Seguindo a ideia da necessidade de identificação de possíveis fontes de genes de interesse para uso em estratégias de melhoria na tolerância a estresses abióticos, através de técnicas da engenharia genética, Vieira et. al., (2013) observou que durante o processo de parasitismo do agente de controle biológico *Trichoderma*

harzianum em *Fusarium solani* (fungo fitopatogênico), um gene que codifica para uma aquaporina estava sendo altamente expresso durante todo o período de interação com o hospedeiro. As aquaporinas são proteínas que estão intimamente ligadas ao processo de regulação do transporte de água através das membranas celulares e desempenham função extremamente importante na manutenção osmótica das células (AGRE, 2004)

Nesse sentido, o presente trabalho deu continuidade no que foi descrito por Vieira (2014) e aferiu as características das plantas transgênicas de tabaco superexpressando o gene *ThAQP*, oriundo do fungo *Trichoderma harzianum*, sob condições de déficit hídrico. O experimento avaliou o potencial desse gene para uso em programas de melhoramento das plantas cultivadas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Este trabalho tem como objetivo realizar a avaliação de características morfofisiológicas de tolerância a estresse hídrico em linhagens transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) que superexpressam o gene *THQP1*, que codifica a síntese de uma aquaporina, oriunda do fungo *Trichoderma harzianum*.

2.2 Objetivos específicos

Realizar medições das trocas gasosas em plantas de tabaco.

Avaliar o potencial hídrico e teor relativo de água nas folhas durante o período de estresse.

Avaliar a variação do conteúdo de água no solo durante o estresse nas plantas *WT* e OGM.

Efetuar análises biométricas durante o período de estresse.

Observar a variação do potencial hídrico nas plantas durante a reidratação.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Agricultura

A agricultura é considerada um dos eventos mais importantes que propiciou uma mudança radical e estabelecimento das civilizações como são conhecidas. Nenhum outro evento teve impacto de tamanha importância na história humana (PÄÄBO, 1999). Este evento data de, aproximadamente, 10,000 anos atrás. A partir de tal acontecimento, a mudança do regime nômade para o sedentário, a produção e estocagem de alimentos, domesticação de animais e plantas e início da aparição das civilizações se tornaram possíveis (DIAMOND & BELLWOOD, 2003; DIAMOND, 2002).

Os avanços alcançados com o advento da agricultura proporcionaram o aumento populacional e conseqüentemente houve incremento significativo na demanda por alimento. Estima-se que em 2050 a população mundial ultrapasse a marca de 9 bilhões de pessoas (FAO, 2009) e para que a exigência de produção de alimentos seja atendida, o setor deverá apresentar crescimento médio de 38% ao ano. Essa realidade se mostra ainda mais desafiadora em um cenário em que a pressão das mudanças climáticas se mostra mais presente (TESTER & LANGRIDGE, 2010).

As variações climáticas ocorrem em resultado das dinâmicas atmosféricas e dos oceanos em resposta ao ciclo global de temperatura. Os fenômenos oriundos desses processos ocorrem naturalmente, embora a intensidade tenha aumentado com a ação antrópica. Oriundo disso, a ocorrência de períodos de seca mais graves em algumas regiões do mundo gerou a criação de conflitos e guerras. Apesar do conhecimento a respeito dessas dinâmicas, ainda não é possível o controle de tais processos (GRAYSON, 2013; IPCC, 2001).

Um outro desafio é que o melhoramento tradicional e os ganhos agronômicos, em média, alcançaram um incremento linear na produção mundial de alimento (Fig. 1) e para suprir a necessidade futura, o crescimento deve passar para o regime exponencial (TESTER & LANGRIDGE, 2010). Para atender essa projeção sem precedentes, há necessidade do advento de novas técnicas e estratégias para proporcionar ganhos expressivos de produção a nível mundial.

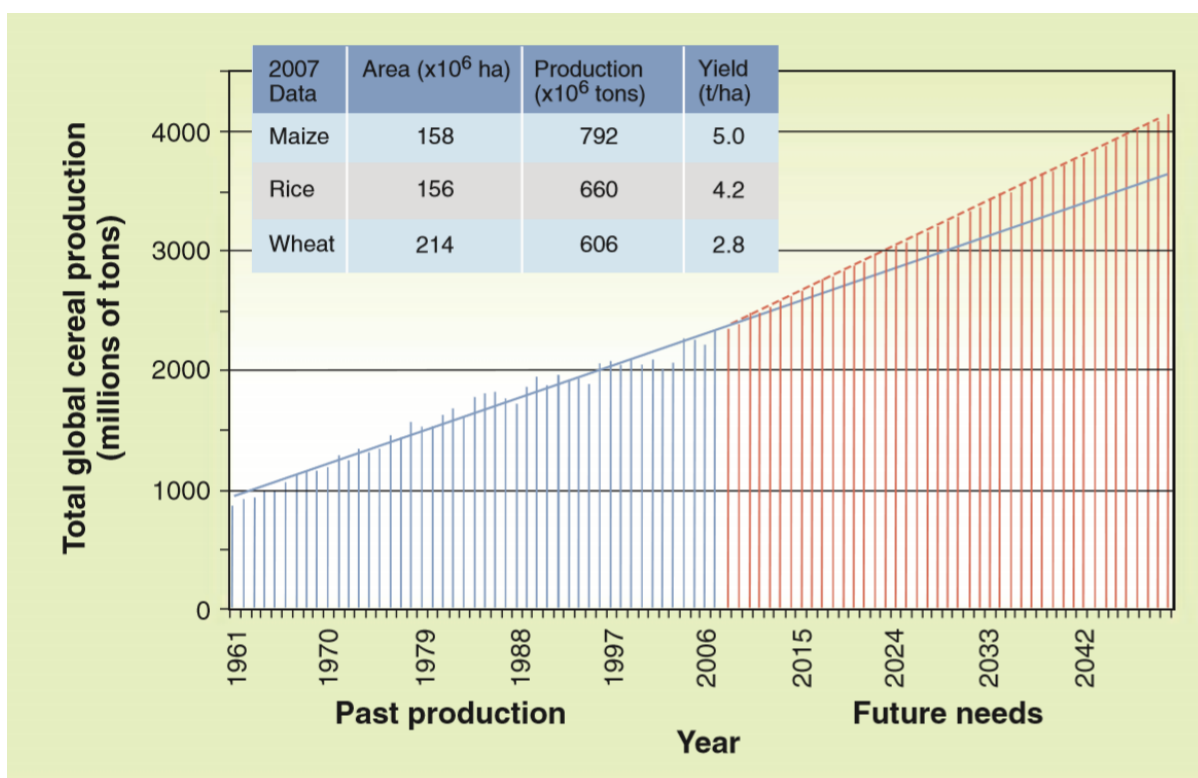


Figura 1. Representação do crescimento linear de produção de cereais dos últimos anos e projeção da necessidade futura (FAO, 2009).

3.2 Déficit hídrico e a agricultura

O estresse hídrico é um dos maiores fatores abióticos que provocam perdas na produção de alimentos e confere uma das mais importantes limitações para expansão das áreas agrícolas em todo o mundo (BOYER, 1982; CHAVES & OLIVEIRA, 2004). O cenário de mudanças climáticas sugere aumento da frequência de períodos prolongados de seca (IPCC, 2001).

A ocorrência frequente desses eventos e a conscientização a respeito do uso da água têm aumentado a pressão sobre o uso sustentável desse recurso. Estima-se que de toda a água potável no mundo, aproximadamente 70% do consumo seja feito pelos sistemas de produção agrícola (FAO, 2002). Visto isso, a necessidade de otimização do uso da água se faz presente nos sistemas produtivos (MORISON et al., 2008). Acredita-se que para aumento de 30% na produção mundial de alimentos,

considerando os sistemas de produção e materiais genéticos atuais, seria necessário o incremento de 100% no uso de água para irrigação (ROCKSTRÖM; LANNERSTAD; FALKENMARK, 2007)

Os estresses abióticos criados pelas mudanças climáticas, bem como a salinidade dos solos e deficiências nutricionais, promovem a redução do crescimento das plantas e impactam diretamente na produtividade dos cultivos (WITCOMBE et al., 2008; MORISON et al., 2008; WHITE & BROWN, 2010). Portanto, é necessário a obtenção de genótipos tolerantes a fim de minimizar as perdas na produção.

Plantas tolerantes ao estresse hídrico possuem algumas características que incluem rápida percepção do estresse e respostas de tolerância. Entre as respostas ao estresse está a limitação das perdas de água por meio do fechamento estomático e modulação da arquitetura radicular (CHAVES et al., 2002; CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009; FLEXAS et. al., 2006). Alguns genótipos tolerantes reduzem a condutância estomática, mas não limitam as trocas gasosas, o que é de extrema importância, pois mantém a taxa fotossintética e a perda de calor pela transpiração (POU et al., 2013; SCHULTZ, 2003).

3.3 Engenharia genética e sua contribuição

As aplicações de técnicas de engenharia genética têm propiciado o avanço em alguns setores da produção de alimento. A possibilidade de atribuir às culturas, de interesse agrônomo, características que vão além da barreira natural de melhoramento (obtenção de organismos geneticamente modificados) é uma grande promessa para sanar diversos problemas atuais e futuros (TESTER & LANGRIDGE, 2010).

A variação genética vinculada a eficiência fotossintética e transpiração tem direcionado os estudos para identificação de genes, que atuam no controle do eficiente uso da água, na expectativa de aplicação desse conhecimento em programas de melhoramento das plantas cultivadas. Atrelado ao fato de que os processos hidráulicos e bioquímicos são diversos, muitos genes e suas interações são os responsáveis por controlar as taxas fotossintéticas e fluxo hídrico nas plantas. Esses fatores corroboram a ideia de que esses genes estão diretamente

associados ao eficiente uso da água, principalmente em condições sob estresses abióticos (BRAMLEY; TURNER; SIDDIQUE 2013).

A adaptação de plantas a estresses abióticos é controlada por cascatas de eventos de sinalização que envolvem a percepção do estresse por meio de receptores de membrana, mensageiros celulares e genes responsáveis pela produção de fatores que irão participar de diversos mecanismos de defesa para a recuperação da homeostase celular. Diversas são as famílias de genes responsáveis por ativar esses mecanismos. (KHAN; AHMAD; ADIL KHAN, 2015). Entre estes podemos citar os genes responsáveis pela síntese de osmólitos protetores como a prolina, genes responsáveis pela síntese de enzimas antioxidantes e genes responsáveis pela síntese dos canais de água, as aquaporinas.

Na busca de fontes genéticas com grande potencial para aplicação na agricultura, constatou-se que genes oriundos de fungos do gênero *Trichoderma*, muito conhecidos por sua capacidade de colonizar diferentes substratos sob condições ambientais diversas e sua habilidade de atuar como controlador biológico de patógenos, se mostram como uma ferramenta importante para a obtenção de plantas transformadas expressando características de resistência a estresses bióticos e abióticos. Hermosa et. al., (2011) e Montero-Barrientos et al., (2010) realizaram trabalhos que exploraram alguns desses genes em distintos bioensaios e diferentes modelos de plantas

3.4 Aquaporinas

A importância do conhecimento sobre o movimento da água nos organismos vivos levou a intensificação dos estudos na área para entendimento a respeito do transporte através das membranas celulares. Até a década de 1990, acreditava-se que a entrada de água nas células era por meio da passagem dessas moléculas através das camadas duplas de fosfolipídios das membranas celulares. Até que acidentalmente, Peter Agre, descobriu estruturas proteicas nas membranas que se mostravam ferramentas de extrema importância para transporte de moléculas de água. Deu-se o nome a esse grupo de aminoácidos de aquaporinas (AGRE, 2004).

Esse grupo de aminoácidos é pertencente à família das proteínas intrínsecas de membrana que auxiliam no transporte bidirecional de água através das membranas celulares biológicas. Entretanto, foi observado que além das moléculas de água, outras substâncias como de amônia, glicerol, ácido bórico, ácido salicílico, dióxido de carbono e ácido arsênico também podem ser transportadas (BIENERT, et.al., 2008; TANAKA, et. al., 2008; MAUREL, et. al., 2009). Esses canais desempenham funções fundamentais nas plantas, especialmente sob condições de adaptabilidade em ambientes adversos, que estão cada vez mais presentes, em resposta das variações climáticas observadas ao longo dos anos e sua intensificação observada nos eventos recentes (LUU & MAUREL, 2005; MARTÍNEZ-BALLESTA, et al., 2006).

As aquaporinas classificadas em 5 famílias de acordo com sua sequência de aminoácidos e localização na membrana: PIPs, proteínas de membrana plasmática; TIPs, proteínas do tonoplasto; NIPs, nodulin-26-like; SIPs, proteínas pequenas e básicas de membrana; e XIPs, proteínas intrínsecas não caracterizadas. Sabendo dessas informações e juntamente com estratégias adequadas, a genética reversa e superexpressão dessas proteínas são ferramentas eficientes em plantas, para estudo sobre funções fisiológicas de cada isoforma dessas proteínas e para entendimento de suas atuações no transporte de água e respostas à estresses abióticos (HUSSAIN; IQBAL; ARIF, 2011).

Há variação de expressão dos genes que conferem a síntese de aquaporinas nas diferentes partes das plantas, mas observou-se uma tendência dessas proteínas estarem concentradas em células e tecidos que estão vinculados a elevada dependência de regulação osmótica e de fluxo de água (MAUREL, 1997), sendo que a maioria das isoformas são expressas nas raízes (BRAMLEY et. al., 2007).

Em condições de estresse abiótico, como déficit hídrico, o fechamento estomático é considerado como a primeira ação que as plantas desempenham para preservação da água. Porém, o nível de produtividade é dependente de elevadas taxas de transpiração e crescimento foliar (condições mais propícias a ocorrência de processos fotossintéticos). Embora a sinergia entre diversos fatores seja requerida para que o desenvolvimento do organismo aconteça de forma plena, como o ótimo

balanço entre o *status* hídrico, captação de nutrientes, transpiração e taxa fotossintética (COLLINS; TARDIEU; TUBEROSA, 2008) e etc.

A otimização da absorção de água pelas raízes é um dos mecanismos mais importantes que as plantas utilizam para manter seu conteúdo de água sob estresse hídrico e as aquaporinas estão diretamente relacionadas com a condutividade hidráulica que afeta a habilidade de captação desse recurso. Foi sugerido que o incremento de dióxido de carbono e o uso eficiente da água são as estratégias mais eficazes para atribuir às plantas capacidade de lidar com os estresses. O fato de que algumas aquaporinas apresentam capacidade de transporte tanto de água quanto de dióxido de carbono, com condicionamento fino da osmorregulação durante condições de estresse, as tornaram foco de diversas pesquisas devido ao grande potencial de uso para resolução de problemas ainda fortemente presentes (JAVOT & MAUREL, 2002).

Recentemente foi reportada a identificação de um gene de *Trichoderma harzianum*, codificando uma aquaporina durante o biocontrole sobre *Fusarium solani*, que possui grande potencial para aplicações biotecnológicas. O potencial de utilização dessa tecnologia se mostra com grande importância (VIEIRA et al., 2013).

O trabalho aqui realizado é uma continuação do descrito por Vieira (2014), onde ocorreu a obtenção de plantas transgênicas de tabaco, supreexpressando o gene *ThAQP*, através da aplicação de técnicas de transformação vegetal mediada por bactérias pertencentes à espécie *Agrobacterium tumefaciens* possuidoras dos genes de interesse.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de realização do experimento

O experimento foi instalado em casa de vegetação localizada nas dependências da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Os vasos com solo foram colocados em bancadas suspensas (1 metro de altura), onde grande parte do experimento foi conduzido.

4.2 Teste de estresse hídrico

As quatro melhores linhagens transgênicas (T7, T24, T25, T51) foram selecionadas para o experimento de estresse hídrico. Sementes das linhagens transgênicas T2 e controle foram semeadas em bandejas de isopor. Após a germinação e desenvolvimento das plântulas, aplicou-se glufosinato de amônio (PESTANAL[®]) para seleção das plantas transformadas. Estas foram transplantadas para vasos plásticos (8L) contendo solo corrigido para atender as necessidades de fertilidade da cultura. Cresceram por aproximadamente 70 dias em casa de vegetação sob condições controladas (28 ± 2 °C) e com irrigação diária. Após esse período, a irrigação foi suspensa atribuindo às plantas a condição de estresse hídrico. Foram utilizadas 40 plantas de cada linhagem, sendo 10 repetições por análise feita. Os parâmetros de taxa fotossintética, condutância estomática, transpiração, potencial hídrico e conteúdo de água nas folhas foram aferidos. A massa da parte aérea e do sistema radicular também foi medida. As análises foram realizadas a cada três dias, exceto pela análise biométrica que foi conduzida no último dia.

4.3 Conteúdo de água no solo

A condição hídrica do solo foi monitorada durante todo o período do experimento através do uso de um tensiômetro manual.

4.4 Potencial hídrico e teor relativo de água nas folhas (TRA)

O potencial hídrico das folhas (Ψ_w) foi aferido diariamente entre 8 e 10 horas da manhã, em folhas totalmente expandidas e fotossinteticamente ativas, usando uma câmara de pressão do tipo *Scholander* (SAPSII modelo 3115). O teor relativo

de água (TRA) foi determinado com a utilização de quatro discos foliares (2cm²). A massa fresca (MF) foi aferida em uma balança de precisão. A massa túrgida (MT) foi realizada por meio do uso de amostras de folhas mantidas em água destilada por 48h sob temperatura ambiente e local escuro. A massa seca (MS) foi obtida após amostras serem colocadas em estufa com temperatura mantida em 70°C por 48h. O teor relativo de água foi calculado através da aplicação da seguinte fórmula: TRA (%) = [(MF – MS)/(MT – MS)] x 100.

4.5 Medições das trocas gasosas

A taxa fotossintética líquida (A_n) ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), condutância estomática (g_s) ($\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), taxa de transpiração (E) ($\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) e concentração de CO₂ intercelular (C_i) foram aferidos utilizando-se de um equipamento de análise infravermelha de gases (IRGA) (modelo LC-Pro SD). As avaliações foram realizadas durante o período da manhã (entre as 8 e 10 horas), com temperatura no interior da câmara das folhas de $25.0 \pm 0.8^\circ\text{C}$ e déficit de pressão de vapor folha-ar de 1.7 ± 0.2 KPa. A leitura foi feita com uma fonte de luz LED sob um DFFA de $650 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. Os valores médios de umidade relativa e ambiente (CO₂) na câmara foram 70% e $350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-1}$, respectivamente. A eficiência instantânea do uso da água pela folha (EUA) foi definida como a razão entre a taxa de A_n / E (SINCLEAR et al, 1984).

4.6 Análises biométricas e reidratação

Após nove dias de suspensão da irrigação, o comprimento da parte aérea e das raízes foi medido, assim como o peso fresco das plantas transgênicas e não transgênicas (controle). O peso seco foi aferido após deixar as amostras de peso fresco em estufa por 72h sob temperatura de 70°C. Plantas sob estresse foram submetidas à irrigação novamente e a recuperação foi observada através da medição (4) do potencial hídrico das folhas, com intervalos de 1 hora, usando uma câmara de pressão do tipo *Scholander* (SAPSII model 3115).

4.7 Análises estatísticas

O experimento foi instalado em delineamento em blocos casualizados (RBD) (com dez repetições para cada tratamento. A avaliação estatística foi realizada usando o *software* Prisma 5.0 para Mac OSX. O teste *t-Student* foi utilizado para

comparação das médias, que foram consideradas significativas a $P < 0.05$. Two-way ANOVA usando o teste de Tukey de intervalos múltiplos ($p \leq 0.05$) também foi utilizado.

5 RESULTADOS

5.1 Resultados anteriores

Inicialmente a obtenção da sequência genética da aquaporina (*ThAQP*) oriunda de *Thricoderma harzianum* foi através da síntese química (feita pela empresa *Epoch Life Science, Inc*) com uso de códons de *Arabidopsis* e clonado sob controle do promotor 35S (advindo do *Cauliflower mosaic virus*). As plantas transgênicas foram obtidas por meio da transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (HORSH et. al., 1985) cepa EHA105, possuidora do plasmídeo vetor pCAMBIA3300-Aqua (Fig.2A) em que estava inserido o gene *bar* codificando *phosphinothricin acetyltransferase* (PAT) como agente seletor. A inserção do vetor na bactéria foi realizada por meio da técnica de eletroporação (VIEIRA, 2014).

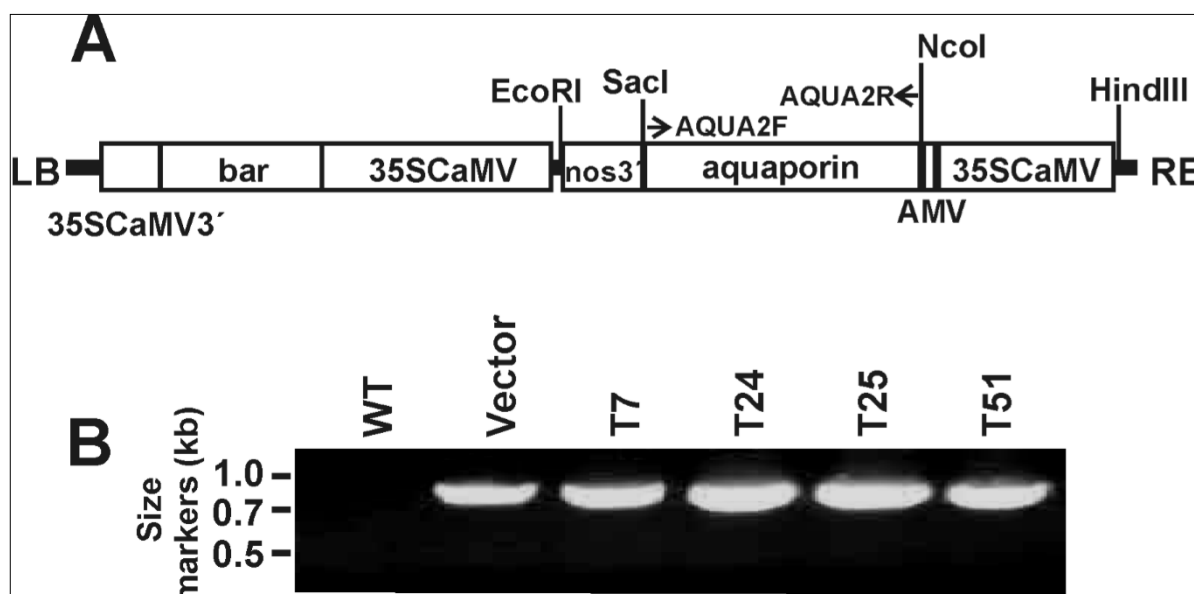


Figura 2. Cassete construído para obtenção das plantas transgênicas utilizadas para o experimento descrito neste trabalho. Observa-se a presença do gene de interesse (região "aquaporin"), os promotores, os sítios de atuação de enzimas de restrição e o gene "bar" que confere resistência ao agente seletivo (A). As plantas foram analisadas através de PCR para detecção do gene *ThAQP*. A PCR foi feita com plantas não transgênicas (WT), com o plasmídeo vetor (Pc3300-Aqua) e com as linhagens transgênicas (T7, T24, T25 e T51).

Ao todo, 90 linhagens transgênicas foram geradas (T₀). Essas plantas foram conduzidas em casa de vegetação e autopolinizadas para produção de sementes

(T₁). A presença do gene de interesse foi confirmada através de análises de *PCR* (VIEIRA, 2014).

As sementes da geração T₁ foram submetidas a testes para aferir o potencial desses organismos a condições de estresses salino e osmótico. Para isso, as sementes foram colocadas para germinação em meio MS líquido contendo 100mM de NaCl, 300mM de NaCl ou 20% de PEG. Não foram observadas diferenças entre as respostas das linhagens transgênicas e o controle sob a concentração mais baixa de NaCl. Entretanto, as sementes transgênicas expostas a 300mM de NaCl apresentaram atraso significativo no tempo de germinação quando comparadas ao controle. Ao serem submetidas ao tratamento com PEG a 20% todas as linhagens, inclusive o controle, apresentaram redução severa na germinação. Observou-se que sob os tratamentos de NaCl a 300mM e PEG a 20%, em que as sementes do controle não germinaram ou que as plântulas não se desenvolveram, algumas linhagens transformadas (T7, T24, T25 e T51) apresentaram respostas promissoras. Representantes dessas linhagens foram retirados das condições de estresse e conduzidos para produzirem sementes (T₂). Esta foi a geração utilizada para realização do experimento de estresse hídrico descrito neste trabalho.

5.2 Resultados obtidos

As linhagens selecionadas nos testes prévios (além do controle) foram conduzidas em casa de vegetação por 70 dias, momento este em que houve a suspensão da irrigação. As plantas não receberam água durante um período de nove dias consecutivos e, no décimo dia de testes, a irrigação foi retomada para observação do processo de recuperação das plantas.

As análises foram feitas no terceiro, sexto e nono dias do período de estresse. Parâmetros biométricos e fisiológicos foram analisados para caracterização dessas plantas. Valores de taxa fotossintética (A_n), condutância estomática (g_s) e taxa de transpiração (E) foram avaliados. A massa seca, massa fresca e comprimento das partes aérea e radicular também foram aferidos.

Na ausência de estresse hídrico não foi observada diferenças no desenvolvimento entre as linhagens transgênicas e o controle. Porém, sob condições de déficit hídrico, as linhagens T7, T24 e T51 apresentaram valores superiores de taxa fotossintética, quando comparadas ao controle (Fig. 3), no terceiro e sexto dia de análises. É possível observar claramente, no nono dia, que todas as linhagens transformadas se mostraram melhores que o controle (WT). Este apresentou taxa fotossintética inferior a zero, fato este sugerindo ocorrência de processos respiratórios.

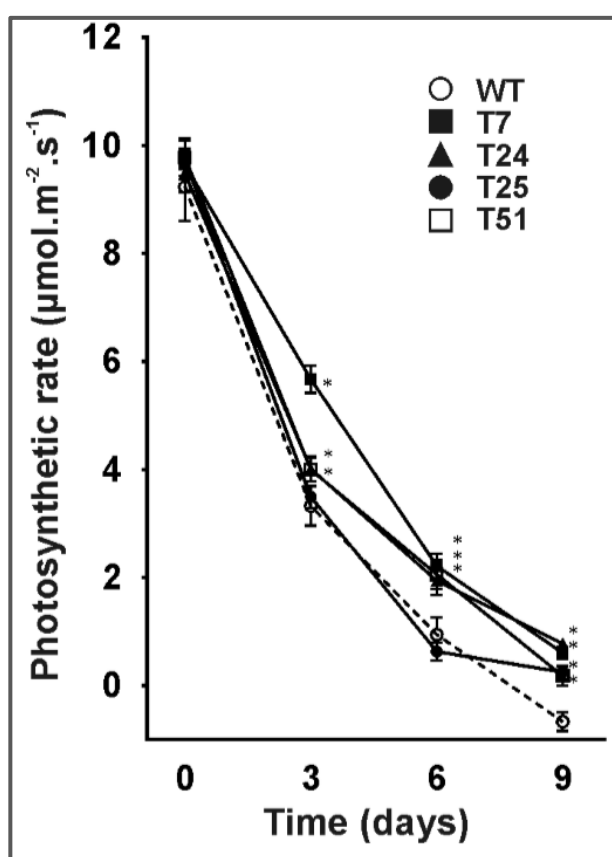


Figura 3. Valores de taxa fotossintética (A_n), obtida durante os três dias de análise do experimento, das linhagens transgênicas (T7, T24, T25 e T51) e do controle (WT). As barras representam $\pm\text{DP}$. * $P < 0.05$, $n = 10$.

De acordo com a figura acima, a linhagem T7 apresentou os melhores resultados. No terceiro dia de estresse, observou-se valores em torno de $6 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ para essa linhagem, enquanto as demais mostraram valores em torno de $4 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, embora tenha se aproximado dos resultados das outras linhagens nos dias seguintes, mas sempre com números superiores aos do controle.

No primeiro dia de análise, somente duas linhagens transformadas (T7 e T24) apresentaram diferença estatística na concentração intercelular de CO_2 (C_i) em relação ao controle (Fig. 4). Esse número aumentou para três no segundo dia de análise (T7, T24 e T51). As plantas *WT* mantiveram os maiores valores de C_i durante todo o período de estresse. Os resultados mais expressivos foram observados no nono dia de estresse em que todas as linhagens transgênicas apresentaram valores inferiores e diferença estatística quando comparadas ao controle.

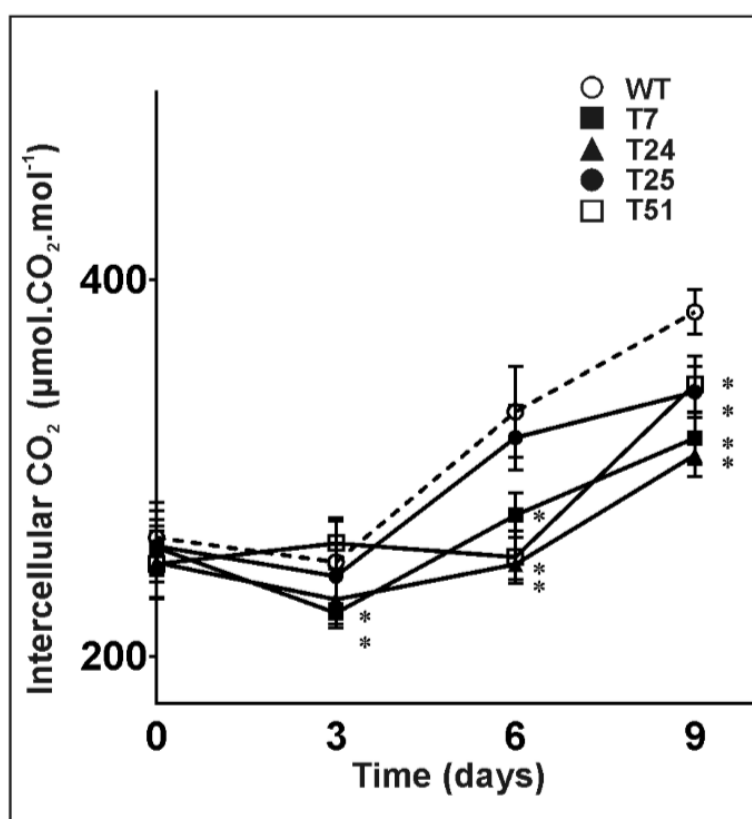


Figura 4. Representação dos valores de concentração intercelular de CO_2 (C_i) obtidos nos dias de análise das plantas transgênicas (T7, T24, T25 e T51) e não transgênicas (*WT*) sob estresse. As barras representam $\pm\text{DP}$. * $P < 0.05$, $n = 10$.

As análises de condutância estomática (g_s) mostraram que no terceiro dia de estresse as linhagens T7 e T51 apresentaram valores em torno de $0.05 \text{ mol.H}_2\text{O.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, enquanto que a *WT* indicava valor pouco superior a $0.025 \text{ mol.H}_2\text{O.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, ou seja, praticamente metade do valor. Nos dias seguintes de análises, as linhagens supracitadas mantiveram seu bom desempenho, sendo que a T7 nitidamente foi destaque no sexto dia de estresse (Fig. 5).

As linhagens que tiveram melhores resultados de condutância estomática foram a T7 e T51. Estas linhagens mostraram-se com maior g_s em todos os dias de análises sob estresse hídrico, apresentando diferença estatística em seus resultados quando comparados com a *WT*. No nono dia de estresse, a linhagem T24 se juntou a esse grupo, também explicitando bons resultados. Somente a linhagem T25 apresentou muita semelhança com as plantas controle, sendo que, no último dia de estresse, se aproximaram de valores de condutâncias próximos a zero. Os dados estão representados na figura abaixo:

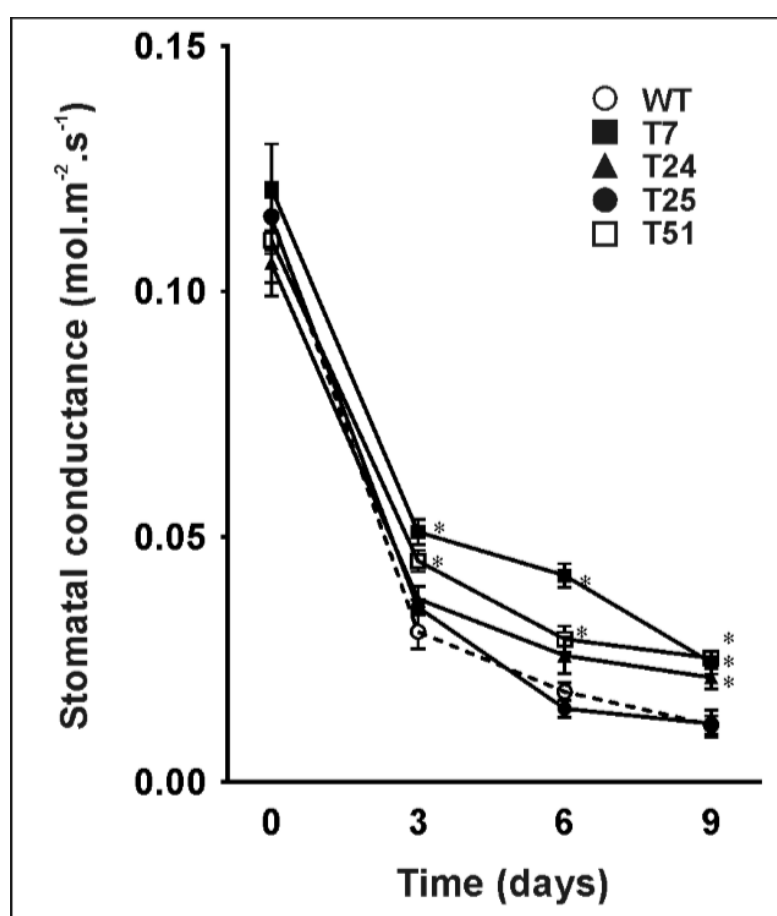


Figura 5. Representação dos valores de condutância estomática (g_s) observados nas linhagens plantas transgênicas (T7, T24, T25 e T51) e não transgênicas (*WT*) sob estresse. As barras representam \pm DP. * $P < 0.05$, $n = 10$.

Os elevados valores observados de concentração intercelular de gás carbônico associados à baixa taxa de condutância estomática nas plantas *WT* indicam limitação nas taxas de assimilação de gás carbônico.

As taxas de transpiração observadas mostram que, no terceiro dia de estresse, todas as linhagens transgênicas tiveram desempenho superior em relação a *WT*, sendo que somente as plantas T7, T24 e T51 continuaram com essa diferença no sexto dia (Fig. 6). As diferenças estatísticas observadas, nos dias iniciais, se extinguíram no nono dia de análise, onde todas as linhagens tiveram resultados similares.

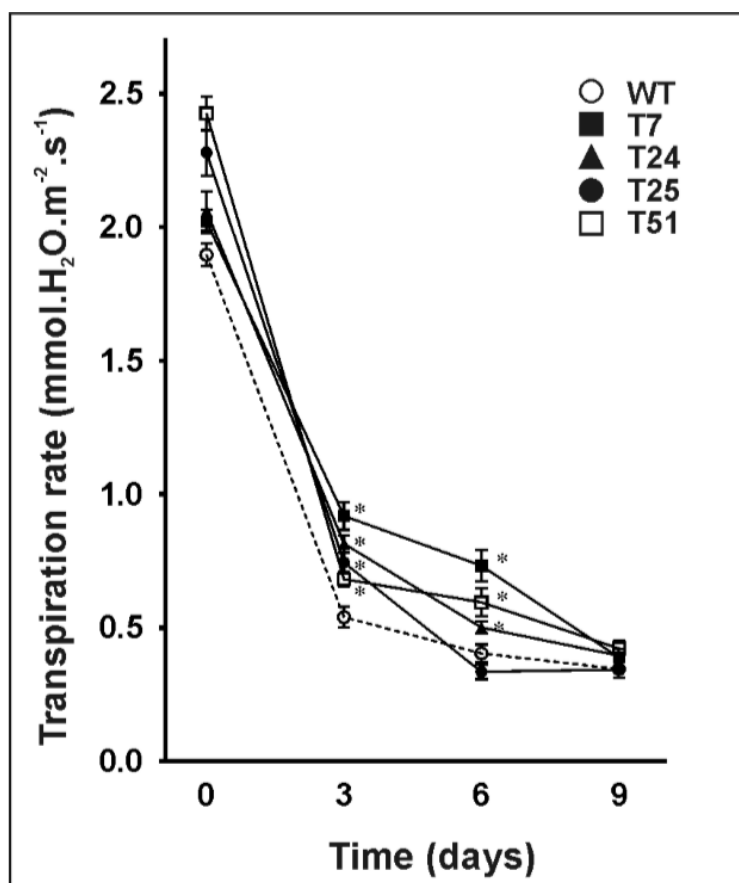


Figura 6. Valores obtidos de taxa de transpiração observados nas linhagens transgênicas (T7, T24, T25 e T51) e não transgênicas (*WT*) durante o período de análises. As barras representam \pm DP. * $P < 0.05$, $n = 10$.

A razão entre a taxa fotossintética (A_n) e a taxa transpirativa (E) resultam em valores de eficiência instantânea do uso da água pela folha (EUA) (SINCLEAR; TANNER, BENNET, 1984), e auxiliam na interpretação do desempenho dos objetos aqui analisados. A figura 7 demonstra que no terceiro dia de estresse, as linhagens T7 e T51 tiveram maiores valores e não apresentaram diferença estatística entre si, porém, quando comparadas ao controle, constata-se o inverso dessa relação. No sexto dia, as linhagens T7, T51 e T24 se destacam e no ultimo dia sob estresse,

todas as linhagens transgênicas apresentaram melhores resultados que a *WT*, sendo que nesse momento, a *WT* apresentou valor negativo de EUA. A linhagem T25 apresentou diferença estatística no dia 3 e 6 de análises, mas com eficiência inferior a todas as demais linhagens, inclusive a *WT*. Entretanto, teve melhor performance no último dia sob estresse em relação ao controle.

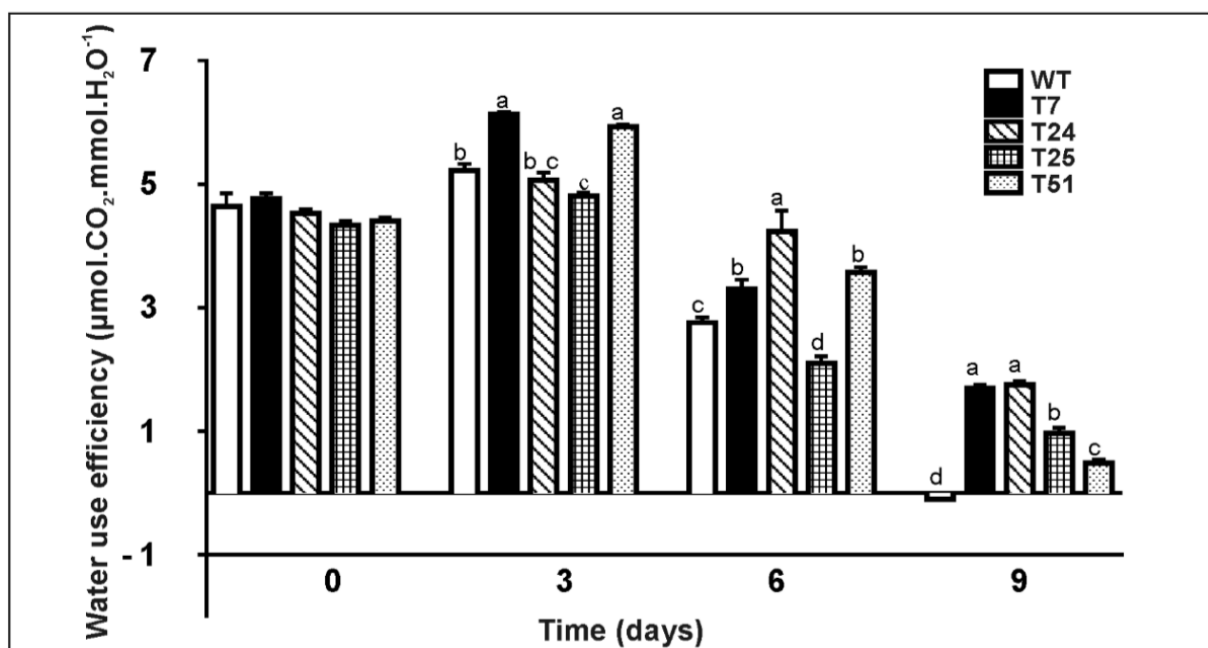


Figura 7. Dados de eficiência instantânea do uso da água pela folha (EUA) obtida através da razão An / E obtidos das plantas transgênicas (T7, T24, T25 e T51) e não transgênicas (*WT*) nos dias de análise sob condições de estresse hídrico. As barras representam $\pm DP$. Colunas com a mesma letra não são estatisticamente diferentes. $P < 0.05$, $n = 10$.

Observou-se que no sexto dia de estresse hídrico as plantas *WT* estavam com potencial hídrico foliar (Ψ_w) em torno de -1,5 Mpa enquanto as linhagens transgênicas T7, T24 e T51 apresentavam valores próximos a -1,0 Mpa. Essa diferença tornou-se mais nítida no nono dia sob estresse, quando as plantas *WT* se tiveram valores de Ψ_w em torno de -2,5 Mpa e as linhagens T7, T24 e T51 com resultados ao redor de -1.5 Mpa. Apesar da T25 ter sido a única linhagem transgênica a apresentar diferença estatística no primeiro dia de análises sob estresse (quando comparada as plantas controle), nos dias subsequentes de análises (sexto e nono dias sob estresse hídrico), seus resultados se aproximaram da *WT* e não foi observada diferença estatística nesses últimos dias. Realidade oposta à observada nas demais linhagens transgênicas.

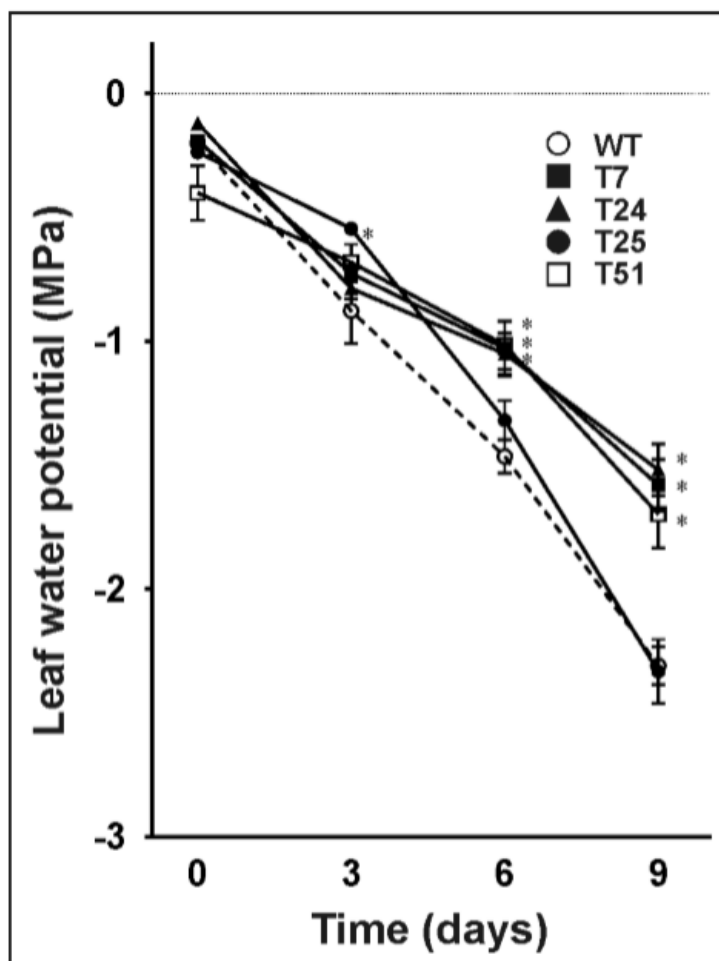


Figura 8. Potencial hídrico (Ψ_w) das folhas analisado durante o período do experimento de restrição hídrica das plantas transgênicas (T7, T24, T25 e T51) e não transgênicas (WT). As barras representam \pm DP. * $P < 0.05$, $n = 10$.

O teor relativo de água das folhas (TRA) observado no terceiro dia do período sob restrição hídrica indica somente diferença estatística nos valores da linhagem T25, com valores superiores a 80%, enquanto as demais linhagens, inclusive o controle, apresentaram percentual inferior a esse valor (Fig. 9). As linhagens T7 e T24 tiveram menor redução do TRA do terceiro para o sexto dia, e nesse momento apresentam diferença estatística em seus resultados, quando comparados ao controle. No segundo dia de análises sob estresse, as plantas WT estavam com TRA inferior a 60%, enquanto que as linhagens T7 e T24 apresentavam valores acima de 70%.

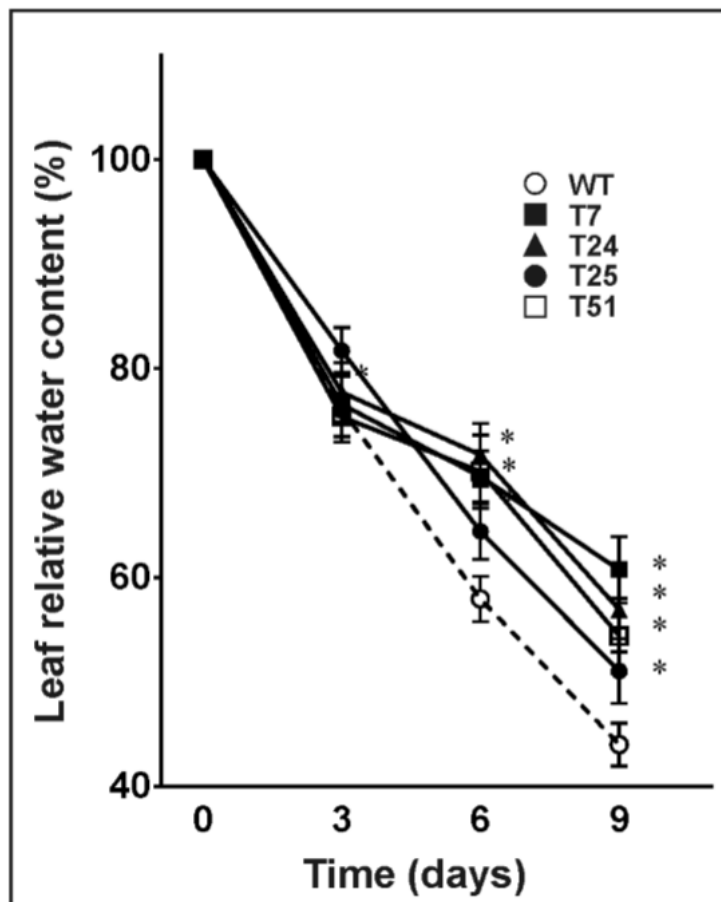


Figura 9. Teor relativo de água presente nas folhas das plantas transgênicas (T7, T24, T25 e T51) e não transgênicas (*WT*) submetidas ao período de estresse hídrico. As barras representam \pm DP. * $P < 0.05$, $n = 10$

As análises destrutivas (biométricas) foram realizadas no nono dia de estresse, logo após as análises fisiológicas. É possível observar que as linhagens T7 e T51 obtiveram os maiores valores de massa seca e fresca (Fig. 10) da porção aérea das plantas, enquanto que as demais linhagens transgênicas se assemelharam a *WT*.

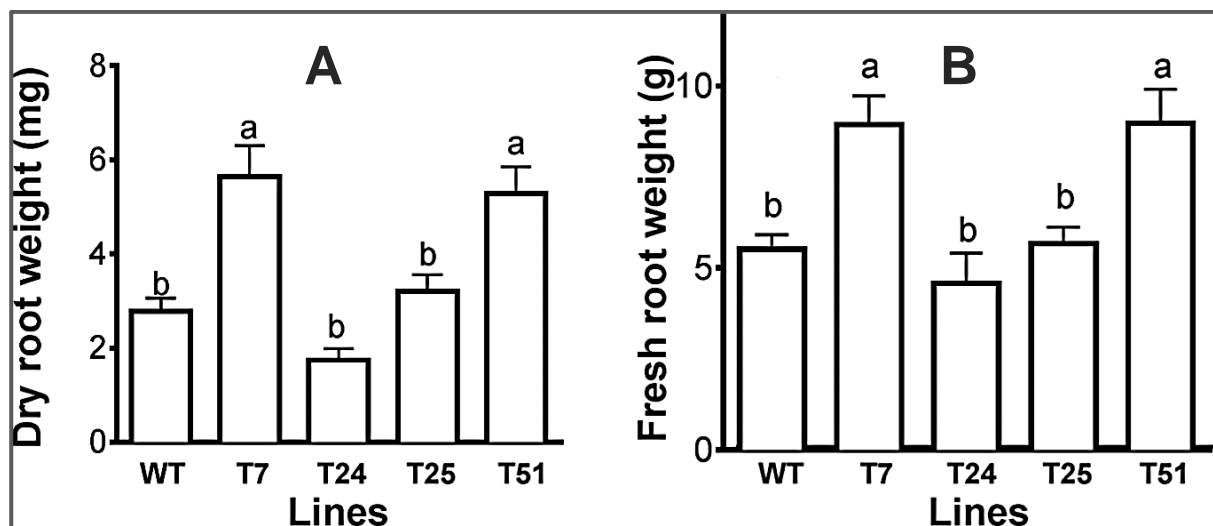


Figura 10. Massa (mg) seca (A) e massa (g) fresca (B) das raízes das plantas transgênicas (T7, T24, T25 e T51) e não transgênicas (WT). As barras representam \pm DP. Colunas com a mesma letra não são estatisticamente diferentes. * $P < 0.05$, $n = 10$.

Os dados de massa seca, da parte radicular das plantas, não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao controle, exceto pela linhagem T25 que teve desempenho inferior a todas as demais (Fig. 11A). Já os valores de massa fresca (Fig. 11B) aferidos indicaram melhores respostas das linhagens T7, T24 e T51. Observou-se também que a linhagem T25, novamente, teve resultados inferiores.

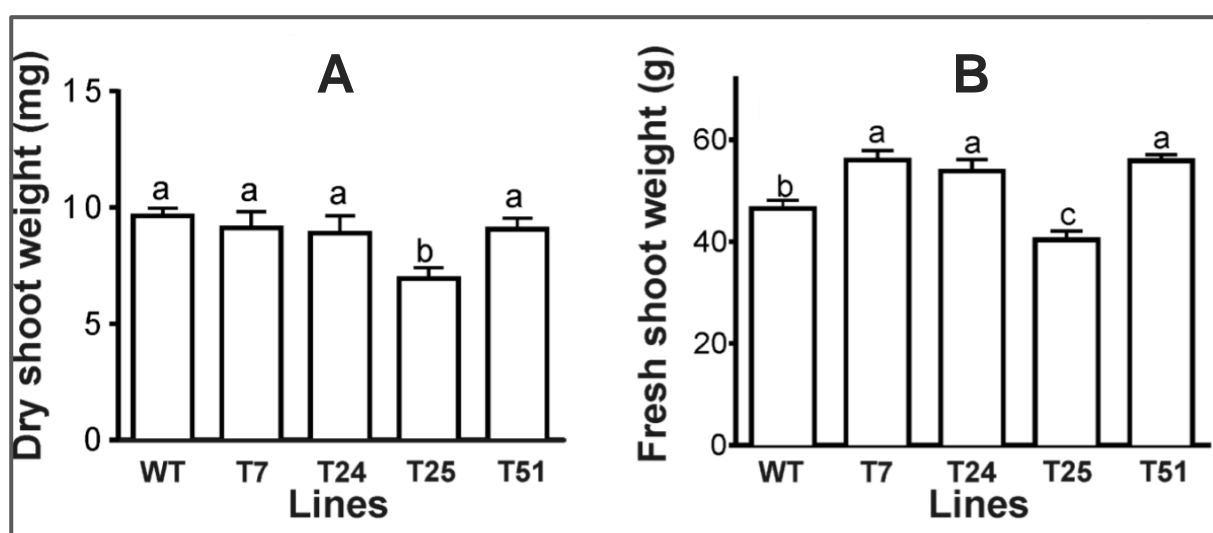


Figura 11. Massa seca (A) e massa fresca (B) da parte aérea das plantas transgênicas (T7, T24, T25 e T51) e não transgênicas (WT) analisadas no último dia de estresse hídrico. As barras representam \pm DP. Colunas com a mesma letra não são estatisticamente diferentes. * $P < 0.05$, $n = 12$.

As análises do comprimento da parte aérea (Fig. 12A) das plantas mostraram que não houve diferença estatística entre os valores das linhagens T7, T24 e T51 quando comparadas a *WT*. As plantas T25 tiveram comprimentos inferiores a todas as demais linhagens, inclusive dos controles, com resultado estatisticamente menor. O comprimento da raiz principal foi medido e observou-se que a linhagem T25 foi a única a apresentar diferença estatística ao ser comparada ao controle, mas contrariando os resultados das outras análises, seu resultado foi significativamente superior. As demais linhagens não diferiram estatisticamente das plantas *WT*, embora a linhagem T7 tenha apresentado comprimento relativamente menor que todas as demais linhagens transgênicas

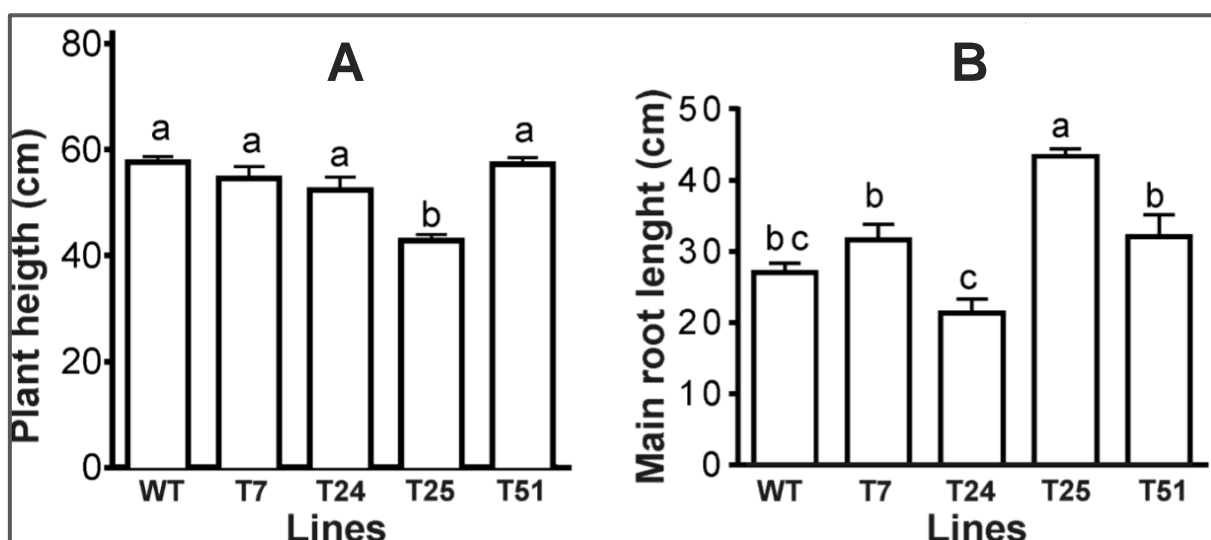


Figura 12. Comprimento da parte aérea (A) e da raiz principal (B) das plantas transgênicas (T7, T24, T25 e T51) e não transgênicas (*WT*) aferidos no nono dia de estresse hídrico. As barras representam \pm DP. Colunas com a mesma letra não são estatisticamente diferentes. * $P < 0.05$, $n = 10$.

O conteúdo relativo de água no solo foi aferido, juntamente com as demais análises durante o período de estresse, e não foram observadas diferenças estatísticas entre os valores obtidos nos diferentes genótipos (Fig.13 A). No décimo dia de estresse, após a obtenção de todos os dados desejados, um grupo de plantas foi escolhido para aferição da resposta em relação ao processo de reidratação. As análises foram feitas com um intervalo de 1 hora entre elas, durante um período total de quatro horas. Observa-se que na primeira hora após a irrigação, todas as linhagens transgênicas, com exceção da T7, mostraram melhores resultados que as plantas *WT*. No segundo e terceiro pontos de aferição, todas as linhagens

transgênicas exibiram diferença estatística de seus valores em relação ao controle. Na última hora de observação, a linhagem T25 se equiparou à *WT*, enquanto os demais genótipos mantiveram melhores e estatisticamente diferentes quando comparados ao controle (Fig. 13 B).

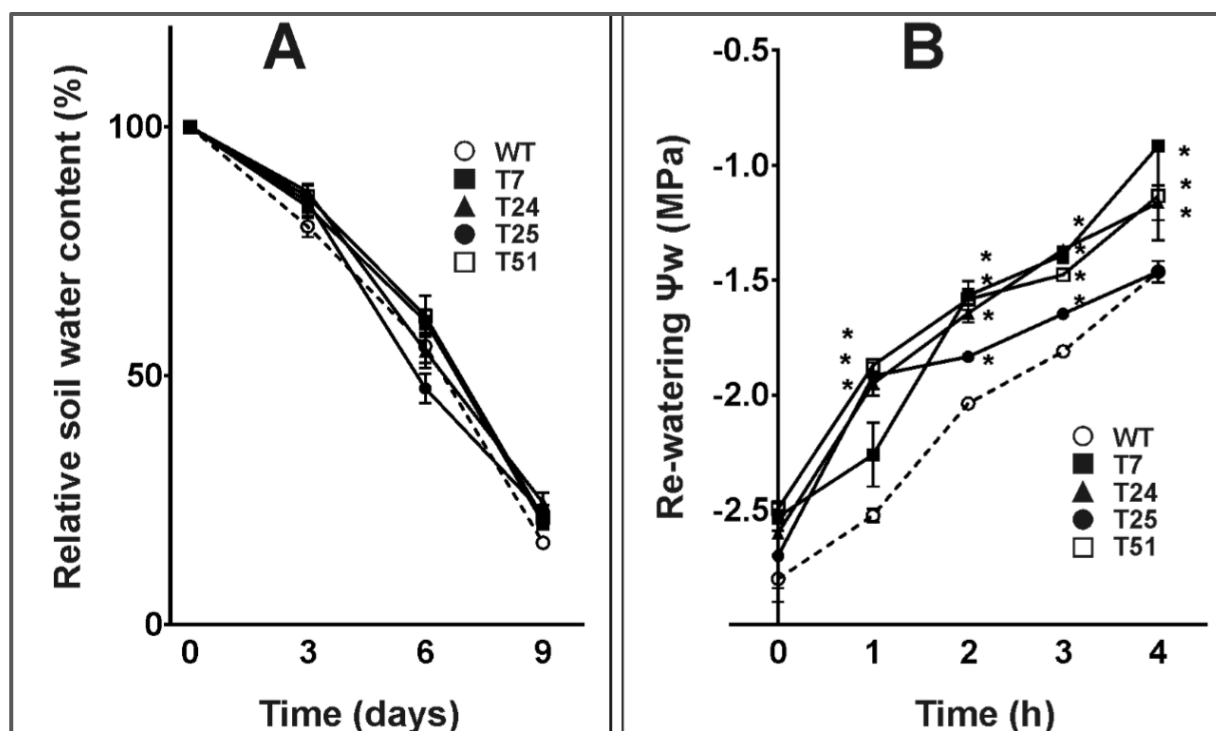


Figura 13. Conteúdo relativo de água no solo observado durante o experimento de estresse hídrico das linhagens transgênicas e *WT* (A). Potencial hídrico (Ψ_w) aferido a partir das folhas das plantas transgênicas (T7, T24, T25 e T51) e não transgênicas (*WT*) sob déficit hídrico no período de recuperação com a retomada da irrigação. As medidas foram obtidas durante um período de quatro horas após irrigação (B). As barras representam \pm DP. * $P < 0.05$, $n = 10$.

Para aferir a relação entre a expressão do gene e as respostas observadas nas linhagens em questão, foi feita análise quantitativa em tempo real de *PCR* (do inglês *real-time Polymerase Chain Reaction*). Os resultados mostram que as linhagens T7, T24 e T51 não apresentaram diferenças estatísticas dos níveis de expressão do gene entre si (por volta 23 vezes acima do controle), enquanto que o genótipo T25 se mostrou com níveis reduzidos (Fig. 14).

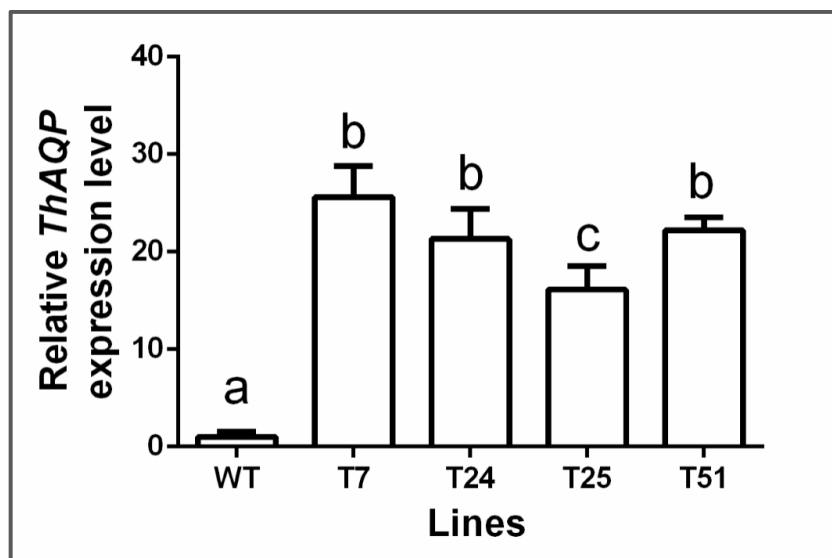


Figura 14. Nível de expressão do gene (*ThAQP*) nas das plantas transgênicas (T7, T24, T25 e T51) e não transgênicas (*WT*) obtido através de análise quantitativa em tempo real de *PCR*. Os dados representam medias de três replicações biológicas e três replicações técnicas relacionadas ao controle. As barras representam \pm DP. Colunas com a mesma letra não são estatisticamente diferentes. * $P < 0.05$, $n = 9$.

6 DISCUSSÃO

A ocorrência de déficits hídricos em plantas geralmente está relacionada ao fato da diminuição sazonal do teor de água disponível nos solos. A intensidade e duração do estresse são determinantes quanto a redução e sobrevivência (CHAVES & OLIVEIRA, 2004).

As aquaporinas são responsáveis por mediar a fluxo através das membranas celulares e promover mudanças do fluxo de água alterando a condutividade hídrica nas plantas, sendo, portanto, importante fator relacionado ao estresse hídrico. Com base nessa premissa, o presente trabalho visou avaliar o efeito da superexpressão de um gene de *Trichoderma harzianum*, que codifica para uma aquaporina, em plantas de tabaco.

Alguns parâmetros fisiológicos e morfológicos são importantes para avaliar tolerância ao estresse hídrico, entre esses estão a taxa fotossintética, o teor relativo de água e o potencial hídrico.

A taxa fotossintética (A_n) pode ser expressada por $A_n = g_s(C_a - C_i) = g_m(C_i - C_c)$, onde C_a , C_i e C_c são concentrações de gás carbono na atmosfera, na cavidade subestomática e no estroma do cloroplasto, respectivamente, e g_s e g_m como sendo a condutância estomática e mesofílica (LONG & BERNACCHI, 2003). De forma geral, as linhagens transgênicas apresentaram maiores taxas fotossintéticas durante o estresse hídrico, quando comparadas às plantas controle.

Os elevados valores observados de C_i associados à baixa taxa de condutância estomática nas plantas WT indicam limitação nas taxas de assimilação de gás carbônico. O fechamento dos estômatos reduz a condutância de dióxido de carbono que resulta na redução da fotossíntese e atividade da enzima Rubisco (CHAVES et al., 2002). Já as linhagens transgênicas se mostraram com menos concentração de CO_2 intercelular e melhor condutância estomática. A vantagem adaptativa de manter a condutância estomática sob estresse hídrico parece estar associada à elevada taxa fotossintética e perda de calor pelo vapor d'água na transpiração (POU et al., 2013; SCHULTZ, 2003).

O status hídrico das folhas é definido como a relação entre o movimento de água dentro e fora desses órgãos. Esse aspecto é expresso pelos fatores de teor relativo de água e potencial hídrico das folhas. (ACHE et al., 2010; PRADO & MAUREL, 2013). Observou-se que as linhagens transgênicas apresentaram maior potencial hídrico e elevado teor relativo de água nas folhas, o que pode ter promovido melhoria na tolerância a déficit hídrico.

Foi observado que as plantas transformadas tiveram maior potencial hídrico e também elevado teor de água nas folhas. Isso indica que houve maior retenção de água, refletindo na melhoria da resposta ao período de estresse. A capacidade de evitar e adaptar-se à desidratação durante períodos de déficit hídrico, promovendo a manutenção do teor de água interno adequado, é considerada como característica de plantas tolerantes ao estresse hídrico (LOPES & REYNOLDS, 2010).

A melhoria da relação entre assimilação de carbono (fotossíntese) e perda de água (transpiração) pelos vegetais resulta na melhoria de produção através do uso de menor quantidade de água. A razão entre esses dois fatores é denominada de eficiência do uso da água (EUA) e representa a eficiência da planta em incrementar

a captação de CO₂ ao menos tempo que minimiza a perda de água (BRAMLEY; TURNER; SIDDIQUE 2013). As aquaporinas se mostram como sendo os agentes determinantes dessas dinâmicas em alguns organismos vegetais (SADE et al. 2010; BRAMLEY et al. 2013; FLEXAS et al. 2013). De forma geral, as plantas transgênicas apresentaram melhor eficiência no uso água, quando comparadas a *WT*.

Os resultados mostram que a variação do potencial do solo foi em resposta ao teor de água nesse ambiente. A taxa de transpiração e potencial hídrico foram maiores nas linhagens contendo o gene *ThAQP*. Isso sugere maior condutividade hidráulica nas plantas transgênicas. Esse fator é importante para a manutenção do balanço hídrico nas plantas e pode conferir continuidade dos processos fotossintéticos frente a condições de estresse (VADEZ et. al., 2014)

A tolerância a estresse hídrico em plantas superexpressando genes de aquaporinas se mostra estar intimamente relacionado à atividade de transporte de água nas raízes, proporcionando incremento na retenção de água (ZHOU et al., 2012). Praticamente todas as linhagens transformadas apresentaram maiores valores de massa fresca (tanto da parte aérea quanto radicular), sugerindo que as plantas ajustaram seu teor hídrico através da retenção de água nas raízes, caule e folhas. Foi observado que um decréscimo na permeabilidade osmótica de água nas células em plantas que tiveram silenciamento do gene de aquaporina (KALDENHOFF et al. 1998; SIEFRITZ; ET. AL., 2002).

Chaves et. al. (2013) observou que períodos curtos de estresse hídrico afetam negativamente o *status* hídrico das plantas, além de interferirem diretamente no crescimento e taxa fotossintética desses organismos. Porém, as respostas dos vegetais em relação a estresses hídricos são dependentes da expressão gênica, o que gera alterações em sua fisiologia e morfologia, como também na habilidade de se recuperarem após aumento da disponibilidade hídrica novamente (FLEXAS et al., 2006).

A sinalização química e hidráulica afeta a regulação da condutância estomática da maioria das plantas sob condições de estresse (COMSTOCK, 2001). A condutância hidráulica foliar é reduzida quando ocorre cavitação e colapso do xilema, como também há redução no fluxo de água na parte distal do xilema pelo

pareamento das membranas permeáveis a água (BRODRIBB & HOLBROOK, 2004). A estreita regulação do movimento da água é importante para o crescimento e desenvolvimento, uma vez que a divisão e expansão celular requerem a captação contínua de água para manutenção da turgescência das células (KUTSCHERA & NIKLAS, 2013). Estudos sugerem que as aquaporinas atuam na regulação do transporte de água nos vasos do xilema, melhorando sua capacidade de condutividade hidráulica frente a condições de estresse hídrico, resultando na prevenção de embolismos e aumentando a habilidade de recuperação desses organismos (SECCHI & ZWIENIECKI, 2014). No geral, as linhagens transgênicas mostraram melhores respostas no período de re-irrigação, com recuperação mais rápida em relação ao controle.

Foi observado, de forma geral, que a linhagem T25 apresentou resultados muito semelhantes às plantas *WT*. Isso pode estar relacionado ao fato de que essa linhagem apresentou menores níveis de expressão do gene *ThAQP*. É sabido que a expressão de transgenes é altamente variável entre linhagens submetidas a transformação com o mesmo vetor. Diversos fatores podem estar relacionados a esse acontecimento, por exemplo, o silenciamento acidental por estruturas de *RNAi* (DAY et al., 2000)

7 CONCLUSÕES

A descoberta das aquaporinas em plantas proporcionou melhor entendimento das relações hídricas nesses organismos, assim como resultou na possibilidade de manipulação dos genes que codificam essas proteínas nos diversos organismos vivos.

De forma geral, as linhagens transgênicas apresentaram maior condutância estomática, maior taxa fotossintética e menor concentração de gás carbônico sob condições de estresse hídrico.

A superexpressão constitutiva do gene *ThAQP* melhorou a eficiência do uso de água pela folha, apesar de elevadas taxas de transpiração observadas.

Observou-se que as linhagens transformadas com elevado nível de expressão do transgene apresentaram valores superiores de teor relativo de água, potencial hídrico das folhas e também de massa fresca e seca das raízes. Essas linhagens também apresentaram maior potencial hídrico durante o período de recuperação.

8 PERSPECTIVAS

Os resultados observados indicam *Trichoderma harzianum* como uma fonte de genes com grande potencial para aplicação biotecnológica em programas de obtenção de plantas tolerantes a estresses hídricos.

O trabalho aqui realizado utilizou-se de plantas de tabaco (planta modelo), mas os resultados obtidos se mostram promissores para futuras aplicações nas espécies vegetais cultivadas.

Para melhor entendimento do funcionamento dos processos vinculados à expressão do gene *ThAQP*, estudos mais aprofundados deveram ser realizados.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHE, P.; BAUER H.; KOLLIST H.; AL-RASHEID, K. A. S.; LAUTNER, S.; HARSTUNG, W.; HEDRICH, R. Stomatal action directly feeds back on leaf turgor: new insights into the regulation of the plant water status from non-invasive pressure probe measurements. **Plant Journal**. v.62, p.1072-1082, 2010.

AGRE, P. Aquaporin water channels (Nobel Lecture). **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** v. 43, p. 4278–4290, 2004.

ARAGÃO, F. J. L.; BRASILEIRO, A. C. M. Positive, negative and marker-free strategies for transgenic plant selection. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 14, p. 01–10, 2002.

BIENERT, G. P.; THORSEN, M.; SHÜSSLER, M. D.; NILSON, H. R.; WAGNER, A.; TAMÁS, P. J. A subgroup of plant aquaporins facilitate the bi-directional diffusion of $As(OH)_3$ and $Sb(OH)_3$ across membranes. **BMC Biology**. v. 6, p. 26, 2004.

BOYER, J. S. Plant productivity and environment. **Science**. V.218, p. 218:443, 1982

BRAMLEY, HELEN; TURNER, NEIL C.; TURNER, DAVID W.; TYERMAN, STEPHEN D. Comparison between gradient-dependent hydraulic conductivities of roots using the root pressure probe: the role of pressure propagations and implications for the relative roles of parallel radial pathways. **Plant, Cell and Environment**. v. 30, p. 861-874, 2007.

BRAMLEY, H.; TURNER, N. C.; SIDDIQUE, K. H. M. **Water use efficiency**. In: Genomics and breeding for climate-resilient crops. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, p 225–268, 2013.

BRODRIBB, T. J.; HOLBROOK, N. M. Stomatal protection against hydraulic failure: a comparison of coexisting ferns and angiosperms. **New Phytologist**. v.162, p. 663-670, 2004.

CATTIVELLI, L., RIZZA, F.; BADECK, F. W.; MAZZUCOTELLI, E.; MASTRANGELO, A. M.; FRANZIA, E.; MARE, C.; TONDELLE, A.; STANCA, A. M. (2008). Drought tolerance improvement in crop plants: an integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Research*. **Field Crop Research**. v. 105, p. 1-14, 2008.

CHAVES, M. M.; PEREIRA, J. S.; MAROCO, J.; RODRIGUES, M. L.; RICARDO, C. P. P.; OSÓRIO, M. L.; CARVALHO, I.; FARIA, T.; PINHEIRO, C. How plants cope with water stress in the field: photosynthesis and growth. **Annals of Botany**. v. 89, p. 907-916, 2002.

CHAVES, M. M.; OLIVEIRA, M. M.. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. **Journal of Experimental Botany**. v. 55, p. 2365 – 2384, 2004.

CHAVES, M. M., FLEXAS, J., PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of botany**. v.103, p. 551-560, 2009.

COLLINS, N. C.; TARDIEU, F.; TUBEROSA, R. Quantitative trait loci and crop performance under abiotic stress: where do we stand? **Plant Physiology**. v.147, p.469–486, 2008.

COMSTOCK, J. P. Hydraulic and chemical signalling in the control of stomatal conductance and transpiration. **Journal of Experimental Botany**. v. 53, p. 195-200, 2002.

Day, C. D.; Lee, E.; Kobayashi, J.; HOLAPPA, L. D.; ALBERT, H.; OW, W. D. Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced. **Genes & Development**. v.14, p.2869–2880, 2000.

DIAMOND, J. M. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. **Nature**, v.418, p.700-707, 2002.

DIAMOND, J.M.; BELLWOOD, P. Farmers and their languages: the first expansions. **Science**, v.300, p.597-603, 2003.

FAO. Declaration of the World Summit on Food Security. **Rome**, p.16–18, 2009.

FLEXAS, J.; BOTA, J.; GALMÉS, J.; MEDRANO, H.; RIBAS-CARBÓ, M. Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. **Physiologia Plantarum**. v. 127, p. 343-352, 2006.

FLEXAS, J.; BARBOUR, M. M.; BRENDDEL, O.; CABRERA, H. M.; CARRIQUÍ, M.; DÍAZ-ESPEJO, A.; DOUTHE, C.; DREYER, E.; FERRIO, J. P.; GAGO, J.; GALLÉ, A.; GALMÉS, J.; KODAMA, N.; MEDRANO, H.; NIINEMETS, Ü.; PEGUERO-PINA, J. J.; POU, A.; RIBAS-CARBÓ, M.; TOMÁS, M.; TOSENS, T.; WARREN, C. R. Mesophyll diffusion conductance to CO₂: an unappreciated central player in photosynthesis. **Plant Science**. v. 193, p. 70-84, 2012.

GRAYSON, M. Agriculture and drought. **Nature**. v. 501, p. S1, 2013.

HERMOSA, R.; BOTELLA, L.; KECK, E.; JIMÉNEZ, J. Á.; MONTERO-BARRIENTOS, M.; ARBONA, V.; GÓMEZ-CADENAS, A.; MONTE, E.; NICOLÁS, C. The overexpression in *Arabidopsis thaliana* of a *Trichoderma harzianum* gene that modulates glucosidase activity, and enhances tolerance to salt and osmotic stresses. **Journal of plant physiology**. v. 168, p. 1295–1302, 2011.

HORSCH, R.; FRY, J. E.; HOFFMANN, N. L. A.; EICHHOLTZ, D.; ROGERS, S. G.; FRALEY, R. T. A simple and general method for transferring genes in to plants. **Science**. v. 227, p. 1229-1231, 1985.

HUSSAIN, S. S.; IQBAL, M. T.; ARIF, M. A.; AMJAD, M. Beyond osmolytes and transcription factors: drought tolerance in plants *via* protective proteins and aquaporins. **Plant Biol**. v. 55, p.401–413, 2011.

IPCC. 2001. Climate change 2001: the scientific basis. Contribution of working group I to the third assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). HOUGHTON, J. T.; DING, Y.; GRIGGS, D. J.; NOGUER, M.; VAN DER LINDEN, P. J.; XIAOSU, D. eds. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

JAVOT, H.; MAUREL, C. The role of aquaporins in root water uptake. **Annal of Botany**. v. 90, p. 301-313, 2002.

KALDENHOFF, R.; GROTE, K.; ZHU, J. J.; ZIMMERMANN, U. Significance of plasmalemma aquaporins for water-transport in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**. v. 14, p. 121–128, 1998.

KHAN, M. S.; AHMAD, D.; KHAN, M. A. Utilization of genes encoding osmoprotectants in transgenic plants for enhanced abiotic stress tolerance. **Electronic Journal of Biotechnology**. v. 18, p. 257–266, 2015.

KUTSCHERA, U.; NIKLAS, K. J. Cell division and turgor-driven stem elongation in juvenile plants: a synthesis. **Plant Science**, v. 207, p. 45-56, 2013.

LONG, S.P.; BERNACCHI, C. J. Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. **Journal of Experimental Botany**. v. 54, p. 2393–2401, 2003.

LOPES, M. S.; REYNOLDS, M. P. Partitioning of assimilates to deeper roots is associated with cooler canopies and increased yield under drought in wheat. **Functional Plant Biology**. v. 37, p. 147–156, 2010.

LUU, D. T.; MAUREL, C. Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. **Plant Cell Environ**. v. 25, p. 85–96, 2005.

MARTÍNEZ-BALLESTA, M. C.; SILVA, C.; LÓPEZ-BERENGUER, C.; CABAÑERO, F. J.; CARVAJAL, M. Plant aquaporins: new perspectives on water and nutrient uptake in saline environment. **Plant Biol**. v.8, p.535–546, 2005.

MAUREL C. Aquaporins and water permeability of plant membranes. **Plant Physiology**. v. 48, p. 399–429, 1997.

MAUREL, C.; SANTONI, V.; LUU, D. T.; WUDICK, M. M.; VERDOUCQ, L. The cellular dynamics of plant aquaporin expression and functions. **Plant Biol**. v. 12, p. 690–698, 2008.

MAUREL, C.; SANTONI, V.; LUU, D. T.; WUDICK, M. M.; VERDOUCQ, L. The cellular dynamics of plant aquaporin expression and functions. **Plant Biology**. v. 12, p. 690–698, 2009.

MONTERO-BARRIENTOS, M.; HERMOSA, R.; CARDOZA, R. E.; GUTIÉRREZ, S.; NICOLÁS, C.; MONTE, E. Transgenic expression of the *Trichoderma harzianum* *hsp70* gene increases *Arabidopsis* resistance to heat and other abiotic stresses. **Journal of Plant Physiology**. v. 167, p. 659–65, 2010.

MORISON, J. I. L., BAKER, N. R., MULLINEAUX, P. M., DAVIES, W.J. Improving water use in crop production. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 363, p. 639-658, 2008.

PÄÄBO, S. Neolithic genetic engineering. **Nature**, v.398, p.194-195, 1999.

POU, A.; MEDRANO, H.; FLEXAS, J.; TYERMAN, S. D. A putative role for TIP and PIP aquaporins in dynamics of leaf hydraulic and stomatal conductances in grapevine under water stress and re-watering. **Plant, Cell & environment**, v. 36, p. 828-843, 2013.

PRADO, K.; MAUREL, C. Regulation of leaf hydraulics: from molecular to whole plant levels. **Frontiers in Plant Science**. v. 4, p.255, 2013.

ROCKSTRÖM, J.; LANNERSTAD, M.; FALKENMARK, M. Assessing the water challenge of a new green revolution in developing countries. **PNAS**. v. 104, p.6253-6260, 2007.

SADE, N. et al. The role of tobacco Aquaporin1 in improving water use efficiency, hydraulic conductivity, and yield production under salt stress. **Plant physiology**, v. 152, n. 1, p. 245–54, 2010.

SCHULTZ, H. R. Differences in hydraulic architecture account for near-isohydric and anisohydric behaviour of two field-grown *Vitis vinifera* L. cultivars during drought. **Plant, Cell & Environment**, v. 26, p. 1393-1405, 2003.

SECCHI, F.; ZWIENIECKI, M. A. Down-regulation of plasma intrinsic protein1 Aquaporin in poplar trees is detrimental to recovery from embolism. **Plant Physiology**. v. 164, p.1789–1799, 2014.

SIEFRITZ, F.; TYREE, M. T.; LOVISOLO, C.; SCHUBERT, A.; KALDENHOFF, R. PIP1 Plasma Membrane Aquaporins in Tobacco: From Cellular Effects to Function in Plants. **The Plant Cell**. v. 14, p. 869–876, 2002.

SINCLAIR, T. R.; TANNER, C. B.; BENNETT, J. M. Water-use efficiency in crop production. **Bioscience**. v.34, p. 36–40, 1984.

TANAKA, M.; WALLACE, I. S; TAKANO, J.; ROBERTS, D. M.; FUJIWARA, T.; NIP6;1 is a boric acid channel for preferential transport of boron to growing shoot tissues in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**. v. 20, p. 2860–2875, 2008.

TESTER, M.; LANGRIDGE, P. Breeding technologies to increase crop production in a changing world. **Science**, v.327, p. 818-822, 2010.

VADEZ, V. Root hydraulics: The forgotten side of roots in drought adaptation. *Field Crops Research*. v. 165, p. 15–24, 2014.

VIEIRA, P. M.; COELHO, A. S.; STEINDORFF, A. S.; SIQUEIRA, S. J. L.; SILVA, R. N.; ULHOA, C. J. Identification of differentially expressed genes from *Trichoderma harzianum* during exposure to *Fusarium solani* cell wall as a tool for biotechnological application. **BMC Genomics**. v. 14, p. 177, 2013.

VIEIRA, Pabline Marinho. **Identificação, expressão e análise de genes de *Trichoderma harzianum* com potencial biotecnológico**. 2014. 50 p. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

WITCOMBE, J. R.; HOLLINGTON, P. A.; HOWARTH, C. J.; READER, S.; STEELE, K. A. Breeding for abiotic stresses for sustainable agriculture. *Philosophical Transactions of the Royal Society B. **Biological Sciences***, v. 363, p.703-716, 2010.

WHITE, P. J.; BROWN, P. H.; Plant nutrition for sustainable development and global health. *Annals of Botany*, v.105, p.1073-1080, 2010.

ZHOU, S.; HU, W.; DENG, X.; MA, Z.; CHEN, L.; HUANG, C.; WANG, J.; HE, Y.; YANG, G.; HE, G. Overexpression of the wheat aquaporin gene, *TaAQP7* enhances drought tolerance in transgenic tobacco. **PLoS ONE**. v. 7, p. e52439, 2012.

10 ANEXO

Artigo submetido à revista BMC Plant Biology: “Overexpression of aquaporin gene from *Trichoderma harzianum* improves water-use efficiency and drought tolerance in *Nicotiana tabacum*”.

Overexpression of aquaporin gene from *Trichoderma harzianum* improves water-use efficiency and drought tolerance in *Nicotiana tabacum*
–Manuscript Draft–

Manuscript Number:	
Full Title:	Overexpression of aquaporin gene from <i>Trichoderma harzianum</i> improves water-use efficiency and drought tolerance in <i>Nicotiana tabacum</i>
Article Type:	Original Article
Funding Information:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (79/13) Dr. Francisco J. L. Aragao
Abstract:	Aquaporins affect water transport across membranes and represent a valuable tool for biotechnological improvement of plant tolerance to environmental stresses. Nevertheless, there are no reports of transgenic plants expressing aquaporin genes of fungal origin. We previously isolated a gene encoding for an aquaporin (ThAQP), which was up-regulated in <i>Trichoderma harzianum</i> during interaction with the plant pathogen <i>Fusarium solani</i> . This gene was introduced into <i>Nicotiana tabacum</i> and plants were physiologically characterized. Under favorable growth conditions, transgenic progenies did not had differences in both germination and growth rates when compared to wild type. However, physiological responses under drought stress revealed that transgenic plants presented significantly higher transpiration rate, stomatal conductance, photosynthetic efficiency and faster turgor recovery than wild type. Quantitative RT-PCR analysis demonstrated the presence of ThAQP transcripts in transgenic lines, showing the cause-effect relationship between the observed phenotype and the expression of the transgene. Our results underscore the high potential of <i>T. harzianum</i> as a source of genes with promising applications in transgenic plants tolerant to drought stress.
Corresponding Author:	Francisco J. L. Aragao, PhD. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Brasília, DF BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Pabline M. Vieira, PhD
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Pabline M. Vieira, PhD Mirella P. Santos, PhD Cristiana M. Andrade, PhD Otacílio A. Souza-Neto, B.S. Cirano J. Ulhoa, PhD Francisco J. L. Aragao, PhD.
Order of Authors Secondary Information:	
Author Comments:	Dear Dr. Jang R. Liu, We have previously submitted the article to Plant Cell Reports (PCRE-D-16-00720), which could not be accepted for publication. However, you have encouraged us to prepare a new version following the suggestions made by you and the PCRE referees. In this manner, we are re-submitting the manuscript with revisions made in accordance

	<p>with the suggestions and corrections indicated by the reviewers and editor. We accepted all the suggestions made by the referees. In addition, we have included additional data requested by reviewers, such as the quantitative real-time RT-PCR analysis to determine the expression of the ThAQP gene in the transgenic lines. We would like to thank you for the suggestions that help us to improve the manuscript. Please find below a list in which we discuss point-by-point the changes included in the manuscript in response to the comments and suggestions made. I look forward to hearing from you soon and appreciate your time and consideration.</p> <p>Yours sincerely, Francisco J. L. Aragão</p> <p>COMMENTS TO THE AUTHOR:</p> <p>In addition to the reviewers' comments I'd like to ask you to identify whether the statistical vertical bars in Figures 2, 3, and 5 are standard deviations or errors and the numbers of replicates in the legends. Authors: Information added as suggested.</p> <p>Reviewer #1:</p> <p>All studies related to determine the involvement of aquaporins in the response of plants to an abiotic stress response like drought are important contributions. In this manuscript, the involvement of the overexpress Trichoderma harzianum aquaporin in tobacco plants in the response to drought by the physiological resistance response, is valuable. Therefore, the manuscript could merit the publication in Plant Cell Reports, but some points or changes should be addressed.</p> <p>Major Concerns</p> <p>-The authors selected the overexpressing lines by the response to NaCl treatments instead of by the response to drought. This should be explained. Authors: Since we have generated a considerable number of transgenic lines (90), it would be difficult to study all of them in a chamber or in a greenhouse under controlled conditions. Therefore, we preferred to perform an initial screening using a germination assay. In fact, we tested germinating seeds and plantlets with NaCl and PEG for all 90 lines. Lines with a better performance in both assays were then selected for physiological studies. As requested, this information is clearer in the new version.</p> <p>-The results presented in the manuscript do not support the fact that ThAQP could transport CO₂. This should be reconsidered. Authors: We agree. In the discussion, we have just suggest that the differences in photosynthetic rate, intercellular CO₂ concentration and stomatal conductance observed in transgenic lines could indicate that ThAQP could also function as a CO₂ facilitator. In order to support this it would require results from mesophyll CO₂ conductance or CO₂ membrane permeability. These statements were removed from the manuscript.</p> <p>-It has been reported discrepancies between the mRNA aquaporin expression and the amount of aquaporins proteins (Boursiac et al., 2005, Plant Physiol., 139, 790-805; Aroca et al., 2005, Plant Physiol., 137, 341-353; Muries et al., 2011 Molecular Biosystems 7: 1322-1335, between others). Also, in <i>A. thaliana</i>, an increase in the abundance of proteins in roots under drought stress has been widely described as not correlated with an increase in the expression level of their corresponding mRNA. These observations suggest the existence of posttranscriptional mechanisms, which regulate PIP trafficking to the plasma membrane. This suggests the possibility that mRNA synthesis is modulated by the accumulation of the corresponding encoded protein. This point should be discussed accordingly.</p> <p>Authors: As requested, the new version includes quantitative real-time RT-PCR analysis (RT-qPCR) of plant lines and a discussion on this aspect was included on the new version of the manuscript.</p>
--	---

	<p>-Differences between lines should be pointed. The line 25 showed different response to drought than the other lines. In some of the parameters is not different to WT. Also, in figure 4, the fresh weight is the lowest and the dry weight is also low, but the root length is the highest. This only can be explained by the change of morphology (secondary roots appearance).</p> <p>Authors: A quantitative real-time PCR (RT-qPCR) analysis was carried out in order to determine differences between lines. Results have shown that ThAQP expression level was lower in the line 25 when compared to the other lines. Thus, the physiological differences observed in the line 25 could be explained by the lower levels of transcripts detected. In addition, this line presented a lower number of lateral roots compared to other lines. As suggested, we have included this data and make changes in the new version.</p> <p>Minor points -There are some spelling mistakes (Fig 4D axis Y; pag 15 line 49). The whole manuscript should be revised accordingly.</p> <p>Authors: We revised the manuscript accordingly.</p> <p>Reviewer #2:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Overexpression of the ThAQP gene in tobacco should be tested at RNA level. 2. Expression level of ThAQP should be tested along with physiological and biometric parameters at drought stress stage and recovery stage to illustrate its function in plant response to stresses. Expression level of ThAQP in different organs of the transgenic plants should also be tested. <p>Authors: As suggested, a quantitative RT-PCR was carried out. Actually, the ThAQP is cloned under control of the strong double 35S CaMV promoter and the AMV enhancer. Consequently, since it is a constitutive and very well know promoter, expressing in distinct organs, we decided just to compare the transcription level between lines. It allowed us to demonstrate a cause-effect relationship between the observed phenotypes and expression of the ThAQP transgene.</p> <ol style="list-style-type: none"> 3. Authors should explain how this fungal gene functions in improving cellular water and CO₂ transport by upholding water balance. <p>Authors: We agree that our results do not support the fact that ThAQP could transport CO₂. These statements were removed from the manuscript. In the previous discussion, we have just suggested that the differences in photosynthetic rate, intercellular CO₂ concentration and stomatal conductance observed in transgenic lines could indicate that ThAQP could also function as a CO₂ facilitator. In order to support this it would require results from mesophyll CO₂ conductance or CO₂ membrane permeability. Almost all ThAQP-transgenic lines showed higher leaf relative water content, leaf water potential, and fresh shoot and root weight under stressed conditions, suggesting that plants adjust water content by modifying their ability to retain water in shoots and roots. Incrementing membrane permeability to water would have an impact on the whole plant water status. In addition, the overexpression of ThAQP gene in tobacco plants seems to increase leaf WUE that could be explained by gas exchange results and water balance. Improved WUE confers a competitive advantage when water is limited, optimizing water during drought. The transgenic lines presented better recovery, and this capacity reflects the higher hydraulic conduction that might be attributed to the ThAQP expression. Theses results suggest that transgenic plants have higher whole plant hydraulic conductance, processes that are critical for plant water relations.</p>
Suggested Reviewers:	<p>Arnoldo Facanha, PhD Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro arnoldo@uenf.br Specialist in Plant Physiology with emphasis in abiotic stress response</p> <p>Lázaro Peres, PhD Universidade Federal de Sao Paulo</p>

Overexpression of aquaporin gene from *Trichoderma harzianum* improves water-use efficiency and drought tolerance in *Nicotiana tabacum*

Pabline M. Vieira^{a§}, Mirella P. Santos^{b§}, Cristiana M. Andrade^c, Otacílio A. Souza-Neto^c, Cirano J. Ulhoa^d, Francisco J. L. Aragão^{c*}

^a Instituto Federal Goiano, Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Biotecnologia, Rodovia Geraldo Silva Nascimento, km 2,5. 75790-000. Urutaí, GO, Brazil.

^b Universidade Federal do Rio de Janeiro, Nupem, Laboratório de Biotecnologia Vegetal, 27910-970, Macaé, RJ, Brazil.

^c Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB W5 Norte, 70770-900, Brasília, DF, Brazil.

^d Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Campus Samambaia, P.O. Box 131, 74001-970, Goiânia, GO, Brazil.

§ Both authors contributed equally to this work.

*Corresponding Author: Francisco J. L. Aragão, E-mail: francisco.aragao@embrapa.br

Key Message: Expression of an aquaporin gene from fungal origin improved tolerance to drought stress in plants that increased transpiration rate, stomatal conductance, photosynthetic efficiency and faster turgor recovery after water stress.

Abstract

Aquaporins affect water transport across membranes and represent a valuable tool for biotechnological improvement of plant tolerance to environmental stresses. Nevertheless, there are no reports of transgenic plants expressing aquaporin genes of fungal origin. We previously isolated a gene encoding for an aquaporin (*ThAQP*), which was up-regulated in *Trichoderma harzianum* during interaction with the plant pathogen *Fusarium solani*. This gene was introduced into *Nicotiana tabacum* and plants were physiologically characterized. Under favorable growth conditions, transgenic progenies did not have differences in both germination and growth rates when compared to wild type. However, physiological responses under drought stress revealed that transgenic plants presented significantly higher transpiration rate, stomatal conductance, photosynthetic efficiency and faster turgor recovery than wild type. Quantitative RT-PCR analysis demonstrated the presence of *ThAQP* transcripts in transgenic lines, showing the cause–effect relationship between the observed phenotype and the expression of the transgene. Our results underscore the high potential of *T. harzianum* as a source of genes with promising applications in transgenic plants tolerant to drought stress.

Keywords: Abiotic stress tolerance, aquaporin, drought stress, fungal gene, transgenic plants

Introduction

Many effective genes for stress tolerance have been isolated from plants and overexpressed in genetically modified crops (Khan et al. 2015; Hiwasa-Tanase and Ezura 2016). However, several other useful genes could be characterized and isolated from other organisms, such as fungi (Nicolás et al. 2014). Adopting this approach, certain genes from *Trichoderma* spp. have been identified and transferred to plants to improve biotic and abiotic stress tolerance, as well as for applications in bioremediation (Nicolás et al. 2014). *Trichoderma* spp. are cosmopolitan filamentous fungi with biotechnological importance due to their ability to colonize diverse substrates under different environmental conditions, and their capacity to secrete a variety of hydrolytic enzymes and secondary metabolites (Schuster and Schmoll 2010; Hermosa et al. 2011; Nicolás et al. 2014). In addition, several *Trichoderma* strains have commercial use in agriculture to biocontrol a broad range of phytopathogens and plant protection (Lorito et al. 2010).

We have previously reported that a gene encoding for an aquaporin is up-regulated in *Trichoderma harzianum* during interaction with the plant pathogen *Fusarium solani* (Vieira et al. 2013). Aquaporins are proteins belonging to the MIP (Major Intrinsic Proteins) family that facilitate the bidirectional transport of water through biological membranes. In addition, some aquaporins have been related to transport of other molecules such as glycerol, ammonia, boric acid, silicic acid, CO₂, or even arsenic acid (Bienert et al. 2008; Tanaka et al. 2008; Maurel et al. 2009; Maurel et al. 2016). Genome-sequencing programs have revealed genes that encode aquaporins ubiquitously distributed in bacteria, fungi, animals and plants (Engel et al. 1994), existing in various tissues and organs as well as in different growth and development phases.

Functional analyses on plant aquaporins suggest their importance on physiological processes and responses related to adaptation under a wider array of environmental conditions

(Martinez-Ballesta and Carvajal 2014). Indeed, aquaporins play roles in plant stresses responses, including changes in the water balance (Uehlein et al. 2008), maintenance of cell turgor (Martre et al. 2002), cell elongation (Besse et al. 2011), xylem embolism repair (Secchi and Zwieniecki 2014), regulation of transpiration (Maurel et al. 2016), stomatal movements (Heinen et al. 2009) and root and leaf hydraulic conductance (Lovisolo et al. 2007; McElrone et al. 2007; Hachez et al. 2008; Heinen et al. 2009). Consequently, aquaporin coding-genes have been used as an option to genetically manipulate plants in order to improve plant water relations under environmental stresses. Genetic engineering has brought insights to the physiological functions of several aquaporin isoforms, and has increased the understanding of their roles in water transport and abiotic stress responses in plants (Gao et al. 2010; Zhou et al. 2012; Martinez-Ballesta and Carvajal 2014) .

Transgenic plants engineered to express or silence aquaporin genes have exerted a wide range of effects due to the complexity of aquaporin isoforms and their regulation mechanisms (Martinez-Ballesta and Carvajal 2014). Some studies underline the successful cases achieved through overexpression of aquaporin in plant biotechnology, although genetic transformation using some aquaporin isoforms did not always improve abiotic stress tolerance (Aharon 2003; Yu et al. 2005; Jang et al. 2007; Wu et al. 2009; Zhou et al. 2012). Accordingly, some aquaporin overexpression in tobacco, rice or *Arabidopsis* causes different responses under stress conditions in spite of a high homology between their amino acid sequences (Cui et al. 2008). Interestingly, there are no reports of transgenic plants expressing aquaporins of fungal origin. Here, we report that a gene encoding an aquaporin from a fungus of biological control (*Trichoderma harzianum*) has been used to enhance tolerance to abiotic stresses in genetically modified tobacco plants.

Material and Methods

Plasmid construct and transgenic plants

The aquaporin gene (*ThAQP*) was synthesized by Epoch Life Science, Inc. (Sugar Land, TX, USA) according to the sequence from *Trichoderma harzianum* (Joint Genome Institute MycoCosm accession number 476226). Codons were optimized following the *Arabidopsis* codon usage for improving its expression in transgenic plants. The *ThAQP* was inserted between the Nco I/Sac I sites of the pC3300GCHI vector (Nunes et al. 2009), replacing the *gchI* gene. The final vector (pC3300-Aqua) was used to transfect *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 by electroporation, which was used to transform tobacco plants (cv. Xanthi) in accordance with Horsch et al. (1985).

Screening of transgenic events

Plants were screened for the presence of the transgenes by PCR (for the *ThAQP* gene) and PAT lateral flow immunochromatographic assays (for detection of the *bar* gene expression). DNA was isolated from leaf disks in accordance with Edwards et al. (1991) and PCR was carried out in accordance with Bonfim et al. (2007). The primer pair AQUA2F (GGGACTTCTTTCTCCTCCTGTTG) / AQUA2R (GAACCTTAGCTTCAATAGCAG) was used to amplify a 928-bp sequence within the *ThAQP* gene.

Quantitative real-time RT-PCR analysis (RT-qPCR)

RNA isolation and RT-qPCR assay were performed as described by Andrade et al. (2015). Three biological repetitions for each line were used for the cDNA synthesis. The primers for the *ThAQP* transgene (CTCCTGTCATAGCTCCAAGAAG and GGACATCTTAACCCTGCTGTTA) were designed using the PrimerQuest Tool (IDT

Integrated DNA Technologies, Inc). The Elongation factor 1 α (*EF-1 α*) transcripts were used as internal reference to normalize gene expression (Schmidt and Delaney, 2010). Triplicate quantitative assays were performed on each cDNA sample. The expression levels were calculated from the threshold cycle according to the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen, 2001).

Water Deficiency Stress Trial

A preliminary screening was performed with all 90 transgenic lines that were generated. Thirty seeds (T_1 generation) of all transgenic lines and control (WT) were germinated in MS liquid media supplemented with PEG 20%, 100mM NaCl or 300mM NaCl. Plants of the transgenic lines (T7, T24, T25, T51) that survived under highest stress condition (300mM NaCl and 20% PEG) were allowed to set seeds and select for further experiments.

Seeds of the T_2 generation were planted in vessels (8L) filled with soil and were grown for approximately 70 days in a controlled (under 28 ± 2 °C) greenhouse and irrigated daily. Plants were subjected to water deficit for 9 days by suspending irrigation. Several physiological parameters were measured, including photosynthetic rate, stomatal conductance, transpiration, leaf water potential and leaf water content. Both fresh and dry weight of shoot and root, height and main root length was also examined. Analyses were performed every three days except for biometric analyzes which were conducted on the last day. The soil water status was monitored during the entire stress period using a manual tensiometer.

Leaf Water Potential and Relative Water Content (RWC)

The leaf water potential (Ψ_w) was measured daily (8:00 to 9:00 a.m.) on fully expanded and photosynthetically active leaf, using a Scholander pressure chamber (SAPSII model 3115).

The relative water content (RWC) was determined using four leaf discs (2 cm²). The fresh weight (FW) was determined in a precision balance. Turgid weight (TW) was determined in leaf samples kept in distilled water for 48h at room temperature in darkness. Dry weight (DW) was obtained after placing the samples in an oven at 70°C for 48 h. RWC was calculated as: $RWC (\%) = [(FW - DW)/(TW - DW)] \times 100$.

Gas Exchange Measurements

Net photosynthetic rate (A_n) ($\mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$), stomatal conductance (g_s) ($\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$), transpiration rate (E) ($\text{mmol}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and intercellular CO₂ concentration (C_i) were measured using a portable infrared gas analyzer (model LC-Pro SD). Measurements were performed in the morning (8:00 to 9:00 a.m.); temperature within the leaf chamber was $25.0 \pm 0.8^\circ\text{C}$ and leaf-to-air vapor pressure deficit was 1.7 ± 0.2 kPa. Reading was taken with an LED light source under a PPFD of $650 \mu\text{mol.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$. Average relative humidity and ambient [CO₂] in the chamber were 70% and $350 \mu\text{mol.m}^{-1}$, respectively. Instantaneous leaf WUE was defined as the ratio of the rate of A_n/E (Sinclair et al. 1984).

Biometric Analysis and Re-watering

After 9 days of water suspension, length of shoots and roots was measured as well as fresh weight of both transgenic events and WT. The dry weights of the shoot and roots were determined following drying in an oven at 70°C for 72 h. A group of stressed plants was rewatered and the recovery was observed by water potential measurement with intervals of 1 hour using a Scholander pressure chamber (SAPSII model 3115).

Statistical Analysis

The experiments were set as randomized block design (RBD) with 12 replications for each

treatment. The statistical evaluation was performed using Prism 5.0. Student's t-test was used for comparison of means, which were deemed significantly different at $P < 0.05$. Two-way ANOVA using Tukey's multiple range test ($p \leq 0.05$) was also applied. Asterisks or different letters indicated statistically different mean values.

Results

The aquaporin coding gene (*ThAQP*) from *T. harzianum* was chemically synthesized taking into consideration the *Arabidopsis* codon usage and cloned under the control of the CaMV 35SRNA promoter (Figure 1). Ninety transformed lines (T_0) were generated, and plants were grown under greenhouse conditions and allowed to set seeds (T_1). The presence of the *ThAQP* gene was confirmed by PCR analysis (Figure 1).

A preliminary screening was performed with the T_1 generation in order to select lines presenting stress tolerance. Seeds were germinated in MS liquid media supplemented with 20% PEG, 100mM NaCl or 300mM NaCl. Seed germination differences were not observed between WT and transgenic lines at 100 mM NaCl. However, transgenic tobacco seeds had significantly delayed germination rates at 300 mM NaCl as compared to WT. The treatment of 20% PEG severely reduced seed germination in both transgenic and WT. Nevertheless, it was observed that under 300 mM NaCl and 20% PEG treatments, in which WT seeds did not germinate or plantlets did not develop, some transgenic lines (T7, T24, T25 and T51) survived. Plants of these lines were allowed to set seeds under stress-free condition and T_2 generation was selected for further drought experiments.

In order to characterize the performance of the selected transgenic lines during drought stress, 70-day-old plants of WT and transgenic lines (T_2 generation) were analyzed during nine days of water shortage. Physiological and biometric parameters were analyzed.

Net photosynthetic rate (An), stomatal conductance (gs) and transpiration rate (E) were evaluated. Both fresh and dry weight of shoot and root, height and main root length were also examined.

Under water deficit, three transgenic lines (T7, T24, and T51) presented higher An than WT on the 3rd and 6th day (Fig. 2A). Remarkably, on the 9th day all transgenic lines presented higher photosynthesis levels than WT, which presented An below zero, indicating the occurrence of respiratory processes (Fig. 2A). Line T7 presented the best performance, with values around $6 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ on the 3rd day of stress (Fig. 2A). Almost all transgenic lines presented lower intercellular CO_2 concentration (Ci) on the 6th and 9th (Fig. 2B) and higher gs on all days under stress (Fig. 2C). On the 3rd day the gs was near to $0.05 \text{ mol}\cdot\text{H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ in the transgenic lines T7 and T51, and $0.025 \text{ mol}\cdot\text{H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ in WT. Intercellular CO_2 concentration in WT plants was higher on all days under stress, although the gs was lower, indicating a limitation in the CO_2 assimilation (Fig. 2B). Almost all transgenic lines presented higher E levels on the 3rd and 6th days as compared to WT (Fig. 2D). The T7 and T51 lines had higher leaf WUE than WT on the 3rd and 6th days (Fig. 2E).

On the 6th day of water deficiency stress, the leaf water potential (Ψ_w) dropped to nearly -1.5 MPa in the WT plants, while the transgenic lines T7, T24 and T51 maintained around -1 MPa (Fig. 3A). On the 9th day these transgenic lines reached Ψ_w near -1.5 MPa ; however, WT exhibited values near to -2.5 MPa (Fig. 3A). On the 6th and 9th days of stress the leaf relative water content (RWC) of the WT dropped to nearly 60% and 40%, respectively, whereas in almost all transgenic lines the RWC was near to 70% and 60%, respectively (Fig. 3B).

Biometric analyses were performed after the 9th day under water stress. Data analyses of dry and fresh roots weight showed that two transgenic lines (T7 and T51) presented elevated weight values as compared to the WT (Fig. 4A, B). Except for line T25, shoot dry

weight in transgenic lines was not statistically different to the WT (Fig. 4C). It was demonstrated that although T7, T24 and T51 transgenic lines presented the highest fresh shoots weight (Fig. 4D), plant height and main root length did not differ statistically from WT (Fig. 4E, F). Line 25, that presented the highest root length (Fig. 4F), had a lower number of lateral roots compared to the other lines.

The relative soil water content was analyzed during stress treatment and no difference was observed between the genotypes (Fig. 5A). To evaluate recovery following drought stress, a group of stressed plants were re-watered and allowed to recover for 4 hours. The leaf water potential was monitored each hour for four hours. In general, transgenic lines showed a faster turgor recovery in all analyzed periods, except for line T7 in the 1st hour and T25 in the 4th hour (Fig. 5B).

Quantitative RT-qPCR analysis was carried out with the selected lines in order to determine the cause–effect relationship between *ThAQP* expression and the observed phenotype (increased transpiration rate, stomatal conductance and photosynthetic efficiency). Results have shown that *ThAQP* transgene is being transcribed in all transgenic lines. It was detected a similar expression levels in the lines T7, T24 and T51 (from 21 to 25 times above the control basal signal), and they were higher than the expression levels observed in the T25 (Fig. 6).

Discussion

Drought is one the most critical environmental stress in agriculture, affecting plant growth and crop yield. Several studies have identified a large number of genes and molecular networks underlying plant adaptation to adverse environmental conditions (Cattivelli et al. 2008; Nagarajan and Nagarajan 2009; Ashraf 2010). It is imperative to produce plants that are

more tolerant to environmental stress by both classical and molecular breeding. In our previous work, gene coding for an aquaporin (*ThAQP*) was found to be up-regulated during *T. harzianum*-*F. solani* interaction (Vieira et al. 2013). Aquaporins mediate a faster water flux across biomembranes that might create an appropriate metabolic environment for hydrolases, which are essential for mycoparasitism (Vieira et al. 2013). In this study, we hypothesized that the expression of the *ThAQP* gene can increase tolerance to water limitation stress in genetically modified tobacco plants.

Photosynthesis is directly affected by drought stress through stomata closing, which limits CO₂ diffusion to the site of carboxylation in the chloroplast stroma (Chaves 2002; Flexas et al. 2006b). Net CO₂ assimilation rates or photosynthesis rate (A_n) can be expressed as $A_n = g_s(C_a - C_i) = g_m(C_i - C_c)$; where C_a , C_i and C_c are the CO₂ concentrations in the atmosphere, the sub-stomatal cavity and the chloroplast stroma, respectively, with g_s and g_m being the stomata and mesophyll conductance, respectively (Long 2003). In this work, we demonstrated that constitutive overexpression of *ThAQP* enhanced photosynthetic rate under water stress and hence the efficiency of leaf water use, despite the highest transpiration rate. Stomata and mesophyll CO₂ conductance are affected by physical modification in the structure of the intercellular spaces, temperature, biochemistry and membrane permeability (Bernacchi et al. 2002; Grassi and Magnani 2005; Tholen and Zhu 2011; Tomás et al. 2014). Non-stomatal inhibition of photosynthesis has been commonly invoked to explain unchanging or increasing intercellular CO₂ concentration in the leaves of plants under drought conditions and strong depression in the relationship between A_n and C_i (van Rensburg and Krüger 1993; Lawlor 2002). Wild type plants showed lower stomatal conductance and increased CO₂ accumulation as the water stress developed. This accumulation suggests a limitation in the CO₂ assimilation processes due to damage in photosynthesis apparatus or decrease in the amount and activity of Rubisco (Lawlor 2002; Flexas et al. 2004; Flexas et al. 2006a).

Transgenic lines presented higher stomatal conductance and transpiration rate and lower intercellular CO₂ concentration under water deficiency stress. The conservation of higher transpiration rate is an interesting mechanism that ensures not only continuous CO₂ uptake, but also the continued supply of nutrients, reducing leaf temperature and promoting plant growth (Hopmans and Bristow 2002; Mcgrath and Lobell 2013; Matimati et al. 2014). Overexpression of *ThAQP* may enhance protection of the photosynthetic apparatus, which might result in higher CO₂ assimilation in transgenic tobacco plants.

We have observed that *ThAQP*-transgenic lines have higher leaf water potential and relative water content, indicating greater water retention, which may improve plant resistance to drought stress. Water uptake and transport across membranes is crucial for plant growth either under favorable or adverse environmental conditions (Aroca et al. 2012). In this context, water transport uses both the apoplastic and the symplastic routes, and the radial component of the symplastic route is tightly controlled by aquaporins (Steudle 1994; Steudle and Peterson 1998; Heinen et al. 2009). The leaf water status is established by the ratio between the movement of water into the leaf and the movement of water out of the leaf. It is expressed in terms of leaf relative water content and leaf water potential (Sack and Holbrook 2006; Ache et al. 2010; Prado and Maurel 2013).

Plant water use efficiency (WUE), represented by the ratio between carbon gain (photosynthesis) and water loss (transpiration), describes plant efficiency of optimizing carbon gain while minimizing water loss. Improved WUE confers a competitive advantage when water is limited, and aquaporins are major determinants of WUE in some plants (Sade et al. 2010; Bramley et al. 2013; Pou et al. 2013; Flexas et al. 2013; Nada and Abogadallah 2014; Maurel et al. 2016). The importance of mesophyll conductance (*g_m*) in optimizing water use during drought is showed by correlated changes in mesophyll conductance and WUE (Chaves et al. 2008; Bickford et al. 2010; Flexas et al. 2013; Tomás et al. 2014). In

addition, the overexpression of *ThAQP* gene in tobacco plants seems to increase leaf WUE and could be explained by gas exchange results and water balance.

Our results show that the soil water potential varied according to relative soil water content, and the transpiration rate and water potential were higher in transgenic lines. This suggests that transgenic plants have higher whole plant hydraulic conductance (K_p). The hydraulic conductivity of membranes seems to be determined at the spatial level in the plant by aquaporin-regulated processes that are critical for plant water relations (Maurel et al. 1997; Prado and Maurel 2013; Chaumont and Tyerman 2014; Maurel et al. 2016). The root hydraulic conductance is also important for water balance, and some tolerant genotypes increase root hydraulic conductivity, resulting in a non-stomatal limitation of photosynthesis, under stressful conditions. Aquaporin is involved in this process (Matsuo et al. 2009; Aroca et al. 2012; Vadez 2014). Moreover, it has been observed that aquaporins increase plant hydraulic conductivity, suggesting that incrementing membrane permeability has an impact on the whole plant water status (Maurel et al. 1997; Prado and Maurel 2013; Vandeleur et al. 2014; Chaumont and Tyerman 2014; Maurel et al. 2016).

It has been suggested that drought stress tolerance in aquaporin-overexpressing plants is closely related to aquaporin water transport activity in the roots, increasing the ability to retain water (Zhou et al. 2012). Almost all *ThAQP*-transgenic lines showed higher fresh shoot and root weight under stressed conditions as compared to WT, suggesting that plants adjust water content by modifying their ability to retain water in shoots and roots. Functional analyses using aquaporins predict their roles in plant water relations. In plants in which the aquaporin gene was silenced, a decrease was observed in the cellular osmotic water permeability, as was a reduction in water stress resistance (Kaldenhoff et al. 1998; Siefritz 2002).

Short-term water stress negatively affects plant water status, growth and

photosynthetic rate (Chaves et al. 2003). However, plant responses to drought stress is dependent of gene expression, resulting in the alteration of plant physiology and morphology, as well as in the capacity to recover after re-watering (Flexas et al. 2006b). Long-distance water transport in vascular plants occurs in a duct system of nonliving cells connecting roots to shoot. Frequently, under drought situations the water column within the lumen of xylem vessels or tracheids could be subordinate to tensions that result in cavitation and the consequent formation of embolisms (Cochard 2002; Lens et al. 2013). Evidence suggests that aquaporins could act in regulating the xylem hydraulic capacity throughout the progression of drought, recovering from stress and preventing embolism (Secchi and Zwieniecki 2014).

In this work, stressed plants were re-watered, and their recovery was observed by measuring the water potential. The transgenic lines presented better recovery, and this capacity reflects the higher hydraulic conduction that might be attributed to the *ThAQP* expression. These results are accordance with Martre et al. (2002), which showed that in *Arabidopsis* in which the aquaporin gene was silenced, plants recovered more slowly after re-watering. In order to prevent hydraulic failure in the xylem system under higher transpiration rate, aquaporins increase root hydraulic conductivity, thereby releasing plant hydraulic tension. In addition, under some stress conditions, regulation of root water uptake is more crucial to avoid stress injury than regulation of leaf transpiration. These are critical goals in the improvement of plant tolerance to abiotic stress (Aroca et al. 2012; Vadez 2014).

In general, under water stress the line T25 have presented similar physiological responses (photosynthetic rate, stomatal conductance, transpiration rate, water use efficiency, leaf water potential as well as the leaf water potential after re-watering) when compared to WT. It could be explained by the fact that the transcription of the *ThAQP* gene was lower in the line T25. It is known that transgene expression is highly variable among lines independently transformed with the same vector. Several factors might be involved in these

phenomena, such as insertion in active chromatin or heterochromatin and hot spots for methylation and silencing by accidental RNAi structures (Day et al. 2000). In addition, it should be considered that in some cases no-correlations between gene transcription and protein patterns have been observed for aquaporin coding genes (Boursiac et al., 2005; Aroca et al., 2005; Muries et al., 2011). Although the *ThAQP* gene is controlled by the constitute 35SCaMV promoter plus an AMV enhancer sequence, these aspects should be taken into consideration, since mRNA synthesis could be influenced by the accumulation of the corresponding encoded protein (Muries et al. 2011). Further studies should be carried out to determine the ThAQP protein abundance and compartmentalization.

The discovery of plant aquaporins has changed the understanding of plant water relations (Maurel and Chrispeels 2001). Nevertheless, the association of aquaporins and plant drought tolerance remains abstruse. Here we have presented a new biotechnological approach by expressing a fungal aquaporin gene in plants for the first time. Our results suggest that fungal genes could be an interesting source for engineering water-deficiency stress tolerance in plants, improving cellular water and CO₂ transport by upholding water balance.

Authors' contributions

PMV, CMA and MPS performed plant transformation and molecular analyses. MPS, OASN and PMV carried out physiological studies. PMV, FJLA and CJU conceived the study and designed vector. MPS, PMV and FJLA analyzed data and wrote manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG). PMV was supported by a fellowship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Ache P, Bauer H, Kollist H, et al (2010) Stomatal action directly feeds back on leaf turgor: new insights into the regulation of the plant water status from non-invasive pressure probe measurements. *Plant Journal*. 62:1072-1082. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04213.x
- Aharon R (2003) Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress. *Plant Cell Online* 15:439–447. doi: 10.1105/tpc.009225
- Andrade CM, Tinoco MLP, Rieth AF et al. (2015) Host-induced gene silencing in the necrotrophic fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology* 65:626–632. doi: 10.1111/ppa.12447
- Aroca R, Amodeo G, Fernández-Illescas S, et al (2005) The role of aquaporins and membrane damage in chilling and hydrogen peroxide induced changes in the hydraulic conductance of maize roots. *Plant Physiology* 137:341–353. doi: 10.1104/pp.104.051045

- Aroca R, Porcel R, Ruiz-Lozano JM (2012) Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions. *J Exp Bot* 63:43–57. doi: 10.1093/jxb/err266
- Ashraf M (2010) Inducing drought tolerance in plants: Recent advances. *Biotechnol Adv* 28:169–183. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.11.005
- Bernacchi CJ, Portis AR, Nakano H, von Caemmerer S, Long SP (2002) Temperature response of mesophyll conductance. Implications for the determination of rubisco enzyme kinetics and for limitations to photosynthesis *in vivo*. *Plant Physiology* 130:1992–1998. doi: 10.1104/pp.008250
- Besse M, Knipfer T, Miller AJ, et al (2011) Developmental pattern of aquaporin expression in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *J Exp Bot* 62:4127–4142. doi: 10.1093/jxb/err175
- Bickford CP, Hanson DT, McDowell NG (2010) Influence of diurnal variation in mesophyll conductance on modelled ^{13}C discrimination: results from a field study. *J Exp Bot* 61:3223–3233. doi: 10.1093/jxb/erq137
- Bienert GP, Thorsen M, Schüssler MD, et al (2008) A subgroup of plant aquaporins facilitate the bi-directional diffusion of $\text{As}(\text{OH})_3$ and $\text{Sb}(\text{OH})_3$ across membranes. *BMC Biol* 6:26. doi: 10.1186/1741-7007-6-26
- Bonfim K, Faria JC, Nogueira EOPL, et al. (2007) RNAi-mediated resistance to bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Mol Plant-Microbe Interact* 20:717–726.
- Boursiac Y (2005) Early effects of salinity on water transport in *Arabidopsis* roots. molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiol* 139:790–805. doi: 10.1104/pp.105.065029

- Bramley H, Turner NC, Siddique KHM (2013) Water use efficiency. In: Genomics and breeding for climate-resilient crops. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 225–268
- Cattivelli L, Rizza F, Badeck F-W, et al (2008) Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *F Crop Res* 105:1–14. doi: 10.1016/j.fcr.2007.07.004
- Chaumont F, Tyerman SD (2014) Aquaporins: highly regulated channels controlling plant water relations. *Plant Physiology* 164:1600–1618. doi: 10.1104/pp.113.233791
- Chaves MM (2002) How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. *Ann Bot* 89:907–916. doi: 10.1093/aob/mcf105
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C (2008) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann Bot* 103:551–560. doi: 10.1093/aob/mcn125
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS (2003) Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Funct Plant Biol* 30:239-264. doi: 10.1071/FP02076
- Cochard H (2002) Xylem embolism and drought-induced stomatal closure in maize. *Planta* 215:466–71. doi: 10.1007/s00425-002-0766-9
- Cui X-H, Hao F-S, Chen H, Chen J, Wang XC (2008) Expression of the *Vicia faba* *VfPIP1* gene in *Arabidopsis thaliana* plants improves their drought resistance. *J Plant Res* 121:207–214. doi: 10.1007/s10265-007-0130-z
- Day CD, Lee E, Kobayashi J, et al (2000) Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are

differentially silenced. *Genes Dev* 14:2869–2880. doi: 10.1101/gad.849600

Edwards K, Johnstone C, Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* 19:1349.

Engel A, Walz T, Agre P (1994) The aquaporin family of membrane water channels. *Curr Opin Struct Biol* 4:545–553. doi: 10.1016/S0959-440X(94)90217-8

Flexas J, Bota J, Loreto F, et al. (2004) Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C(3) plants. *Plant Biol* 6:269–279. doi: 10.1055/s-2004-820867

Flexas J, Niinemets U, Gallé A, et al (2013) Diffusional conductances to CO₂ as a target for increasing photosynthesis and photosynthetic water-use efficiency. *Photosynth Res* 117:45–59. doi: 10.1007/s11120-013-9844-z

Flexas J, Ribas-Carbó M, Bota J, et al (2006a) Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO₂ concentration. *New Phytol* 172:73–82. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01794.x

Flexas J, Ribas-Carbó M, Hanson DT, et al (2006b) Tobacco aquaporin NtAQP1 is involved in mesophyll conductance to CO₂ in vivo. *Plant J* 48:427–439. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02879.x

Gao Z, He X, Zhao B, et al (2010) Overexpressing a putative aquaporin gene from wheat, *TaNIP*, enhances salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 51:767–775. doi: 10.1093/pcp/pcq036

Grassi G, Magnani F (2005) Stomatal, mesophyll conductance and biochemical limitations to

- photosynthesis as affected by drought and leaf ontogeny in ash and oak trees. *Plant, Cell Environ* 28:834–849. doi: 10.1111/j.1365-3040.2005.01333.x
- Hachez C, Heinen RB, Draye X, Chaumont F (2008) The expression pattern of plasma membrane aquaporins in maize leaf highlights their role in hydraulic regulation. *Plant Mol Biol* 68:337–353. doi: 10.1007/s11103-008-9373-x
- Heckwolf M, Pater D, Hanson DT, Kaldenhoff R (2011) The *Arabidopsis thaliana* aquaporin AtPIP1;2 is a physiologically relevant CO₂ transport facilitator. *Plant J* 67:795–804. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04634.x
- Heinen RB, Ye Q, Chaumont F (2009) Role of aquaporins in leaf physiology. *J Exp Bot* 60:2971–2985. doi: 10.1093/jxb/erp171
- Hermosa R, Botella L, Keck E, et al (2011) The overexpression in *Arabidopsis thaliana* of a *Trichoderma harzianum* gene that modulates glucosidase activity, and enhances tolerance to salt and osmotic stresses. *J Plant Physiol* 168:1295–1302. doi: 10.1016/j.jplph.2011.01.027
- Hiwasa-Tanase K, Ezura H (2016) Molecular breeding to create optimized crops: from genetic manipulation to potential applications in plant factories. *Front Plant Sci* 7:539. doi: 10.3389/fpls.2016.00539
- Hopmans JW, Bristow KL (2002) Current capabilities and future needs of root water and nutrient uptake modeling. *Advances in Agronomy* 77: 103–183. doi:10.1016/S0065-2113(02)77014-4
- Horsch R, Fry JE, Hoffmann NL, et al (1985) A simple and general method for transferring genes in to plants. *Science* 227:1229-1231.

- Jang JY, Lee SH, Rhee JY, et al (2007) Transgenic *Arabidopsis* and tobacco plants overexpressing an aquaporin respond differently to various abiotic stresses. *Plant Mol Biol* 64:621–632. doi: 10.1007/s11103-007-9181-8
- Kaldenhoff R, Grote K, Zhu JJ, Zimmermann U (1998) Significance of plasmalemma aquaporins for water-transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 14:121–128.
- Khan MS, Ahmad D, Khan MA (2015) Utilization of genes encoding osmoprotectants in transgenic plants for enhanced abiotic stress tolerance. *Electron J Biotechnol* 18:257–266. doi: 10.1016/j.ejbt.2015.04.002
- Lawlor DW (2002) Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. *Ann Bot* 89:871–885. doi: 10.1093/aob/mcf110
- Lens F, Tixier A, Cochard H, et al (2013) Embolism resistance as a key mechanism to understand adaptive plant strategies. *Curr Opin Plant Biol* 16:287–292. doi: 10.1016/j.pbi.2013.02.005
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25:402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Long SP (2003) Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *J Exp Bot* 54:2393–2401. doi: 10.1093/jxb/erg262
- Lorito M, Woo S, Harman G, Monte E (2010) Translational research on *Trichoderma*: from omics to the field. *Annu Rev Phytopathol* 48:395–417. doi: 10.1146/annurev-phyto-073009-114314

- Lovisolò C, Secchi F, Nardini A, et al (2007) Expression of PIP1 and PIP2 aquaporins is enhanced in olive dwarf genotypes and is related to root and leaf hydraulic conductance. *Physiol Plant* 130:543–551. doi: 10.1111/j.1399-3054.2007.00902.x
- Martinez-Ballesta M del C, Carvajal M (2014) New challenges in plant aquaporin biotechnology. *Plant Sci* 217–218:71–77. doi: 10.1016/j.plantsci.2013.12.006
- Martre P, Morillon R, Barrieu F, et al (2002) Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit. *Plant Physiol* 130:2101–2110. doi: 10.1104/pp.009019
- Matimati I, Verboom GA, Cramer MD (2014) Nitrogen regulation of transpiration controls mass-flow acquisition of nutrients. *J Exp Bot* 65:159–168. doi: 10.1093/jxb/ert367
- Matsuo N, Ozawa K, Mochizuki T (2009) Genotypic differences in root hydraulic conductance of rice (*Oryza sativa* L.) in response to water regimes. *Plant Soil* 316:25–34. doi: 10.1007/s11104-008-9755-5
- Maurel C, Chrispeels MJ (2001) Aquaporins. A molecular entry into plant water relations. *Plant Physiology* 125:135–138. doi: 10.1104/pp.125.1.135
- Maurel C, Santoni V, Luu DT, et al. (2009) The cellular dynamics of plant aquaporin expression and functions. *Curr Opin Plant Biol* 12:690–698. doi: 10.1016/j.pbi.2009.09.002
- Maurel C (1997) Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:399–429. doi: 10.1146/annurev.arplant.48.1.399
- Maurel C, Verdoucq L, Rodrigues O (2016) Aquaporins and plant transpiration. *Plant Cell Environ.* 39: 2580–2587. doi: 10.1111/pce.12814

- McElrone AJ, Bichler J, Pockman WT, et al (2007) Aquaporin-mediated changes in hydraulic conductivity of deep tree roots accessed via caves. *Plant Cell Environ* 30:1411–1421. doi: 10.1111/j.1365-3040.2007.01714.x
- Mcgrath JM, Lobell DB (2013) Reduction of transpiration and altered nutrient allocation contribute to nutrient decline of crops grown in elevated CO₂ concentrations. *Plant Cell Environ* 36:697–705. doi: 10.1111/pce.12007
- Muries B, Faize M, Carvajal M, Martínez-Ballesta MDC (2011) Identification and differential induction of the expression of aquaporins by salinity in broccoli plants. *Mol Biosyst* 7:1322–1335. doi: 10.1039/c0mb00285b
- Nada RM, Abogadallah GM (2014) Aquaporins are major determinants of water use efficiency of rice plants in the field. *Plant Sci* 227:165–180. doi: 10.1016/j.plantsci.2014.08.006
- Nagarajan S, Nagarajan S (2009) Abiotic tolerance and crop improvement. In: *Abiotic Stress Adaptation in Plants*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 1–11. doi: 10.1007/978-90-481-3112-9_1
- Nicolás C, Hermosa R, Rubio B, Rubio B, et al. (2014) *Trichoderma* genes in plants for stress tolerance- status and prospects. *Plant Sci* 228:71–78. doi: 10.1016/j.plantsci.2014.03.005
- Nunes ACS, Kalkmann DC, Aragão FJL (2009) Folate biofortification of lettuce by expression of a codon optimized chicken GTP cyclohydrolase I gene. *Transgenic Res* 18:661–667. doi: 10.1007/s11248-009-9256-1
- Otto B, Uehlein N, Sdorra S, et al (2010) Aquaporin tetramer composition modifies the function of tobacco aquaporins. *J Biol Chem* 285:31253–31260. doi: 10.1074/jbc.M110.115881

- Pou A, Medrano H, Flexas J, Tyerman SD (2013) A putative role for TIP and PIP aquaporins in dynamics of leaf hydraulic and stomatal conductances in grapevine under water stress and re-watering. *Plant Cell Environ* 36:828–843. doi: 10.1111/pce.12019
- Prado K, Maurel C (2013) Regulation of leaf hydraulics: from molecular to whole plant levels. *Front Plant Sci* 4:255. doi: 10.3389/fpls.2013.00255
- RB H, Fry J, NL H (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227:1229–1231. doi: 10.1126/science.227.4691.1229
- Sack L, Holbrook NM (2006) Leaf hydraulics. *Annu Rev Plant Biol* 57:361–381. doi: 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144141
- Sade N, Gebretsadik M, Seligmann R, et al (2010) The role of tobacco Aquaporin1 in improving water use efficiency, hydraulic conductivity, and yield production under salt stress. *Plant Physiol* 152:245–254. doi: 10.1104/pp.109.145854
- Schmidt GW, Delaney SK (2010) Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress. *Mol Genet Genomics* 283:233–241. doi 10.1007/s00438-010-0511-1
- Schuster A, Schmoll M (2010) Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:787–799. doi: 10.1007/s00253-010-2632-1
- Secchi F, Zwieniecki MA (2014) Down-regulation of plasma intrinsic protein1 aquaporin in poplar trees is detrimental to recovery from embolism. *Plant Physiol* 164:1789–1799. doi: 10.1104/pp.114.237511
- Siefritz F (2002) PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: from cellular effects to function in plants. *Plant Cell Online* 14:869–876. doi: 10.1105/tpc.000901

Sinclair TR, Tanner CB, Bennett JM (1984) Water-use efficiency in crop production. *Bioscience* 34:36–40. doi: 10.2307/1309424

Steudle E (1994) Water transport across roots. *Plant Soil* 167:79–90. doi: 10.1007/BF01587602

Steudle E, Peterson CA (1998) How does water get through roots? *J Exp Bot* 49:775–788. doi: 10.1093/jxb/49.322.775

Tanaka M, Wallace IS, Takano J, et al. (2008) NIP6;1 is a boric acid channel for preferential transport of boron to growing shoot tissues in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20:2860–2875. doi: 10.1105/tpc.108.058628

Terashima I, Ono K (2002) Effects of HgCl₂ on CO₂ dependence of leaf photosynthesis: evidence indicating involvement of aquaporins in CO₂ diffusion across the plasma membrane. *Plant Cell Physiol* 43:70–78.

Tholen D, Zhu X-G (2011) The mechanistic basis of internal conductance: a theoretical analysis of mesophyll cell photosynthesis and CO₂ diffusion. *Plant Physiol* 156: 90–105. doi: 10.1104/pp.111.172346

Tomás M, Medrano H, Brugnoli E, et al (2014) Variability of mesophyll conductance in grapevine cultivars under water stress conditions in relation to leaf anatomy and water use efficiency. *Aust J Grape Wine Res* 20:272–280. doi: 10.1111/ajgw.12069

Uehlein N, Otto B, Hanson DT, et al (2008) Function of *Nicotiana tabacum* aquaporins as chloroplast gas pores challenges the concept of membrane CO₂ permeability. *Plant Cell* 20:648–657. doi: 10.1105/tpc.107.054023

Vadez V (2014) Root hydraulics: The forgotten side of roots in drought adaptation. *F Crop*

Res 165:15–24. doi: 10.1016/j.fcr.2014.03.017

Van Rensburg L, Krüger GHJ (1993) Comparative analysis of differential drought stress-induced suppression of and recovery in carbon dioxide fixation: stomatal and non-stomatal limitation in *Nicotiana tabacum* L. J Plant Physiol 142:296–306. doi: 10.1016/S0176-1617(11)80426-8

Vandeleur RK, Sullivan W, Athman A, et al (2014) Rapid shoot-to-root signalling regulates root hydraulic conductance via aquaporins. Plant Cell Environ 37:520–538. doi: 10.1111/pce.12175

Vieira PM, Coelho ASG, Steindorff AS, et al (2013) Identification of differentially expressed genes from *Trichoderma harzianum* during growth on cell wall of *Fusarium solani* as a tool for biotechnological application. BMC Genomics 14:177. doi: 10.1186/1471-2164-14-177

Wu W, Peng X, Wang D (2009) Isolation of a plasmalemma aquaporin encoding gene *StPIP1* from *Solanum tuberosum* L. and its expression in transgenic tobacco. Agric Sci China 8:1174–1186. doi: 10.1016/S1671-2927(08)60326-0

Yu Q, Hu Y, Li J, Wu Q, Lin Z. (2005) Sense and antisense expression of plasma membrane aquaporin BnPIP1 from *Brassica napus* in tobacco and its effects on plant drought resistance. Plant Sci 169:647–656. doi: 10.1016/j.plantsci.2005.04.013

Zhou S, Hu W, Deng X, et al (2012) Overexpression of the wheat aquaporin gene, *TaAQP7* enhances drought tolerance in transgenic tobacco. PLoS One 7:e52439. doi: 10.1371/journal.pone.0052439

Figure captions

Figure 1. A) Schematic representation of the pC3300-Aqua used to transform tobacco plants, containing the aquaporin (*ThAQP*) and *bar* genes under control of the 35S promoter of Cauliflower mosaic virus (35SCaMV). B) Plants were analyzed by PCR for detection of the *ThAQP* gene using the primers AQUA2F and AQUA2R. PCR was performed with non-transgenic plants (WT), plasmid vector (pC3300-Aqua) and transgenic lines (T7, T24, T25 and T51).

Figure 2. Physiological characterization of transgenic (T7, T24, T25 and T51; T₂ generation) and non-transgenic lines (WT) in response to water shortage for a period of nine days. Bars represent \pm SE. In “E”, columns with the same letter are not statistically different. *P < 0.05, n = 12.

Figure 3. Leaf water potential and relative water content in transgenic (T7, T24, T25 and T51; T₂ generation) and non-transgenic lines (WT) in response to water shortage for a period of nine days. Bars represent \pm SE. *P < 0.05, n = 12.

Figure 4. Biometric characterization performed with transgenic (T7, T24, T25 and T51; T₂ generation) and non-transgenic lines (WT) after nine days under water stress. Bars represent \pm SE. Columns with the same letter are not statistically different. P < 0.05, n = 12.

Figure 5. Transgenic (T7, T24, T25 and T51; T₂ generation) and non-transgenic lines (WT) were maintained under water shortage for nine days in which the relative water soil content

was measured (A). After this period, plants were re-watered and leaf water potential (Ψ_w) was measured for four hours (B). Bars represent \pm SE. * $P < 0.05$, $n = 12$.

Figure 6. Expression of the *ThAQP* gene in transgenic and non-transgenic (WT) tobacco lines, determined by quantitative real-time PCR. Data represent means of three biological and three technical replications, related to control. Bars represent \pm SE. Columns with the same letter are not statistically different. $P < 0.05$, $n = 9$.

Figura 1

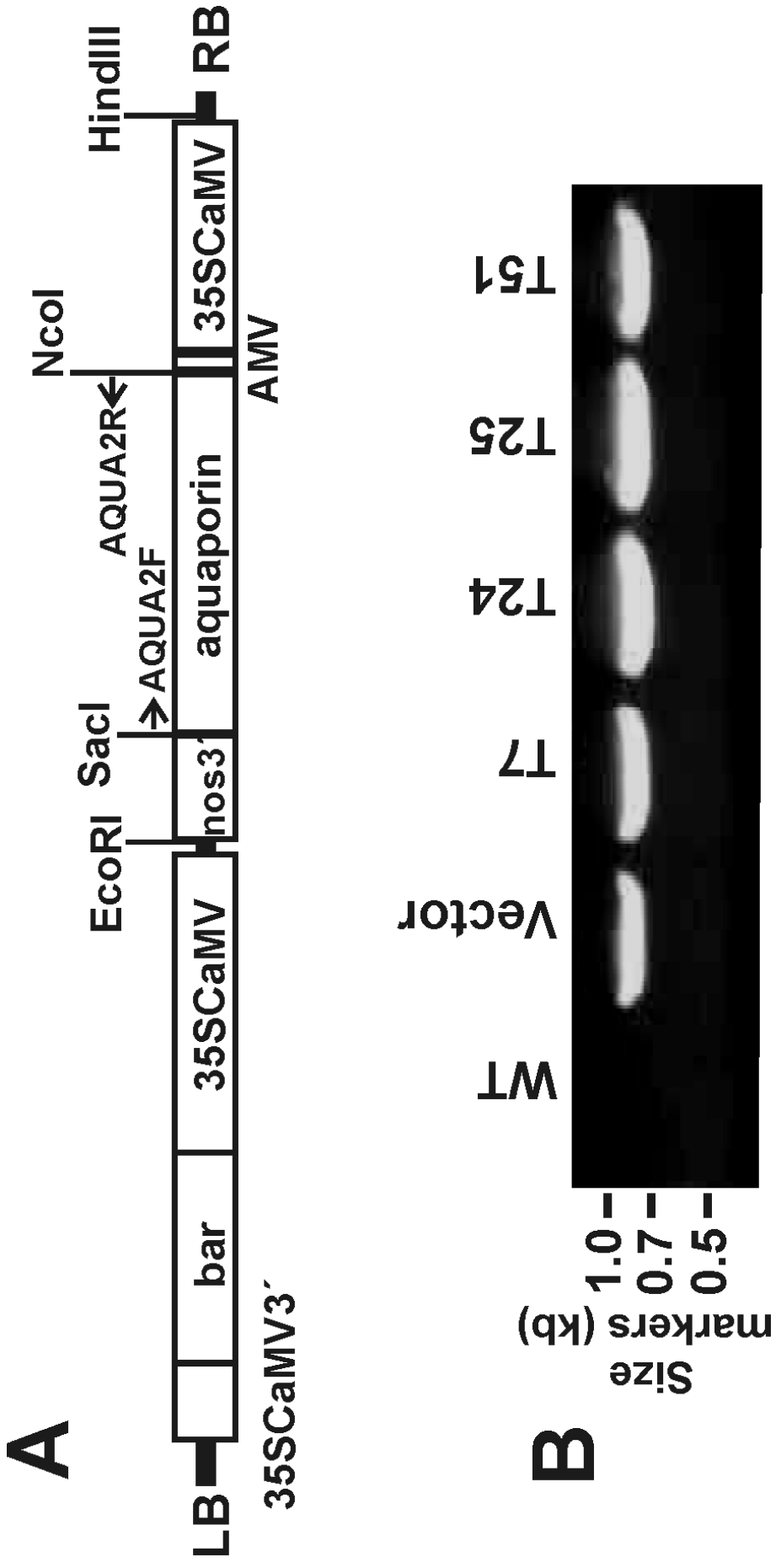


Figura 2

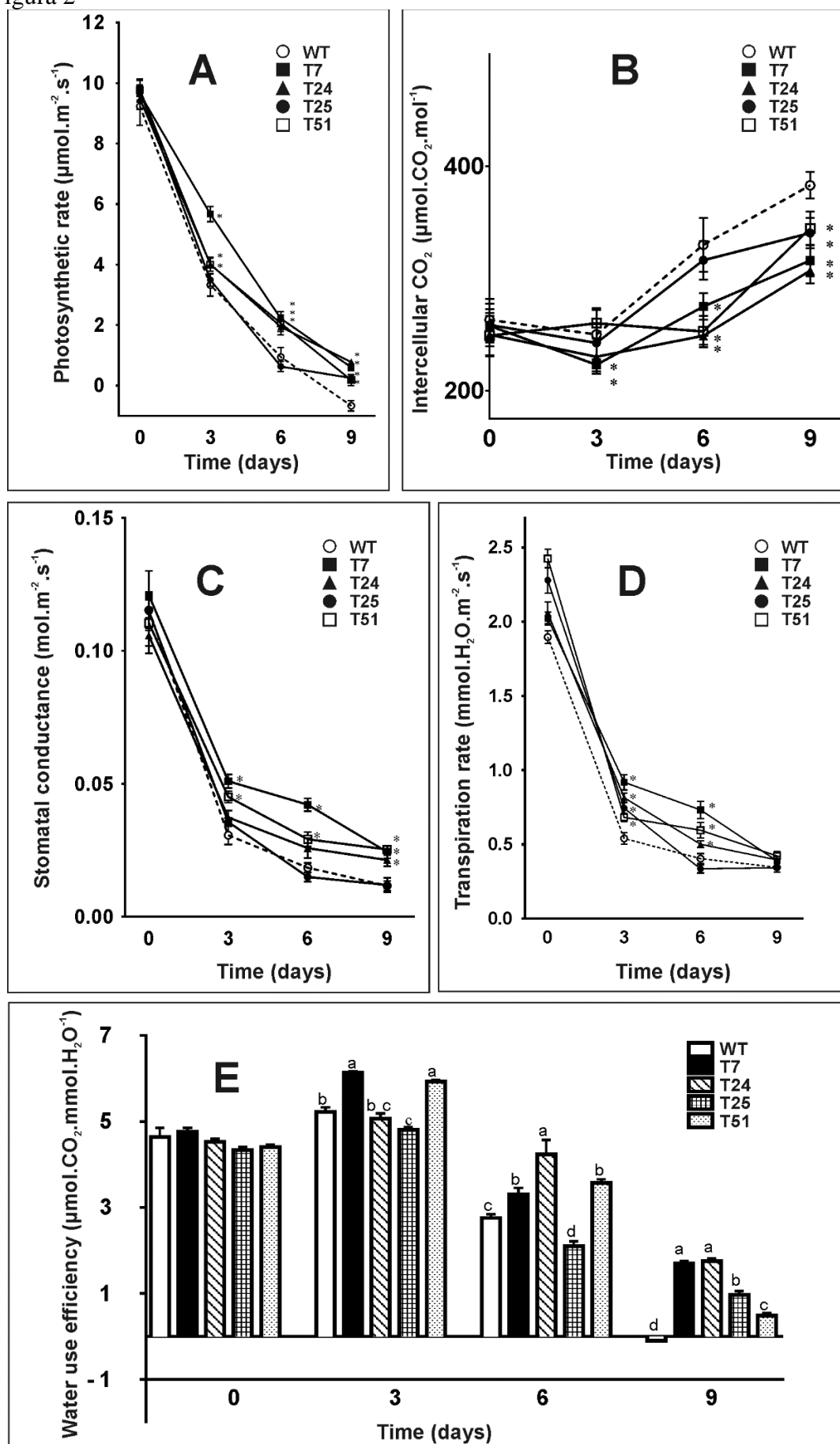


Figura 3

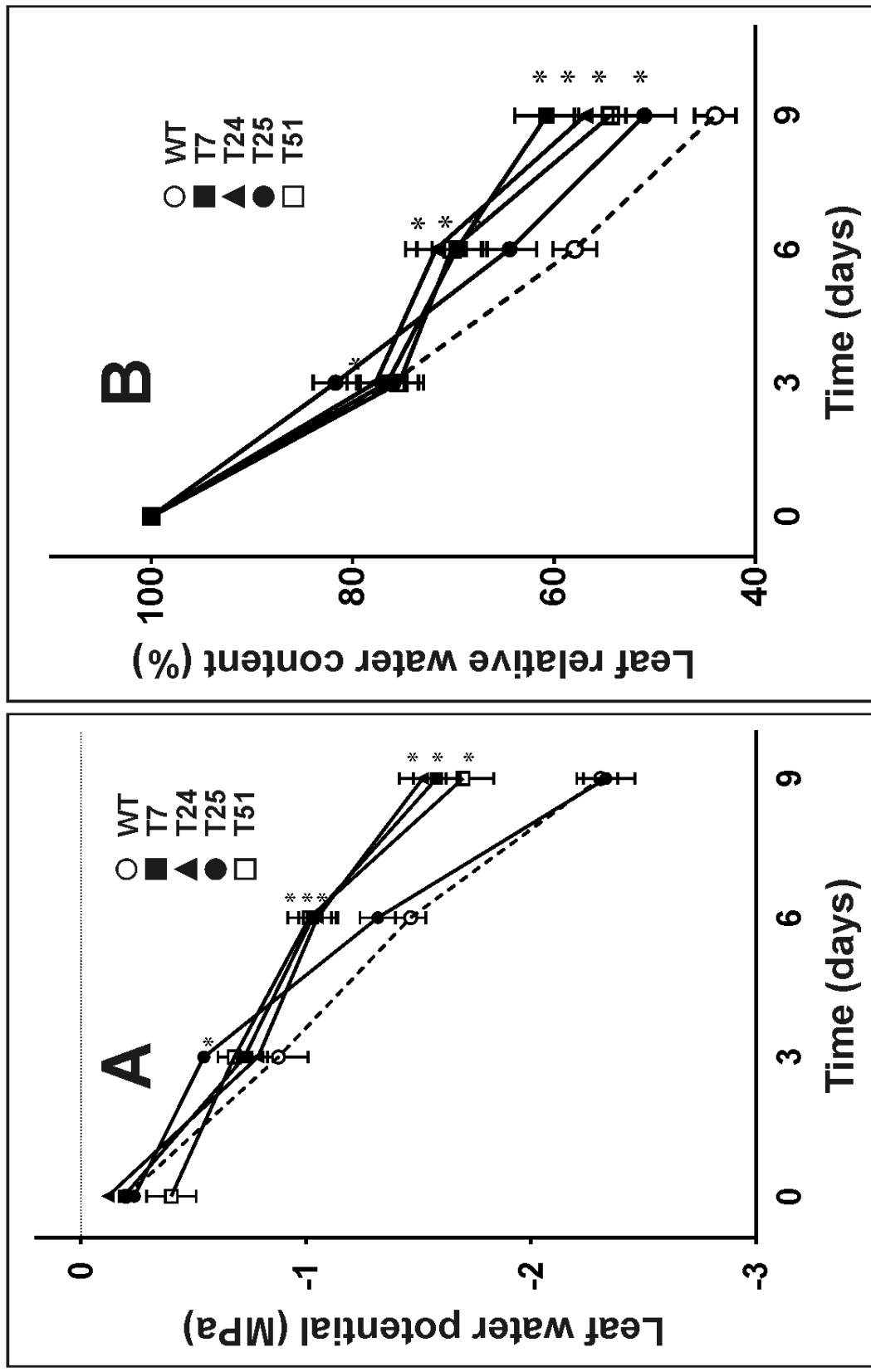
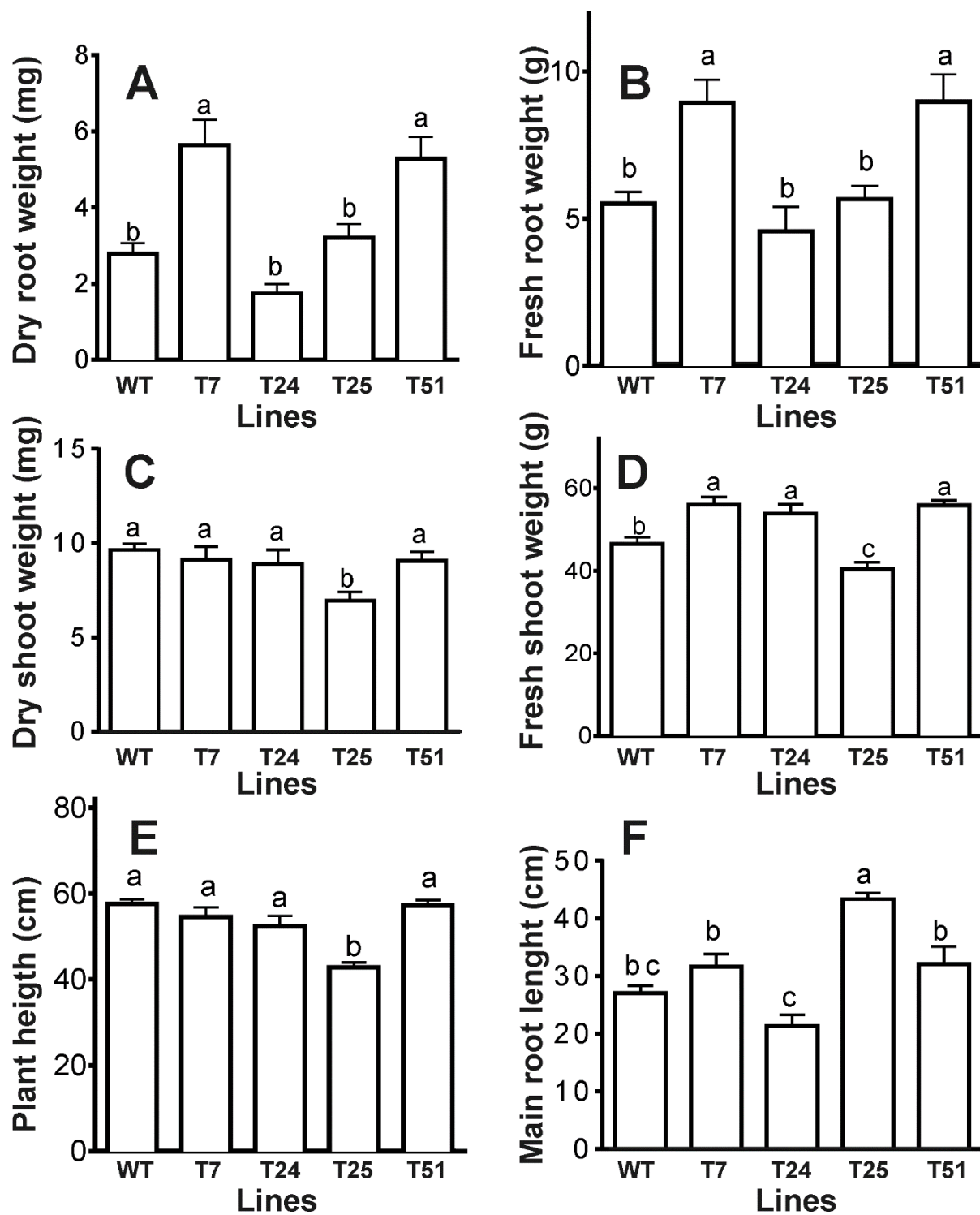


Figura 4



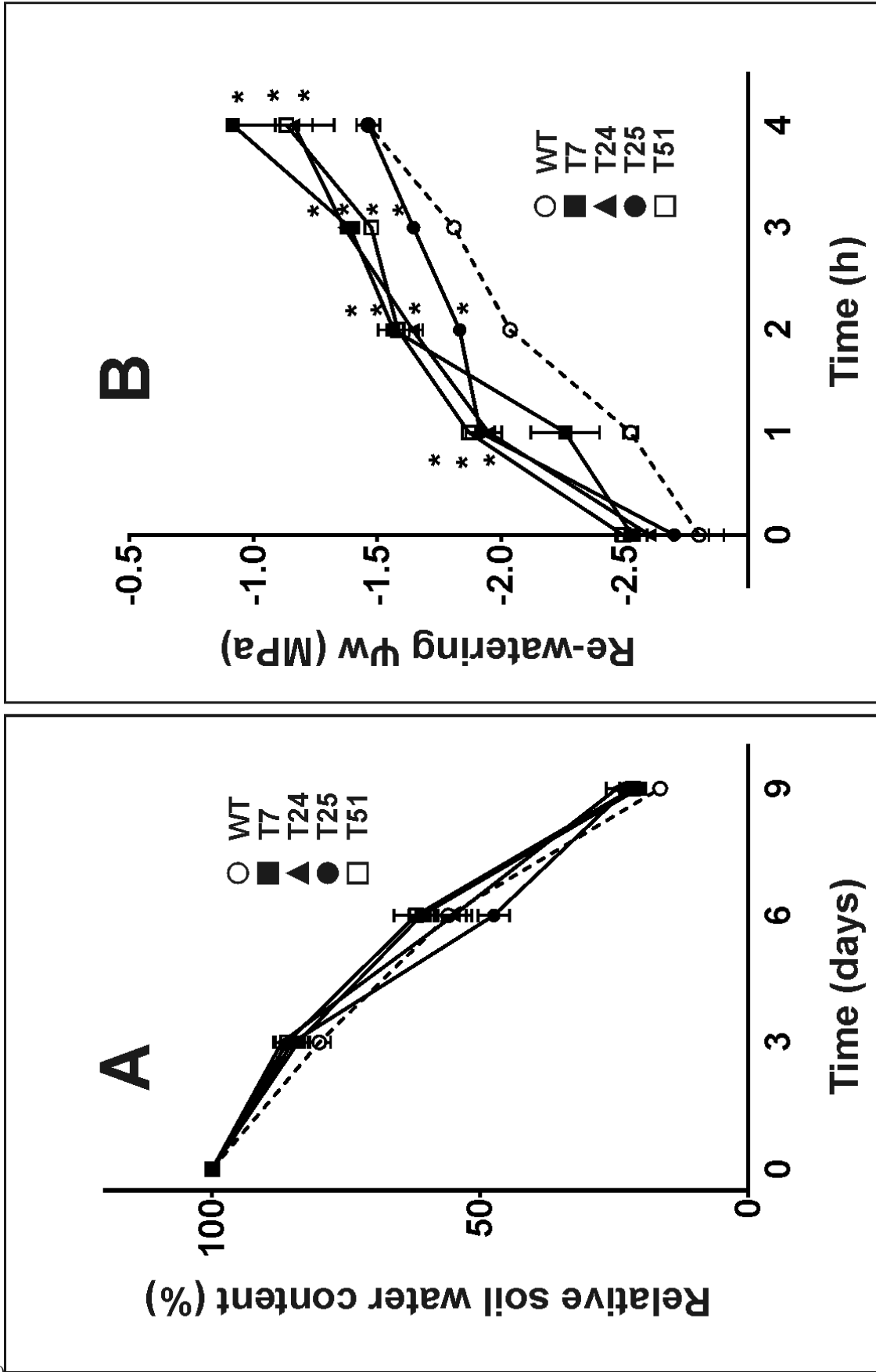


Figura 5

Figura 6

