



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**MISRAEL VIEIRA SALES**

**EFEITOS DA LECTINA DE *Canavalia maritima* (ConM) NA BIODISPONIBILIDADE  
DO FITOHORMÔNIO ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO (AIA) EM SEGMENTOS  
FOLIARES DE *Nicotiana tabacum* CULTIVADOS *IN VITRO***

**FORTALEZA**

**2024**

MISRAEL VIEIRA SALES

EFEITOS DA LECTINA DE *Canavalia maritima* (ConM) NA BIODISPONIBILIDADE DO  
FITOHORMÔNIO ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO (AIA) EM SEGMENTOS FOLIARES DE  
*Nicotiana tabacum* CULTIVADOS *IN VITRO*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha.

Coorientadora: Profa. Dra. Cristina Paiva da Silveira Carvalho.

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- S155e Sales, Misrael Vieira.  
Efeitos da lectina de *Canavalia maritima* (ConM) na biodisponibilidade do fitohormônio ácido indol-3-acético (AIA) em segmentos foliares de *Nicotiana tabacum* cultivados in vitro / Misrael Vieira Sales. – 2024.  
108 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2024.  
Orientação: Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha.  
Coorientação: Profa. Dra. Cristina Paiva da Silveira Carvalho.
1. Auxina. 2. Fatores de transcrição. 3. Interação fisiológica. I. Título.

CDD 572

---

MISRAEL VIEIRA SALES

EFEITOS DA LECTINA DE *Canavalia maritima* (ConM) NA BIODISPONIBILIDADE DO  
FITOHORMÔNIO ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO (AIA) EM SEGMENTOS FOLIARES DE  
*Nicotiana tabacum* CULTIVADOS *IN VITRO*

Teste apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovado em: 30/08/2024

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Humberto Henrique de Carvalho  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Eduardo Henrique Salviano Bezerra  
Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM)

---

Prof. Dr. Cléberson de Freitas Fernandes  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

A Deus.

Aos meus pais, Antônia e Manoel

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por todas as bênçãos concedidas durante toda minha vida. Tenho certeza que sempre iluminou meus caminhos e me direcionou para boas escolhas, me mantendo com fé, saúde e na esperança de um bom futuro. Sei que estará sempre ao meu lado e por isso nunca desistirei dos meus sonhos.

Aos meus maravilhosos pais, Antônia e Manoel, por todo amor, cuidado, educação, compreensão, princípios ensinados e apoio incondicional. Sou e sempre serei muito grato por tudo que sempre fizeram por mim. Tenho a certeza de que fariam tudo para me ver feliz e por eles lutarei sempre.

À minha querida irmã, Michelle: você sempre me apoiou, incentivou e acreditou no meu potencial. Todo apoio vindo de você foi extremamente importante.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha, por ter sido tão receptivo quando o procurei para orientação. Por toda atenção, paciência, compreensão, confiança e ensinamentos dados. Sua ajuda e incentivo foram essenciais para realização deste trabalho. Muito obrigado.

À minha Coorientadora, Profa. Dra. Cristina Paiva da Silveira Carvalho, por me receber tão bem no laboratório o qual trabalha e por sua disponibilidade. Pela paciência, confiança e conhecimentos transmitidos.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Humberto Carvalho, Prof. André Coelho, Dr. Eduardo Bezerra e Prof. Cléberson Fernandes por toda atenção e conhecimentos transmitidos.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, por todos os ensinamentos transmitidos, os quais foram essenciais durante o curso de doutorado.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Levi, Bia, Ester, Maqsood e Victor pela amizade, apoio, incentivo, conhecimentos transmitidos e pelos momentos de alegria que vivemos.

À Dra. Talita, pela ajuda intelectual e excelentes conselhos nos momentos de dúvidas e dificuldades durante o doutorado. Sendo extremamente importantes para a conclusão desta dissertação.

Aos colegas do Laboratório de Biocristalografia, Roberta, Francisco, Kassia, Leonardo, Bia, Gabriel pela amizade, pelo bom convívio, pela ajuda nos momentos difíceis e auxílio nas atividades, pelo apoio e troca de conhecimentos. Foi muito bom poder fazer parte desse Grupo.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular, Wallady, Luis, Andrew, Leonardo, Gustavo e Hector, agradeço pelo suporte nos momentos desafiadores e pela assistência nas atividades. O apoio mútuo e a troca de conhecimentos foram fundamentais. Foi um grande privilégio fazer parte deste grupo.

Ao Professor André Coelho, responsável pelo Laboratório de Biologia Molecular, expresso minha gratidão apoio e dedicação. Sua liderança foi essencial para o desenvolvimento do nosso trabalho e para o crescimento de cada um de nós. Agradeço por tornar o ambiente de pesquisa tão inspirador e enriquecedor.

Aos meus queridos amigos: Bruno Burnier, Nadine, Aniele, Mayara, Adriane, Lucas, Gustavo que acompanharam muitos momentos importantes da minha vida. Pela amizade, confiança, apoio, conselhos, incentivo, por todos os incríveis momentos que já vivemos juntos. Levarei vocês para sempre comigo.

À Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade de cursar uma graduação e seguir para um curso de mestrado, adquirindo muito aprendizado durante anos, contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos durante o curso de Doutorado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*“O caráter não é construído em momentos de conforto e conveniência, mas em momentos de desafio e controvérsia.”*

**Martin Luther King Jr.**



## RESUMO

Lectinas são proteínas amplamente distribuídas nas plantas e particularmente abundantes em cotilédones de algumas espécies. Nas leguminosas, essas proteínas possuem uma região hidrofóbica altamente conservada, que pode intensificar suas interações com moléculas hidrofóbicas, como hormônios vegetais. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a função fisiológica da ConM, uma lectina isolada das sementes de *Canavalia maritima*, em interação com a auxina ácido indol-3-acético (AIA), utilizando segmentos foliares de *Nicotiana tabacum* cultivados *in vitro*. Os segmentos foliares foram infiltrados a vácuo com uma solução contendo 20  $\mu$ M de AIA e diferentes concentrações da ConM (5  $\mu$ M, 20  $\mu$ M e 40  $\mu$ M), sendo em seguida cultivados em meio MS sem regulador de crescimento, por 28 dias a 26 °C, com fotoperíodo de 12 horas. Foram analisados o acúmulo de biomassa, pigmentos fotossintéticos, atividade enzimática antioxidante e peroxidação lipídica. A expressão dos genes regulados pela auxina (ARF1, IAA14, IAA17 e SAUR59) foi quantificada por qRT-PCR. Os dados foram analisados estatisticamente, utilizando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade, por meio do software Prism®. Verificou-se que a concentração de 40  $\mu$ M da ConM reduziu o conteúdo de clorofila *a* em 33,52% e aumentou o conteúdo de clorofila *b* em 24,29%, em relação ao controle. Concentrações da ConM inferiores a 40  $\mu$ M promoveram a indução de calos, enquanto 40  $\mu$ M da ConM resultou em uma redução significativa na formação dos calos e da biomassa fresca e seca. Além disso, as concentrações de 20  $\mu$ M e 40  $\mu$ M da ConM aumentaram a peroxidação lipídica nos segmentos foliares em 25% e 50%, respectivamente. Nos calos formados sob tratamento com 5  $\mu$ M da ConM, observou-se um aumento de 39,59% das proteínas solúveis, enquanto com 40  $\mu$ M houve uma redução de 25,53%. Nos segmentos foliares tratados com 20  $\mu$ M da ConM, verificou-se um aumento significativo na atividade das enzimas APX (16,77%), CAT (82,76%) e POX (56,34%). Diferentes concentrações da ConM alteraram de forma significativa os padrões de expressão dos genes estudados. No tempo 0h, as concentrações de 5  $\mu$ M e 20  $\mu$ M da ConM elevaram a expressão dos genes ARF1 e IAA14, enquanto a concentração de 40  $\mu$ M reprimiu a expressão de ARF1. Nas primeiras 48 horas, houve um aumento na expressão de IAA14, porém, na concentração de 40  $\mu$ M da ConM observou-se uma redução significativa na expressão desse gene, indicando uma modulação negativa. A interação da ConM com o AIA reduziu a biodisponibilidade da auxina, desencadeando uma resposta molecular através da expressão de genes regulados pela auxina, o que levou a alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas significativas.

**Palavras-chave:** auxina; fatores de transcrição; interação fisiológica.

## ABSTRACT

Lectins are proteins widely distributed in plants and are particularly abundant in the cotyledons of some species. In legumes, these proteins have a highly conserved hydrophobic region, which can enhance their interactions with hydrophobic molecules, such as plant hormones. The present study aimed to evaluate the physiological function of ConM, a lectin isolated from the seeds of *Canavalia maritima*, in interaction with the auxin indole-3-acetic acid (IAA), using leaf segments of *Nicotiana tabacum* cultured in vitro. The leaf segments were vacuum-infiltrated with a solution containing 20  $\mu$ M of IAA and different concentrations of ConM (5  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, and 40  $\mu$ M), and then cultured in MS medium without growth regulators for 28 days at 26°C, with a 12-hour photoperiod. Biomass accumulation, photosynthetic pigments, antioxidant enzyme activity, and lipid peroxidation were analyzed. The expression of auxin-regulated genes (ARF1, IAA14, IAA17, and SAUR59) was quantified by qRT-PCR. Data were statistically analyzed using Tukey's test at 5% probability, via Prism® software. It was found that the concentration of 40  $\mu$ M of ConM reduced chlorophyll a content by 33.52% and increased chlorophyll b content by 24.29% compared to the control. Concentrations of ConM below 40  $\mu$ M promoted callus induction, while 40  $\mu$ M of ConM significantly reduced callus formation and fresh and dry biomass. Furthermore, ConM concentrations of 20  $\mu$ M and 40  $\mu$ M increased lipid peroxidation in leaf segments by 25% and 50%, respectively. In calli formed under 5  $\mu$ M of ConM treatment, a 39.59% increase in soluble proteins was observed, while 40  $\mu$ M resulted in a 25.53% reduction. In leaf segments treated with 20  $\mu$ M of ConM, significant increases in the activity of APX (16.77%), CAT (82.76%), and POX (56.34%) enzymes were observed. Different concentrations of ConM significantly altered the expression patterns of the studied genes. At 0h, ConM concentrations of 5  $\mu$ M and 20  $\mu$ M increased the expression of ARF1 and IAA14, while the 40  $\mu$ M concentration repressed ARF1 expression. In the first 48 hours, IAA14 expression increased; however, at the 40  $\mu$ M concentration, a significant reduction in this gene's expression was observed, indicating negative modulation. The interaction of ConM with IAA reduced auxin bioavailability, triggering a molecular response through the expression of auxin-regulated genes, leading to significant morphological, biochemical, and physiological changes.

**Keywords:** auxin; transcription factors; physiological interaction.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Grupo de proteínas de ligação a carboidratos.....	16
Figura 2	– Representação esquemática das classes de lectinas de plantas.....	18
Figura 3	– Representação esquemática da distribuição subcelular das lectinas clássica e lectinas induzidas por estresse em células vegetais. ....	19
Figura 4	– Representação esquemática das aplicações das lectinas vegetais.....	22
Figura 5	– Diagrama simplificado da árvore filogenética da família <i>Leguminosae</i> .....	26
Figura 6	– Diagrama da topologia das dobras de lectinas de leguminosas.....	27
Figura 7	– Características da ConA e suas interfaces de dimerização e tetramerização .....	28
Figura 8	– <i>Canavalia maritima</i> em seu habitat natural:.....	29
Figura 9	– Processo de maturação de ConA por permutação circular e estrutura da pró-ConA .....	32
Figura 10	– Interação das lectinas de leguminosas com moléculas hidrofóbicas.....	34
Figura 11	– Estrutura de auxinas naturais e sintéticas .....	37
Figura 12	– As vias de sinalização de auxina extracelulares e intracelulares em plantas....	41
Figura 13	– Os principais componentes na percepção e sinalização da auxina.....	43
Figura 14	– Esquema ilustrativo para a determinação da atividade hemaglutinante para a lectina de <i>Canavalia maritima</i> (ConM).....	48
Figura 15	– Segmentos foliares de <i>Nicotiana tabacum</i> tratados com 20 $\mu$ M de AIA e 5, 20 ou 40 $\mu$ M da ConM. ....	55
Figura 16	– Determinação da biomassa fresca e seca dos calos gerados a partir de segmentos foliares de <i>Nicotiana tabacum</i> infiltrados com ConM.....	56
Figura 17	– Placa com segmentos foliares de <i>Nicotina tabacum</i> infiltrados com a ConM.	58
Figura 18	– Determinação dos teores de pigmentos fotossintéticos em segmentos foliares de <i>Nicotiana tabacum</i> na presença da ConM.....	60

Figura 19 – Avaliação da peroxidação lipídica em segmentos foliares de <i>Nicotiana tabacum</i> na presença da ConM.....	61
Figura 20 – Quantificação de proteínas solúveis e atividade enzimática das enzimas ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) e peroxidase (POX) em segmentos foliares e calos de <i>Nicotiana tabacum</i> . ....	63
Figura 21 – Análise dos níveis de expressão dos genes NARF1, IAA14, IAA17 e SAUR59 em segmentos foliares de <i>Nicotiana tabacum</i> .....	66
Figura 22 – Esquema ilustrativo da modulação da concentração da auxina no tecido vegetal pela lectina.....	68
Figura 23 – Análise da variação temporal dos níveis de expressão dos genes NARF1, IAA14, IAA17 e SAUR59 em segmentos foliares de <i>Nicotiana tabacum</i> .....	70

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

2,4D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
4-Cl-AIA	ácido 4-cloroindol-3-acético
AIA	ácido indol-3-acético
AIB	ácido indol-3-butírico
ANA	ácido 1-naftalenoacético
MCPA	ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético
PAA	ácido fenilacético

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	14
2	REVISÃO DA LITERATURA .....	16
2.1	Lectinas .....	16
2.1.1	<i>Lectinas vegetais</i> .....	18
2.1.2	<i>Aplicações biológicas das lectinas vegetais</i> .....	21
2.1.3	<i>Papel das lectinas nas plantas</i> .....	24
2.1.4	<i>Lectinas de leguminosa</i> .....	25
2.1.5	<i>Canavalia maritima</i> (Aubl.) .....	29
2.1.6	<i>Síntese das lectinas da subtribo Diocleinae</i> .....	31
2.1.7	<i>Aspectos estruturais da interação das lectinas da subtribo Diocleinae com moléculas hidrofóbicas</i> .....	33
2.2	Hormônios vegetais.....	35
2.2.1	<i>Auxinas</i> .....	36
2.2.2	<i>Sinalização das auxinas em plantas</i> .....	39
2.2.3	<i>Regulação transcricional mediada pelas auxinas</i> .....	42
3	OBJETIVOS .....	46
3.1	Objetivo geral .....	46
3.2	Objetivos específicos .....	46
4	MATERIAIS E METODOS .....	47
4.1	Purificação das lectinas .....	47
4.1.1	<i>Obtenção do material biológico e extração protéica</i> .....	47
4.1.2	<i>Cromatografia de afinidade em gel de Sephadex G-100</i> .....	47
4.2	Deteção da atividade hemaglutinante .....	48
4.3	Cultivo <i>in vitro</i> dos explantes foliares de <i>Nicotiana tabacum</i> .....	49
4.3.1	<i>Obtenção e desinfestação do material vegetal</i> .....	49
4.3.2	<i>Infiltração à vácuo dos segmentos foliares de fumo em solução suplementada com AIA e lectina</i> .....	49
4.3.3	<i>Avaliação do desenvolvimento dos explantes</i> .....	50
4.4	Peroxidação de lipídeos .....	50
4.5	Extração de Proteínas Totais.....	51
4.6	Análise das enzimas do sistema antioxidante.....	51

4.6.1	<i>Atividade da Ascorbato Peroxidase (APX)</i> .....	51
4.6.2	<i>Atividade da Catalase (CAT)</i> .....	51
4.6.3	<i>Atividade da Peroxidase do Guaiacol (POX)</i> .....	52
4.7	<b>Estimativa das Concentrações de Pigmentos Fotossintéticos</b> .....	52
4.8	<b>Análise de expressão de genes relacionados com a resposta ao fitohormônio AIA</b> .....	52
4.8.1	<i>Extração do RNA total e síntese de cDNA</i> .....	53
4.8.2	<i>PCR em tempo real</i> .....	53
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	54
5.1	<b>Efeito da interação da ConM com o AIA em segmentos foliares de <i>N. tabacum</i> cultivos <i>in vitro</i></b> .....	54
5.2	<b>Conteúdo de pigmentos fotossintéticos de segmentos foliares na presença da CoM</b> .....	58
5.3	<b>Efeito da ConM nas membranas dos segmentos foliares de <i>N. tabacum</i></b> .....	58
5.4	<b>Efeito oxidativo da ConM em segmentos foliares e calos de <i>N. tabacum</i></b> .....	62
5.5	<b>Efeito da ConM na expressão de genes regulados pela auxina em segmentos foliares de <i>Nicotiana tabacum</i></b> .....	65
5.6	<b>Variações temporais nos perfis de expressão dos genes em segmentos foliares de <i>N. tabacum</i> em resposta a tratamentos com lectina</b> .....	69
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	72
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	73
	<b>APÊNDICE A - LISTA DE PRIMERS USADOS PARA ANÁLISE DA qRT-PCR</b> .....	94
	<b>APÊNDICE B – MANUSCRITO DO ARTIGO DA TESE</b> .....	95

## 1 INTRODUÇÃO

As lectinas são proteínas amplamente distribuídas na natureza, encontradas em plantas, fungos, vírus, bactérias e animais. Elas são proteínas ou glicoproteínas que se ligam de forma específica a carboidratos ou glicoconjugados, sem a necessidade de catalisar reações químicas. As lectinas são relevantes na biotecnologia devido às suas inúmeras aplicações em áreas como bioquímica, biologia celular e molecular, imunologia, farmacologia, medicina e análises clínicas, além de terem potenciais usos futuros (CAVADA *et al.*, 2019; COELHO *et al.*, 2017; HASHIM; JAYAPALAN; LEE, 2017; TSANEVA; VAN DAMME, 2020; VAN DAMME, 2022).

A presença de lectinas em plantas é observada desde organismos não vasculares, como briófitas, até organismos mais complexos, como gimnospermas e angiospermas. A principal função das lectinas nas plantas é a defesa contra patógenos. Com a descoberta de várias centenas de lectinas e novas estruturas tridimensionais disponíveis, tornou-se evidente que há múltiplos mecanismos moleculares pelos quais duas lectinas distintas reconhecem o mesmo açúcar ou duas lectinas da mesma planta ligam-se a diferentes açúcares (ABHINAV; VIJAYAN, 2014; CHRISPEELS; RAIKHEL, 1991; NAITHANI *et al.*, 2021; VAN HOLLE; VAN DAMME, 2019).

Em relação às plantas, a família das leguminosas apresenta lectinas com alta homologia e similaridade. No entanto, pequenas alterações nas sequências de aminoácidos podem levar a diferentes modos de associações quaternárias. As lectinas de leguminosas contêm uma região estrutural hidrofóbica altamente conservada, permitindo interações com outras moléculas e desempenhando um papel biológico importante na interação com moléculas hidrofóbicas. A função ou funções biológicas das lectinas em plantas ainda não foram definitivamente respondidas, mesmo que frequentemente questionadas (BRINDA *et al.*, 2004; DELATORRE *et al.*, 2007; MORENO *et al.*, 2006; RÜDIGER; GABIUS, 2001).

Desde a descoberta das lectinas, os cientistas têm se interessado por seus potenciais papéis. Com o avanço da pesquisa, descobriu-se que muitas lectinas vegetais não só desempenham um papel na própria planta, como armazenamento de nitrogênio ou como fatores de reconhecimento específicos, mas também podem interagir com glicoconjugados de outros organismos, interferindo em seu funcionamento normal. No entanto, ainda há muito a ser compreendido sobre o papel fisiológico das lectinas em relação às plantas, apesar do amplo conhecimento sobre sua expressão gênica, síntese e estrutura. A ênfase tem sido dada aos eventos que ocorrem fora da célula vegetal, especialmente com as lectinas de leguminosas, que



se ligam de forma mais eficaz a oligossacarídeos que não estão presentes nas plantas (SCHUTTER *et al.*, 2017; PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

No campo das pesquisas estruturais de lectinas, Delatorre e colaboradores (2013) sugeriram que a lectina da *Canavalia maritima* (ConM) regula a disponibilidade do ácido indole-3-acético (AIA) durante os primeiros estágios do desenvolvimento das plântulas, revelando um possível novo papel fisiológico para essas proteínas. Observou-se que o AIA se localiza no sítio de ligação da ConM, cercado pelos resíduos Ser108 e Asn131, e que essa interação pode tornar o fitohormônio indisponível para a célula, protegendo as raízes de sua atividade inibitória. Este novo papel das lectinas de leguminosas pode representar um mecanismo adicional pelo qual os níveis de AIA são reduzidos nas fases posteriores da germinação das sementes. Além disso, os níveis elevados de AIA, induzidos por patógenos produtores de ácido indol acético bacteriano (BIPS), podem estar associados ao desenvolvimento de doenças em várias espécies de plantas, sugerindo que a interação das lectinas com AIA também poderia atuar como um mecanismo de defesa contra esses patógenos (DELATORRE *et al.*, 2013).

A auxina atua de maneira multifuncional em diversas concentrações, resultando em diferentes efeitos no desenvolvimento das plantas. Em concentrações mais baixas, a auxina estimula o alongamento celular, promovendo o crescimento de certos tecidos vegetais. Em contrapartida, concentrações mais elevadas de auxina podem inibir o alongamento celular e favorecer a divisão celular, contribuindo para a formação de novos tecidos e (BHALERAO; BENNETT, 2003). A regulação do desenvolvimento pela auxina é específica para cada tecido, uma vez que diferentes tecidos vegetais apresentam sensibilidades distintas ao hormônio, permitindo crescimento diferencial e respostas de desenvolvimento que são cruciais para a arquitetura e adaptabilidade da planta.

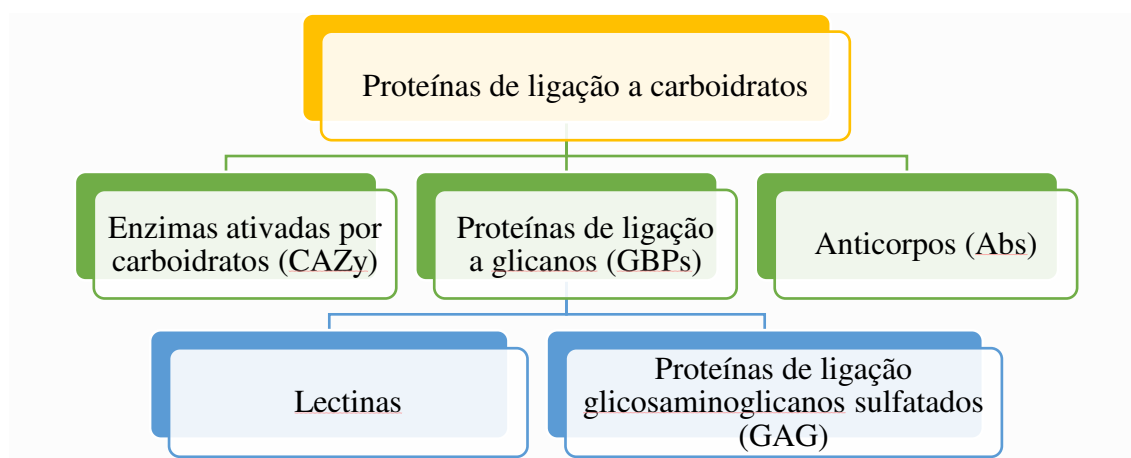
Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a interação da ConM, isolada das sementes de *C. maritima*, com a auxina ácido indol-3-acético (AIA) e seu impacto na biodisponibilidade do fitohormônio em segmentos foliares de *N. tabacum* cultivados *in vitro*. O estudo busca investigar como a lectina de leguminosa interage com moléculas biologicamente relevantes para a fisiologia das plantas. A análise da interação entre a ConM e a auxina AIA poderá revelar funções adicionais das lectinas vegetais, além de sua capacidade de se ligar a açúcares na superfície celular. Esse enfoque poderá descobrir novos mecanismos pelos quais as lectinas influenciam processos de desenvolvimento e defesa nas plantas, ampliando a compreensão sobre o papel multifuncional dessas proteínas na fisiologia vegetal.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Lectinas

As lectinas são um conjunto heterogêneo de proteínas que têm a capacidade de se ligar a carboidratos. Os carboidratos são reconhecidos por três grupos gerais de proteínas, a saber: enzimas ativas de carboidratos (CAZy), proteínas de ligação a glicanos (GBPs) e anticorpos (Abs) (Figura 1). As enzimas CAZy incluem glicosiltransferases e glicosidases, que desempenham um papel na síntese, modificação ou quebra de ligações glicosídicas. As GBPs estão envolvidas no reconhecimento de carboidratos e podem ser divididas em duas famílias, as lectinas e as GAG-proteínas de ligação a sulfato (NAITHANI *et al.*, 2021). Ao contrário das enzimas, as lectinas são proteínas que possuem pelo menos um domínio não catalítico capaz de se ligar reversivelmente a carboidratos. Essa distinção é importante para determinar o papel primordial das lectinas na identificação de códigos de açúcares (DEDOLA *et al.*, 2020).

**Figura 1.** Grupo de proteínas de ligação a carboidratos.



**Nota:** Carbohydrate-Active Enzymes (CAZy), Glycan-Binding Proteins (GBPs), Antibodies (Abs), Sulfated glycosaminoglycan (GAG)-binding proteins (NAITHANI *et al.*, 2021.)

**Fonte:** Autor, 2023.

As lectinas têm sido objeto de investigação ao longo de várias décadas, sendo que a sua definição tem sido refinada com o passar do tempo (BARONDES, 1988; DAMME *et al.*, 1998; GOLDSTEIN *et al.*, 1980; PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, 1995; VAN HOLLE; VAN DAMME, 2019). Atualmente, as lectinas são caracterizadas como um grupo de proteínas que possuem pelo menos um domínio de ligação a carboidratos (CBD), mas não apresentam atividade enzimática em relação aos açúcares reconhecidos, nem pertencem à família das

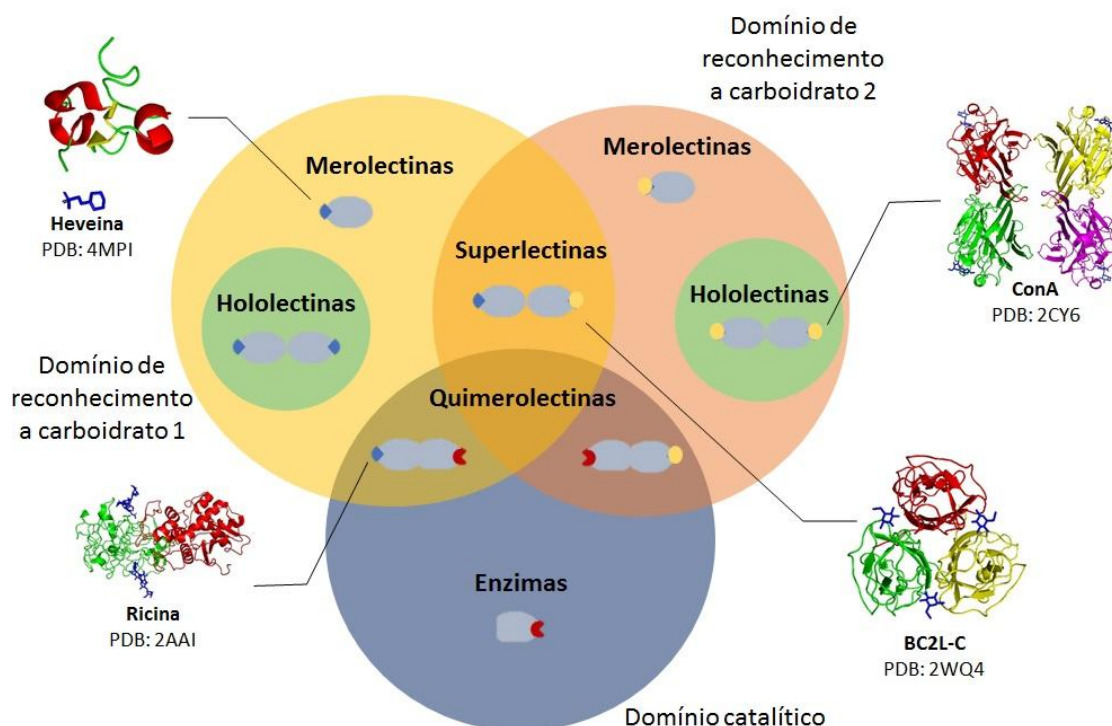
imunoglobulinas (TSANEVA; VAN DAMME, 2020; VAN DAMME, 2022). Durante a evolução, as lectinas emergiram como proteínas especializadas em reconhecer seletivamente carboidratos e apresentam uma diversidade considerável de domínios de ligação a carboidratos, cada um contendo um ou mais sítios de ligação que reconhecem açúcares simples ou complexos de forma específica (BARRE *et al.*, 2019).

A especificidade por carboidratos das lectinas e suas estruturas quaternárias exibem alta variabilidade, afetando a natureza dos alvos proteicos. A presença de sítios de ligação para carboidratos específicos, característica central das lectinas, é inegavelmente um aspecto crucial para determinar a atividade dessas proteínas e suas potenciais aplicações, com base em suas propriedades. As lectinas são proteínas solúveis ou de membrana, encontradas em ambientes intra e extracelulares. As interações entre proteínas e carboidratos constituem uma via de sinalização altamente eficiente nos organismos vivos. Os carboidratos, os possíveis ligantes das lectinas, pertencem a um vasto conjunto de moléculas com estruturas altamente diversas e complexas, presentes na superfície ou no interior das células. Na matriz extracelular, eles formam grandes redes complexas de polissacarídeos e proteoglicanos (BELLANDE *et al.*, 2017).

As lectinas são proteínas que possuem uma ampla distribuição na natureza e são encontradas em todos os reinos e filos dos seres vivos. Embora a maioria das lectinas tenham sido caracterizadas em plantas, sua presença também tem sido descrita em animais, insetos, vírus, fungos e bactérias (HIVRALE; INGALE, 2013; PEUMANS; VAN DAMME, 1995; VAN DAMME, 2014). À medida que várias centenas de lectinas estão sendo descobertas e novas estruturas tridimensionais se tornam disponíveis, logo ficou claro que havia múltiplos mecanismos moleculares pelos quais duas lectinas distintas reconhecem o mesmo açúcar; alternativamente, duas lectinas da mesma planta demonstraram ligar-se a diferentes açúcares (ABHINAV; VIJAYAN, 2014). Assim, surgiu um novo desafio para sua classificação racional. Desde modo, surge outro método de classificação de lectinas considera a natureza e a organização dos CRDs que as lectinas das plantas possuem (TSANEVA; VAN DAMME, 2020).

Assim, com base na sua natureza e organização de domínios, as lectinas de plantas foram agrupadas em duas categorias (Figura 2) distintas de lectinas, sendo elas (a) lectinas compostas exclusivamente por domínios de ligação a carboidratos, incluindo merolectinas, hololectinas e superlectinas, e (b) quimerolectinas constituídas por um domínio de ligação a carboidratos conjugado a outro(s) domínio(s) destituído(s) de quaisquer propriedades de ligação a carboidratos (DAMME *et al.*, 1998; PEUMANS; VAN DAMME, 1995; VAN DAMME *et al.*, 2007).

**Figura 2.** Representação esquemática das classes de lectinas de plantas.



**Nota:** Representação das lectinas para cada uma das classes: merolectina (Heveína PDB: 4MPI), hololectina (ConA PDB: 2CY6), quimerolectina (Ricina PDB: 2AAI) e superlectina (BC2L-C PDB: 2WQ4) (VAN DAMME et al., 1998).

**Fonte:** Autor, 2024.

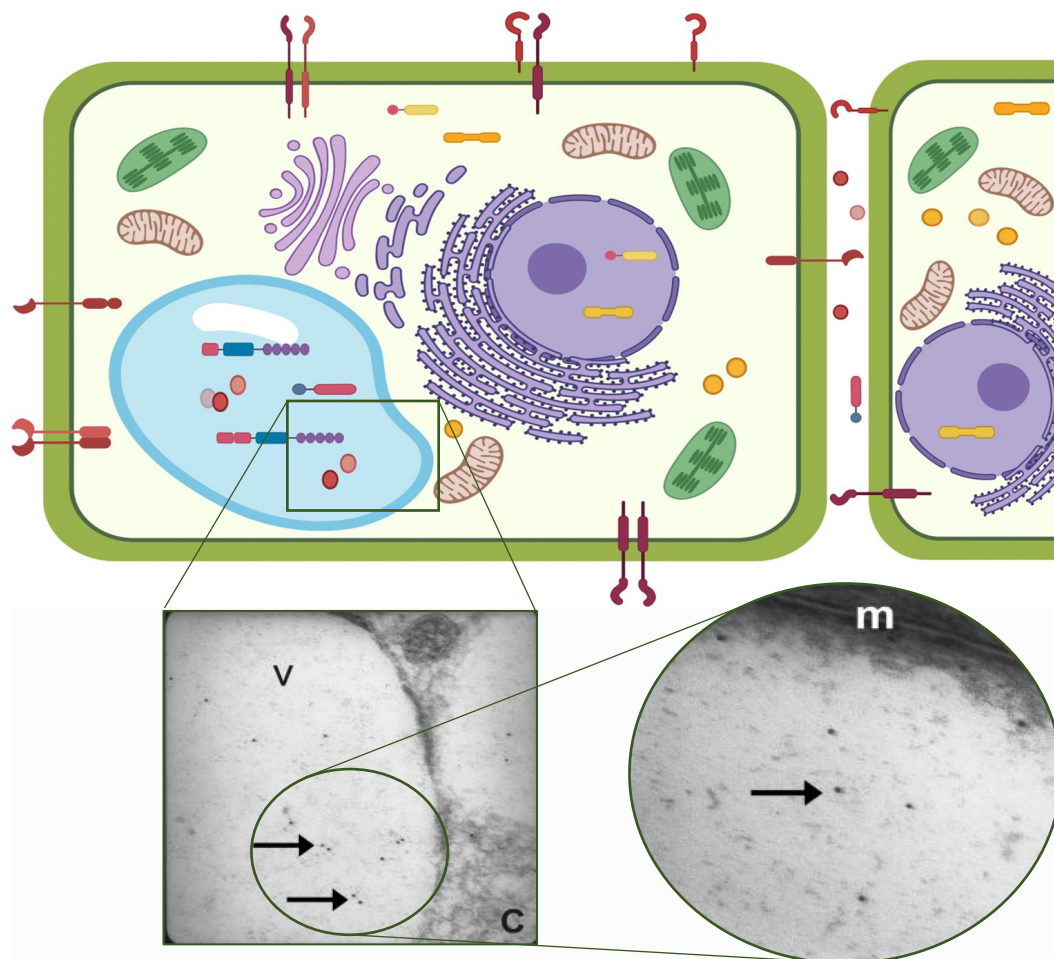
### 2.1.1 Lectinas vegetais

Nas plantas, a presença de lectinas tem sido observada desde organismos não vasculares, como briófitas, até organismos mais complexos, como gimnospermas e angiospermas (NAITHANI *et al.*, 2021; VAN HOLLE; VAN DAMME, 2019). A função das lectinas nas plantas é principalmente relacionada à defesa contra patógenos (CHRISPEELS; RAIKHEL, 1991). Estas proteínas secretoras são direcionadas para o vacúolo, onde se acumulam em grandes quantidades nas sementes, ou para a parede celular e a membrana plasmática. Apesar de a estrutura das diferentes famílias de lectinas em plantas ser extensivamente descrita, a sua função ainda é objeto de estudo e pesquisa (LORIS, 2002; VAN DAMME; LANNOO; PEUMANS, 2008).

As lectinas são amplamente distribuídas em todos os órgãos vegetais, embora alguns tecidos de armazenamento, como sementes, cascas, bulbos e rizomas, apresentem uma

quantidade muito elevada de lectinas em comparação com raízes, brotos, folhas e flores, que contêm quantidades menores (DAMME *et al.*, 1998). Os níveis de expressão das lectinas varia consideravelmente, sendo que as altamente abundantes são geralmente sintetizadas e secretadas em grande quantidade, representando de 0,1% a 10% da proteína total em sementes ou tecidos vegetativos. Por outro lado, as lectinas citoplasmáticas são expressas em níveis baixos, especialmente em condições normais de crescimento. No entanto, essas lectinas vegetais podem ser detectadas em resposta ao estresse, o que sugere que elas são "induzíveis" (Figura 3) (CONINCK; VAN DAMME, 2022; LANNOO; VAN DAMME, 2010; VAN DAMME, 2014).

**Figura 3.** Representação esquemática da distribuição subcelular das lectinas constitutivas e lectinas induzidas por estresse em células vegetais.



**Nota:** A figura apresenta a distribuição subcelular das lectinas constitutivas (representadas em vermelho) nos vacúolos e apoplastos, enquanto as lectinas induzíveis (em amarelo) são encontradas no citosol e núcleo das células vegetais. A figura também ilustra as principais organelas celulares, incluindo o núcleo e retículo endoplasmático (em roxo), vacúolos (em azul), cloroplastos (em verde) e mitocôndrias (em marrom). A parede celular é destacada como uma estrutura retangular verde ao redor da célula, enquanto a representação parcial de outra célula exemplifica o espaço apoplástico entre as células. Em C fotos da Microscopia eletrônica de transmissão do

endosperma de *Canavalia brasiliensis* por MIGUEL *et al.*, 2015 evidenciando a localização subcelular da ConBr no vacúolo. Escala: 0,5 – 0,8  $\mu\text{m}$ .

**Fonte:** Adaptado TSANEVA; VAN DAMME, 2020.

Com base na análise da sequência e estrutura tridimensional do motivo da lectina, é possível classificar as lectinas vegetais em 12 famílias distintas (VAN DAMME; LANNON; PEUMANS, 2008) (Tabela 1), as quais recebem o nome da proteína mais bem estudada para cada grupo de lectina. Atualmente, a estrutura tridimensional foi determinada para apenas 10 motivos de lectina, incluindo a aglutinina *Agaricus bisporus* (ABA), o domínio Amaranthin, a aglutinina relacionada com a quitinase (CRA), o domínio Cyanovirin, a aglutinina *Galanthus nivalis* (GNA), o domínio Hevein, o domínio relacionado com a Jacalina, o domínio da lectina de leguminosas, o domínio Lys M e o domínio Ricina-B (BONNARDEL *et al.*, 2020; TSANEVA; VAN DAMME, 2020).

**Tabela 1.** Panorama geral das famílias de lectinas presentes em plantas. (Continua ...)

	Ligantes sacarídeos	Localização celular	Estrutura tridimensional
Lectina <i>Agaricus bisporus</i> (ABA)	GlcNAc/GalNAc, galactose, antígeno T	Núcleo, citoplasma	$\beta$ -sanduíche
Amarantina	GalNAc, antígeno T	Núcleo, citoplasma	$\beta$ -trevo
Aglutinina relacionada à quitinase (CRA)	N-glicanos de alta manose	Vacúolo, ligado à membrana	TIM barril
Cianovirina	Manose, N-glicanos de alta manose	Núcleo	Folha $\beta$ de fita tripla e grampo $\beta$
Lectina de <i>Euonymus europaeus</i> (EUL)	Galactosídeos, N-glicanos com alto teor de manose	Núcleo, citoplasma	ND
Lectina de <i>Galanthus nivalis</i> (GNA)	Manose, oligossacarídeos de manose, N-glicanos de alta manose	Vacúolo, núcleo, citoplasma ou ligado à membrana	$\beta$ -prisma
Heveína	Quitina, (GlcNAc) <sub>n</sub> , ácido	Vacúolo	Motivo estrutural comum de 30-43

	siálico		resíduos, rico em glicina e cisteína em posições altamente conservadas, organizado em torno de um núcleo de quatro dissulfeto
Jacalina	Manose/N-glicano de alta manose ou galactose/N-glicano complexo	Núcleo, citoplasma e vacúolo	$\beta$ -prisma
Lectina de leguminosa	Manose/glicose, Galactose/GalNAc, (GlcNAc) <sub>n</sub> , fucose, ácido siálico, high manose e N-glicanos complexos	Vacúolo, núcleo, citoplasma ou ligado à membrana	$\beta$ -sanduíche
LysM	Quitina, (GlcNAc) <sub>n</sub> , peptidoglicano	Vacúolo, núcleo, citoplasma ou membrana ligada	estrutura $\beta$ - $\alpha$ - $\alpha$ - $\beta$
Lectina de <i>Nicotiana tabacum</i> (Nictaba)	(GlcNAc) <sub>n</sub> , alta manose e N-glicanos complexos	Núcleo, citoplasma	ND
Ricina-B	Galactose/GalNAc, Galactose sialilada/GalNAc	Vacúolo, núcleo, citoplasma	$\beta$ -trevo

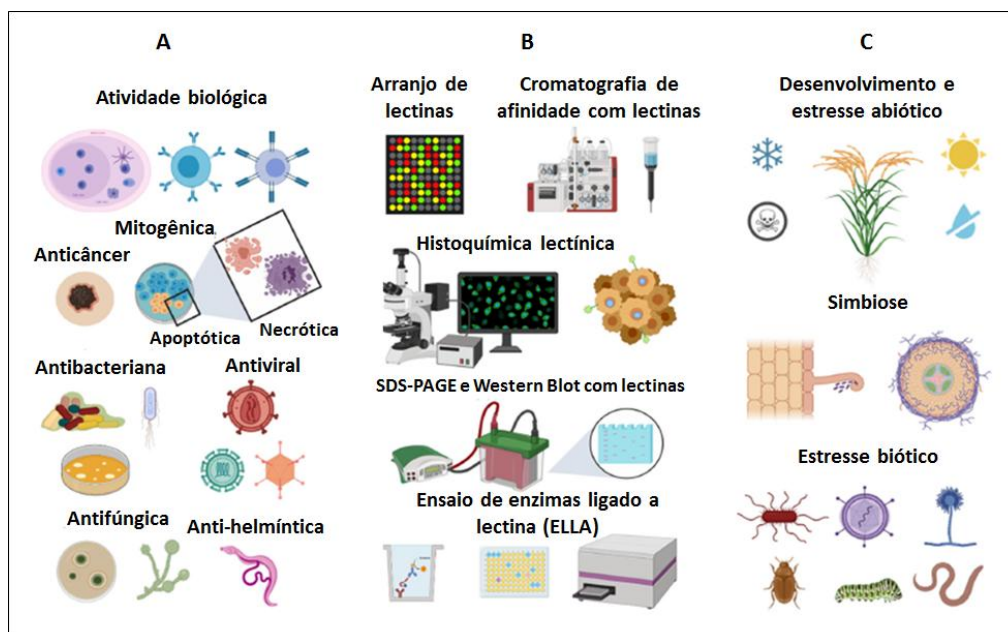
**Nota:** ND - não definido.

**Fonte:** TSANEVA; VAN DAMME (2020).

### 2.1.2 Aplicações biológicas das lectinas vegetais

As lectinas são proteínas que apresentam uma diversificada gama de aplicações em diversas áreas, incluindo agricultura e medicina, além de serem utilizadas como ferramentas na glicociência (Figura 4) (TSANEVA; VAN DAMME, 2020). Suas múltiplas funções fisiológicas são determinadas pela distribuição tissular e pela presença de sítios de ligação a carboidratos específicos, conferindo-lhes um alto grau de seletividade na interação com moléculas de carboidratos em modelos biológicos (SANTOS *et al.*, 2014).

**Figura 4.** Representação esquemática das aplicações das lectinas vegetais.



**Nota:** A figura apresenta as aplicações das lectinas vegetais na área da medicina (A), glicobiologia (B) e da agricultura (C).

**Fonte:** Adaptado TSANEVA; VAN DAMME, 2020.

As lectinas de plantas possuem diversas aplicações nas áreas de pesquisa biomédica, diagnóstico e terapia, e foram fundamentais para o avanço da imunologia (COELHO *et al.*, 2017; HASHIM; JAYAPALAN; LEE, 2017; SHARON, 2004). Vários estudos agrupados por Tsaneva e Van Damme em 2020 demonstraram que as lectinas de plantas podem exercer efeitos mitogênicos ou apoptóticos, podendo modular a resposta inflamatória, inibir o crescimento tumoral, interferir na infecção por patógenos, vírus e parasitas, bem como favorecer a cicatrização de feridas. Muitas lectinas de plantas atuam como agentes imunomoduladores, exercendo efeitos mitogênicos em células humanas. Essas lectinas são capazes de induzir a ativação de células T auxiliares e, consequentemente, modular os níveis de interleucinas, interferon- $\gamma$  (IFT- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e a expressão de diferentes quinases (COELHO *et al.*, 2017; LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017).

A utilização de lectinas vegetais no diagnóstico e tratamento do câncer é um dos principais temas abordados na atualidade pela lectinologia. A interação entre lectinas e estruturas de glicanos pode resultar na inibição de células cancerígenas, em muitos casos por meio da indução de autofagia e apoptose. Os efeitos antiproliferativos e citotóxicos de determinadas lectinas podem contribuir significativamente para o combate ao câncer



(POIROUX *et al.*, 2017; TSANEVA; VAN DAMME, 2020). Algumas lectinas de plantas são utilizadas com êxito como adjuvantes em terapias de radioterapia ou quimioterapia, resultando em redução dos efeitos colaterais dessas terapias (JIANG *et al.*, 2015; KONOZY; OSMAN, 2022). Em linha de pesquisa semelhante, a fotoquimioterapia tem sido aplicada no tratamento de diversos tumores, e sugere-se que a eficiência do fotossensibilizador possa ser aumentada pela conjugação com lectinas de plantas, permitindo a direcionamento específico dos fotossensibilizadores para as células tumorais com glicosilação desordenada (KURODA *et al.*, 2023).

Desde sua descoberta, as lectinas vegetais têm sido desenvolvidas como ferramentas importantes no campo da glicobiologia, permitindo estudar a importância das interações proteína-carboidrato. Sua capacidade de se ligar especificamente a biomoléculas glicosiladas torna as lectinas excelentes ferramentas para entrega direcionada de moléculas. A nanotecnologia tem utilizado nanopartículas decoradas com lectinas para entregar moléculas às células, onde as proteínas glicosiladas e lipídios na superfície celular servem como locais de ligação para as lectinas (BLOISE *et al.*, 2021; CHOI *et al.*, 2021). As lectinas de plantas com uma ampla variedade de especificidades foram incluídas em microarranjos de lectinas, consistindo em lectinas imobilizadas em chips, permitindo triagem de alto rendimento e detecção mais fácil de glicanos em amostras (DANG *et al.*, 2020; HAAB; KLAMER, 2020; PUROHIT *et al.*, 2018).

Algumas lectinas afetam o crescimento e/ou infecção de patógenos animais ou humanos, parasitas e vírus. As lectinas exercem sua atividade antimicrobiana em diferentes níveis, como bloqueio da entrada, infecção, adesão ou migração das bactérias e inibição do crescimento microbiano (COELHO *et al.*, 2018; KONOZY *et al.*, 2022). Muitas lectinas de plantas foram relatadas como proteínas antivirais e sugeridas como possíveis candidatas para prevenir infecções virais (BALZARINI, 2007; MITCHELL; RAMESSAR; O'KEEFE, 2017). Embora vários obstáculos precisem ser superados antes que as lectinas possam ser usadas na clínica, várias lectinas de plantas avançaram nosso conhecimento sobre biologia viral, especialmente os vírus envelopados, como o vírus da imunodeficiência humana (HIV), o vírus influenza e os coronavírus que contêm um revestimento altamente glicosilado (VAN DAMME, 2022).

As lectinas presentes em plantas podem ser empregadas para fins agrícolas, uma vez que as mudanças climáticas globais irão aumentar a frequência de estresses ambientais nas culturas, com combinações diversas. Dessa forma, é imprescindível a criação de culturas com maior resistência e rendimentos superiores sob condições desfavoráveis de crescimento. As

lectinas vegetais fazem parte do sistema imunológico das plantas (LANNOO; VAN DAMME, 2014) e diversas publicações têm relatado o envolvimento de lectinas de plantas induzíveis, bem como do receptor de lectina como quinases, em diferentes respostas ao estresse abiótico (TSANEVA; VAN DAMME, 2020).

Vários estudos têm demonstrado que essas proteínas desempenham um papel importante na sensibilidade ao sal, além de influenciarem no desenvolvimento e produtividade da planta. Os níveis de transcrição das lectinas de cultivares de importância agrônômica, como arroz, trigo e cevada, aumentam após estresses salinos, hídricos, de frio e tratamentos com ácido abscísico (AL ATALAH *et al.*, 2014; DE SCHUTTER *et al.*, 2017; HE *et al.*, 2017; JIANG; MA; RAMACHANDRAN, 2010; LAMBIN *et al.*, 2020; PEUMANS *et al.*, 2000). Portanto, as lectinas podem ser utilizadas para desenvolver plantas com maior crescimento e desenvolvimento em condições ambientais desfavoráveis.

### ***2.1.3 Papel das lectinas nas plantas***

No seu habitat natural, as plantas são frequentemente expostas a diferentes tipos de estresses ambientais, como estresse hídrico, estresse térmico e estresse nutricional. Como resposta a essas mudanças no ambiente, algumas plantas desenvolveram respostas fisiológicas sofisticadas que resultam em um melhor desempenho de crescimento e maiores rendimentos. As lectinas, dependendo da sua localização celular, podem interagir com diferentes alvos, incluindo estruturas de carboidratos endógenas presentes no interior da célula vegetal ou porções de carboidratos na superfície de patógenos exógenos. Os estudos recentes sobre as lectinas presentes no núcleo e nos compartimentos citoplasmáticos da célula vegetal têm transformado drasticamente o entendimento sobre a fisiologia e as funções biológicas das lectinas. No passado, as lectinas eram consideradas como proteínas sem função específica na célula, a não ser por sua capacidade de proteger a planta contra insetos herbívoros e patógenos. No entanto, agora se sabe que as lectinas estão envolvidas em diversos outros processos biológicos relacionados à transdução de sinal e defesa do estresse, podendo cumprir funções específicas dentro da célula vegetal ou na interação com outros organismos. Isso inclui seu papel na regulação do crescimento e desenvolvimento da planta, na resposta a patógenos e na tolerância a estresses abióticos (DE SCHUTTER *et al.*, 2017; LANNOO; VAN DAMME, 2010; PEUMANS; VAN DAMME, 1995; VAN DAMME, 2022; VAN DAMME; LANNOO; PEUMANS, 2008; VAN HOLLE; VAN DAMME, 2019).

Devido à sua abundância em sementes e tecidos vegetativos, as lectinas foram

originalmente consideradas como proteínas de armazenamento, destinadas a fornecer à planta uma fonte de nitrogênio. No entanto, a observação de que muitos tecidos vegetais com altos níveis de lectina não são consumidos por herbívoros levou à hipótese de que essas proteínas desempenham um papel na defesa da planta (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Assim, embora nem todas as lectinas sejam proteínas tóxicas, a atividade dissuasiva de algumas dessas proteínas ainda é um fator importante para explicar o papel das lectinas na defesa da planta. Experimentos utilizando diferentes abordagens, como a adição de lectinas purificadas à dieta artificial de insetos ou ao meio de cultura de fungos, bactérias ou nematóides, bem como experimentos com plantas transgênicas que superexpressam lectinas, demonstraram que algumas lectinas têm atividade deterrente ou são tóxicas para vários patógenos e insetos. O papel das lectinas na defesa vegetal tem sido amplamente discutido nos últimos anos (COELHO *et al.*, 2018; LANNOO; VAN DAMME, 2014; MACEDO; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2015; VANDENBORRE; SMAGGHE; VAN DAMME, 2011).

De modo geral, as lectinas de origem vegetal apresentam alta resistência às enzimas digestivas dos insetos. A resistência à degradação proteolítica tem sido identificada como um importante parâmetro para a atividade inseticida (POWELL *et al.*, 1998; SHUKLE; SUBRAMANYAM; WILLIAMS, 2012). Nas células, as lectinas presentes no núcleo e/ou no citoplasma são proteínas com concentrações variáveis e dependentes da resposta da planta a estresses abióticos e bióticos. Como as concentrações de lectinas são positivamente reguladas em resposta a estímulos ambientais, essas chamadas lectinas induzíveis por estresse são consideradas parte da sinalização e das respostas ao estresse da planta (DE SCHUTTER *et al.*, 2017; DE SCHUTTER; VAN DAMME, 2015). Vários exemplos mostraram a contribuição de diversas lectinas induzidas por estresse para a imunidade da planta (AL ATALAH *et al.*, 2014; LAMBIN *et al.*, 2020).

#### **2.1.4 Lectinas de leguminosa**

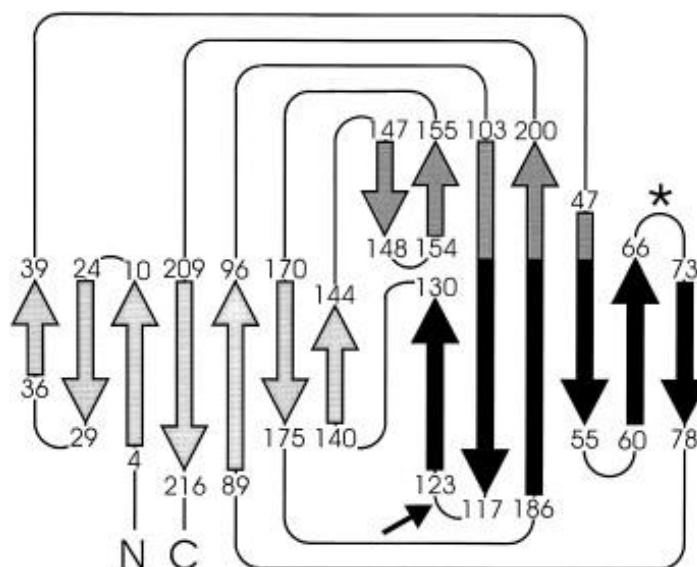
O grupo de proteínas conhecidas como lectinas de leguminosas é uma família estreitamente relacionada das lectinas de plantas, que é encontrada exclusivamente em vegetais da família *Leguminosae*. Dentro dessa família, as tribos *Phaseoleae*, *Vicieae* e *Dalbergieae*, todas pertencentes à subfamília *Papilionoideae* (Figura 4), apresentam o maior número de lectinas purificadas e caracterizadas (CAVADA *et al.* 2019). Neste estudo, enfocamos uma lectina pertencente à subtribo *Diocleinae*, a ConM extraída das sementes da *Canavalia maritima*.



lectinas desta família exibem cerca de 20% de aminoácidos invariantes e 20% de aminoácidos semelhantes. Os resíduos de aminoácidos conservados compreendem muitos dos participantes das ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas com monossacarídeos mantidos nos locais de ligação, bem como quase todos os resíduos que coordenam os íons metálicos (SHARON; LIS, 2002).

A arquitetura do monômero da lectina, representada na Figura 5, é frequentemente descrita como sendo composta por três folhas: uma folha traseira plana contendo seis fios, uma folha frontal curvada contendo sete fios, e uma folha menor no topo, chamada de folha S, que tem um papel importante na manutenção das duas folhas maiores juntas (BANERJEE *et al.*, 1996; LORIS *et al.*, 1998; RÜDIGER; GABIUS, 2001). Essa arquitetura é característica do motivo *Jelly roll*, o qual foi primeiramente identificado na ConA (SINHA *et al.*, 2007). De modo geral, as estruturas monoméricas apresentam esse motivo, com um peso molecular de 25-30 kDa, e contêm um domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC) e sítios de ligação para íons bivalentes, tais como cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e manganês ( $\text{Mn}^{2+}$ ) (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017). O cálcio e o manganês são separados por 4,25 Å e estão próximos (9-13 Å) do sítio de ligação de carboidratos (SHARON; LIS, 2002).

**Figura 6.** Diagrama da topologia das dobras das lectinas de leguminosas.



**Nota:** A folha traseira com 6 fios está representada na cor preta, a folha frontal de 7 fios na cor cinza claro e a folha pequena de 5 fios do topo em cinza escuro.

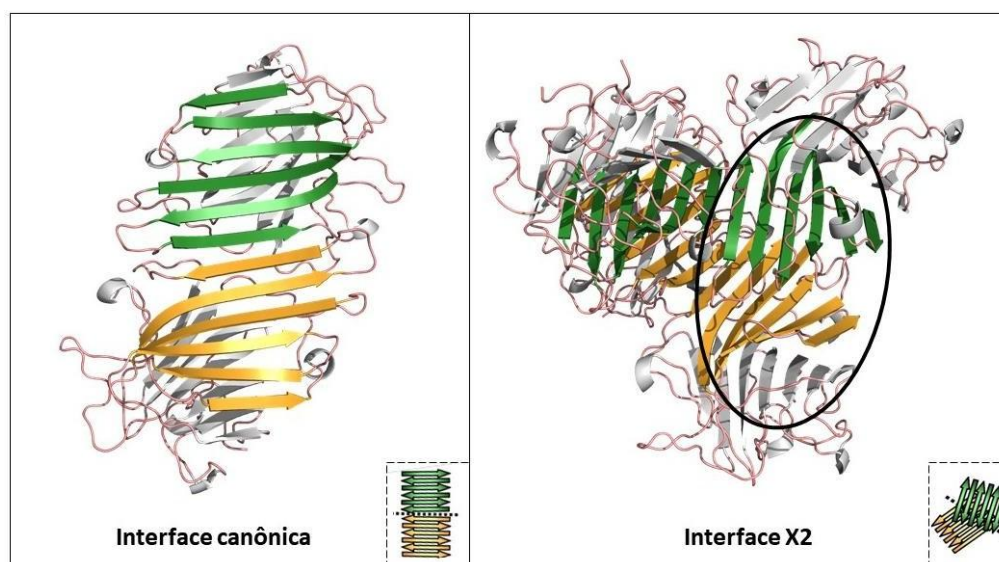
**Fonte:** LORIS *et al.*, 1998.

A estrutura quaternária das lectinas de leguminosas pode ser bastante variável devido a modificações, como glicosilação, embora as estruturas primária e secundária dos

monômeros sejam semelhantes (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017). As lectinas das leguminosas são conhecidas por existirem principalmente como dímeros ou tetrâmeros compostos por dímeros, apresentando diferenças significativas em suas associações quaternárias e modos de organização de monômeros na associação dimérica/tetramérica (BRINDA *et al.*, 2004; MORENO *et al.*, 2006). Em valores de pH inferiores a 5,8, as lectinas das leguminosas são geralmente dímeros, enquanto em pH superior, elas se apresentam como tetrâmeros compostos de quatro monômeros idênticos (WANG; CUNNINGHAM; EDELMAN, 1971).

Os tetrâmeros das lectinas de leguminosas são, em geral, dímeros de dímeros, e os diferentes modos de tetramerização são uma consequência da combinação diversa de interfaces diméricas vistas nessas estruturas quaternárias (MORENO *et al.*, 2006). A oligomerização nessas lectinas diméricas ou tetraméricas é mediada principalmente pelas interações da folha  $\beta$  posterior plana de seis fios entre as diferentes subunidades, produzindo sete tipos diferentes de interfaces. Em ConA, por exemplo, são observadas duas interfaces: uma interface canônica encontrada no dímero e a interface X2, que é encontrada em sua forma tetramérica, como mostrado na Figura 6 (SINHA *et al.*, 2007).

**Figura 7.** Características da ConA e suas interfaces de dimerização e tetramerização.



**Nota:** A figura apresenta a dimerização da ConA em sua interface canônica (PDB 1CVN) na parte esquerda, com representações das seis fitas de cada monômero coloridas em verde e laranja, exibindo um total de doze fitas dispostas sequencialmente. Na parte direita, é mostrado o tetrâmero da ConA, onde os dímeros se associam através de suas folhas  $\beta$  posteriores em uma interface X2 (destacada no círculo alongado preto). Na parte inferior de cada imagem, figuras esquemáticas das duas interfaces abordadas são apresentadas.

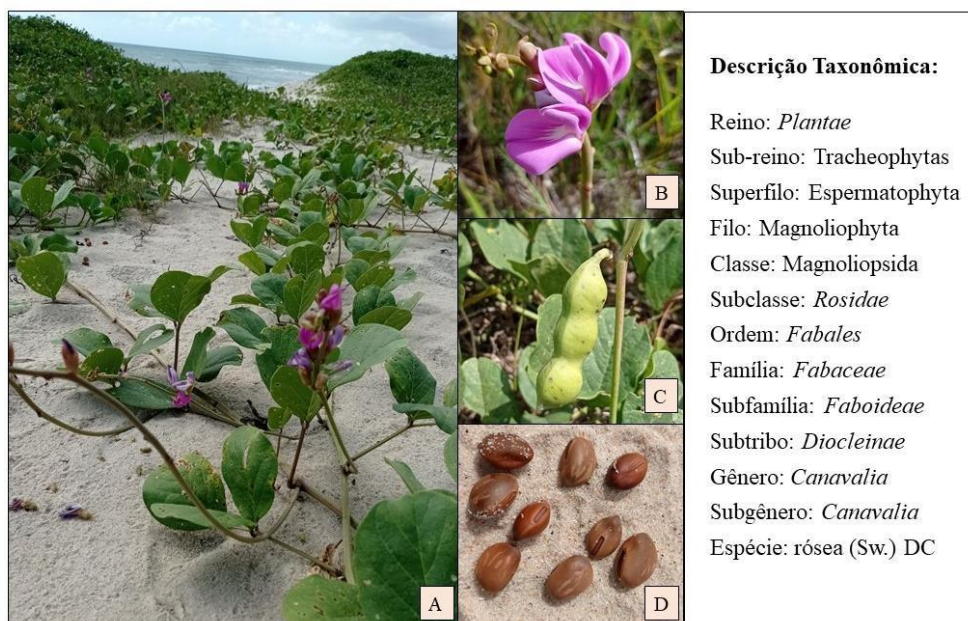
**Fonte:** SINHA *et al.*, 2007.

### 2.1.5 *Canavalia maritima* (Aubl.)

O gênero *Canavalia* abrange cerca de 60 espécies com distribuição pantropical, concentrando-se na região neotropical, onde são encontradas aproximadamente 37 espécies. Uma das espécies mais comuns é a *Canavalia maritima* (Aubl.), também conhecida como *Canavalia rosea*, *Canavalia apiculata* (Piper), *Canavalia arenicola* (Piper), *Canavalia obtusifolia* (Lam.), *Dolichos emarginatus* (Jacq.), *Dolichos roseus* (Sw.) e *Dolichos maritimus* (Aubl.), cujo nome em latim, “maritimus”, significa "pertencente ao mar" (MENDOZA-GONZÁLEZ; MARTÍNEZ; LITHGOW, 2014).

No Brasil, essa planta é popularmente chamada de feijão-da-praia (Figura 8). É amplamente distribuída ao longo do litoral brasileiro, sendo encontrada, por exemplo, nas praias do litoral cearense. Esta espécie de leguminosa possui hábito rasteiro e trepador, com caules grossos e carnudos que podem crescer até 10 metros ou mais em comprimento e cerca de 2,5 cm de diâmetro, podendo ser lenhosos na base. Suas flores rosa-púrpura são produzidas durante todo o ano, especialmente no verão (MENDOZA-GONZÁLEZ; MARTÍNEZ; LITHGOW, 2014).

**Figura 8.** *Canavalia maritima* em seu habitat natural: (a) esteiras densas crescendona praia, (b) inflorescência, (c) vagem verde e (d) sementes ejetadas das vagens



**Nota:** *Canavalia maritima* na Praia de Tabuba, Caucaia, Ceará, Brasil.

**Fonte.** SOUSA, 2022. MENDOZA-GONZÁLEZ; MARTÍNEZ; LITHGOW, 2014.

As vagens, produzidas no final do período chuvoso, são planas, medem entre 10 e 15 cm de comprimento e 2,5 cm de largura, contendo cerca de seis sementes cada. As sementes pesam em média entre 0,5 e 0,65 g, com um comprimento médio de 1,4 cm, sendo o peso dos cotilédones de 0,35 g e do tegumento de 0,15 g, apresentando componentes nutricionais adequados, como proteínas, carboidratos, fibras alimentares, minerais selecionados e baixos níveis de lipídios (ARUN; SRIDHAR, 2004; SUPRIYA; SRIDHAR; GHATE, 2018).

*Canavalia maritima* desempenha um papel importante tanto econômica quanto ambientalmente. Essas plantas ajudam na proteção costeira, prevenindo a erosão do solo com sua densa cobertura que diminui o impacto das ondas de tempestade e suas raízes que fixam o substrato, impedindo a movimentação da areia. O rápido crescimento da planta também permite a cobertura das dunas mais móveis, reduzindo o impacto direto do vento e das ondas na praia. Além disso, na Índia, o feijão-da-praia é utilizado como adubo verde. As sementes, após fervidas ou torradas para remoção de toxinas, são comestíveis, e suas flores, frescas ou secas, podem ser usadas como enfeites e para aromatizar ambientes (D'CUNHA; SRIDHAR, 2011; SRIDHAR; SEENA, 2006).

Diferentes partes da planta possuem propriedades medicinais que podem trazer benefícios à saúde (MENDOZA-GONZÁLEZ; MARTÍNEZ; LITHGOW, 2014). Em termos de composição, as sementes contêm principalmente carboidratos ( $50,5 \text{ g} \pm 0,53$  por 100 g) e proteínas ( $29,3 \text{ g} \pm 0,6$  por 100 g) (ARUN; SRIDHAR, 2004). Entre as proteínas encontradas nas sementes, foi isolada, por cromatografia de afinidade utilizando Sephadex® G-50, a lectina denominada Concanavalina M (ConM), que é o objeto de estudo deste trabalho. A seguir, serão apresentadas a síntese dessa proteína pertencente à subtribo *Diocleinae*, bem como sua caracterização estrutural e atividades biológicas.

### **2.1.6 Síntese das lectinas da subtribo *Diocleinae***

O processamento subcelular da ConA é amplamente utilizado como referência para outras lectinas da subtribo *Diocleinae*, devido à sua caracterização mais completa até o momento. A biossíntese da ConA envolve uma série de clivagens e uma reação de transpeptidação no lado carboxílico de resíduos de asparagina, resultando na permutação circular da proteína. Inicialmente, a ConA é sintetizada como um precursor glicosilado inativo no retículo endoplasmático, e somente após o processamento pós-traducional, ela se torna madura e ativa (SHARON, 2007). Apesar da descoberta da ConA há mais de 100 anos, só



recentemente foi possível obter uma estrutura para a sua forma precursora, pró-ConA, permitindo uma melhor compreensão de como a permutação circular afeta essa proteína. Não é possível extrair pró-ConA das sementes de feijão-de-porco, já que ela é rapidamente convertida em ConA. No entanto, a alta semelhança entre a estrutura da pró-ConA recombinante, obtida pelos pesquisadores, e a da ConA indica que a pró-ConA recombinante se dobra corretamente no sistema de expressão em *E. coli* (NONIS *et al.*, 2021).

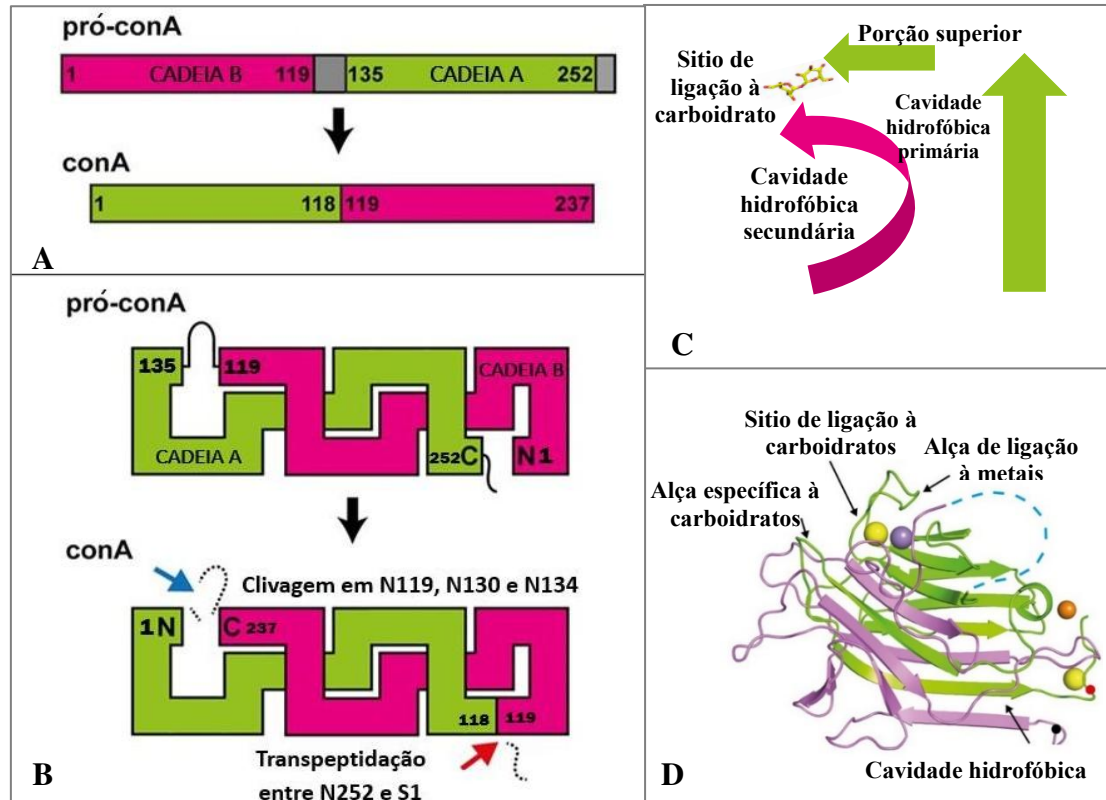
A estrutura da pré-pró-ConA consiste em um peptídeo sinal de 29 resíduos de aminoácidos na região N-terminal, duas cadeias peptídicas B (resíduos 1-119) e A (resíduos 135-252), um segmento glicosilado de quinze resíduos de aminoácidos no centro (V<sub>120</sub>IRNSTTIDFNAAAYN<sub>134</sub> com glicosilação no resíduo N<sub>123</sub>), e um peptídeo de nove resíduos de aminoácidos na região C-terminal. Durante o transporte da pré-pró-ConA para o lúmen do retículo endoplasmático, ocorre a clivagem do peptídeo sinal, resultando na formação da pró-ConA (Figura 9) (CARRINGTON; AUFFRET; HANKE, 1985; NONIS *et al.*, 2021).

A região N-terminal da pré-pró-ConA contém um glicano que inibe a atividade de ligação a carboidratos no retículo endoplasmático, mas é necessário para o transporte de pró-ConA para fora do retículo endoplasmático (FAYE; CHRISPEELS, 1987). Estudos indicam que a lectina madura e ativa não é glicosilada, pois essa glicosilação inibiria a atividade de ligação a carboidrato (SHARON, 2007). Durante o crescimento da semente, uma forma inativa de ConA é encontrada, mas desaparece na maturação (CARRINGTON; AUFFRET; HANKE, 1985). A deglicosilação é necessária para que a pró-ConA adquira a capacidade de se ligar a carboidratos (RAMIS *et al.*, 2001). A permutação circular de ConA não afeta a ligação e especificidade de carboidratos e aumenta a estabilidade térmica e de pH sem afetar a ligação *in vitro* ao carboidrato metil- $\alpha$ -D-manose. A permutação circular de ConA pode ser realizada com a enzima CeAEP1 em pH ótimo entre 5 e 6, com maior eficiência próxima a pH 5. A análise ITC feita por Nonis e colaboradores em relação à ligação entre pró-ConA e ConA não mostrou diferença na constante de associação quando analisada com metil- $\alpha$ -D-manose.

No complexo de Golgi, a pró-ConA (Figura 9) sofre uma clivagem proteolítica, resultando na remoção do segmento glicosilado ligado ao resíduo de asparagina 123 no centro da sua estrutura e na divisão da sua cadeia principal em duas subunidades denominadas A e B. Em seguida, essas duas subunidades são religadas em locais distintos, com a subunidade A que estava localizada na região N-terminal sendo ligada à subunidade B na posição 27, resultando em uma inversão entre as regiões N e C-terminal e formando uma única cadeia  $\alpha$  madura, como ilustrado na Figura 5 (CARRINGTON; AUFFRET; HANKE, 1985). Durante esse processo de maturação, o resíduo 1 da metade N-terminal (cadeia B) da pró-ConA é convertido no resíduo

119 da metade C-terminal de ConA, enquanto o resíduo 135 (cadeia A) torna-se o resíduo 1 de ConA na região N-terminal (NONIS *et al.*, 2021).

**Figura 9.** Processo de maturação de ConA por permutação circular e estrutura da pró-ConA.



**Nota:** A figura apresenta uma representação esquemática do processo de maturação da ConA. Durante a maturação, o resíduo 1 da metade N-terminal (cadeia B) da pró-ConA se torna o resíduo 119 da metade C-terminal de ConA, e vice-versa, o resíduo 135 se torna o resíduo 1 de ConA. A clivagem de ligações peptídicas (seta azul) e a formação de ligações peptídicas através da transpeptidação (seta vermelha) são eventos necessários para a produção de ConA, ocorrendo no lado carboxílico dos resíduos de asparagina. O sinal ER N-terminal de pré-pró-ConA e o glicano ligado a N, removidos antes da permutação circular de pró-ConA, não são mostrados. A estrutura terciária de um monômero típico de lectinas da subtribo Diocleinae é representada no diagrama esquemático (C), enquanto a estrutura de pró-ConA é mostrada em folhas  $\beta$  intercaladas da cadeia A (rosa) e da cadeia B (verde) (D). A transpeptidação ocorre entre o N-terminal (ponto preto) e um resíduo próximo ao C-terminal (ponto vermelho). O "laço de ligação de metal" e o "laço de especificidade de monossacarídeo" são representados em um único laço cada, enquanto o "sítio de ligação de monossacarídeo" consiste em resíduos de três laços. A "cavidade hidrofóbica" é composta por resíduos de duas folhas  $\beta$  adjacentes e um loop próximo. Quinze resíduos flexíveis ligando as cadeias A e B (linha tracejada azul); íons de cálcio (esfera amarela); manganês (esfera roxa); zinco (esfera laranja)

**Fonte:** Adaptado de NONIS *et al.*, 2021.

### **2.1.7 Aspectos estruturais da interação das lectinas da subtribo *Diocleinae* com moléculas hidrofóbicas**

As lectinas, presentes em leguminosas e outras famílias de plantas, além de outros organismos, apresentam a capacidade de interagir com moléculas diferentes de carboidratos, como aminoácidos não-proteicos (DELATORRE *et al.*, 2007), compostos hidrofóbicos (BARBOSA *et al.*, 2001; EDELMAN; WANG, 1978; MURDOCK; SHADE, 2002; ROBERTS; GOLDSTEIN, 1983) e fitorreguladores hidrofóbicos (DELATORRE *et al.*, 2013; SALES, 2019; SOUSA, 2022).

Nos estudos iniciais sobre a interação de lectinas pertencentes à subtribo *Diocleinae* com moléculas de caráter hidrofóbico conduzidos por Hardman e Ainsworth (1973, 1972), foi observado que a lectina presente na *Canavalia ensiformes* (ConA) tem a capacidade de se ligar a diversas moléculas hidrofóbicas sem a necessidade de haver qualquer porção de sacarídeo em suas estruturas. Em pesquisas realizadas posteriormente por Edelman e Wang (1978), várias evidências foram apresentadas sugerindo que a ConA é capaz de se ligar a diversas estruturas por meio de interações hidrofóbicas independentes da atividade de ligação ao sacarídeo, que normalmente está associada a lectina. Além disso, afirmaram que algumas lectinas presentes em leguminosas possuem um sítio de ligação hidrofóbico com alta afinidade por adenina e por determinados hormônios vegetais derivados da adenina.

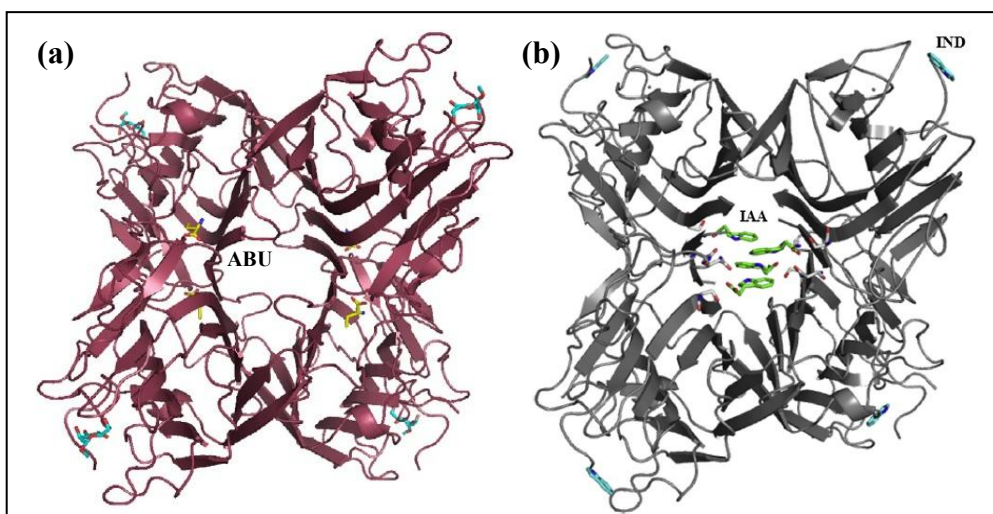
Adicionalmente, em 2007, Delatorre e colaboradores, determinaram a estrutura da lectina da *Canavalia gladiata* (CGL) em complexo com o ácido  $\alpha$ -aminobutírico (ABU), o que permitiu a identificação de um novo sítio de ligação para aminoácidos não proteicos na interface de contato dos monômeros de cada dímero canônico das lectinas de leguminosas (Figura 10). Os resultados obtidos por meio de difração indicaram a presença de uma bolsa hidrofóbica formada pelos resíduos Leu115, Leu126 e Val179 que interagem com o ABU. É sabido que esses resíduos são altamente conservados em outras lectinas, tais como a ConA, as lectinas de sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr), sementes de *Canavalia maritima* (ConM), sementes de *Dioclea grandiflora* (DGL) e sementes de *Butea monosperma* (BML) (ABHILASH *et al.*, 2015).

Entretanto, embora as lectinas pertencentes à subtribo *Diocleinae* compartilhem uma alta homologia em suas estruturas primárias e apresentem resíduos de aminoácidos conservados em locais importantes, como o sítio de reconhecimento de carboidratos (Tyr12, Asn14, Leu99, Try100, Asp208 e Arg228), o sítio de ligação a metais (Glu8, Asp10, Tyr12, Asn14, Asp19, His24, Val32, Ser34, Asp208 e Arg228) e a cavidade hidrofóbica (Tyr54, Leu81,

Leu85, Val89, Val91, Phe111, Ser113, Val179, Ile181, Phe191, Phe212 e Ile214) como descrito em CAVADA *et al.* (2001), diferenças na interação de moléculas que compartilham essas características podem resultar em diferentes intensidades de atividades biológicas (BEZERRA *et al.*, 2011; CAVADA *et al.*, 2001; DELATORRE *et al.*, 2007; DUARTE; PEIL, 2010).

Além disso, Delatorre e colaboradores (2013), ao determinarem a estrutura da lectina ConM complexada com a auxina AIA, constataram que a interação entre esse ligante possibilitava apenas interações entre dímeros, sem apresentar uma forte capacidade de estabilizar o dímero canônico. Por outro lado, a interação entre ABU e CGL permitia interações intermonoméricas, o que estabilizava o dímero canônico (Figura 10). Esses resultados corroboram com estudos anteriores que propuseram a existência de dois sítios hidrofóbicos independentes em lectinas: um sítio de alta afinidade para compostos hidrofóbicos por tetrâmero e um de baixa afinidade por monômero (EDELMAN; WANG, 1978; YANG; GALL; EDELMAN, 1974).

**Figura 10.** Interação das lectinas de leguminosas com moléculas hidrofóbicas.



**Nota:** Na figura apresenta a estrutura da lectina da *Canavalia gladiata* (CGL) complexada com ácido  $\alpha$ -aminobutírico (ABU) interagindo no dímero canônico entre os monômeros na cavidade hidrofóbica. ABU é exibido em amarelo e o  $\alpha$ -metil-manósido em azul (a) e em (b) a estrutura da lectina da *Canavalia maritima* (ConM) complexada com ácido indol-3-acético (AIA) interagindo através do empilhamento de interações hidrofóbicas. Grupamento Indol (IND) é representado em azul perto do domínio CRD e AIA em verde no centro do tetrâmero.

**Fonte:** DELATORRE *et al.*, 2007(a); *et al.*, 2013(b)

No campo das pesquisas estruturais de lectinas, como aquelas realizadas por Delatorre e seus colaboradores (2013), é sugerido que a lectina de *C. maritima* regula a disponibilidade do hormônio vegetal ácido indole-3-acético (AIA) durante os primeiros

estágios do desenvolvimento das plântulas, revelando um possível novo papel fisiológico para essas proteínas. Esses achados indicam que as lectinas estão envolvidas nos estágios iniciais do desenvolvimento em plantas, mas há desafios para futuras pesquisas nessa área. As lectinas da subtribo *Diocleinae* interagem com hormônios vegetais por meio de um sítio de ligação de baixa afinidade constituído pelos resíduos Thr49, Ser108, Ser110 e Asn131, e eventualmente pelos resíduos Thr49 e Asn131 para IBA e Thr49, Ser110 e Asn131 para 2,4 D. A alta similaridade entre as sequências das lectinas de *Canavalia* sugere a conservação do sítio de ligação da auxina nesse grupo de lectinas. As diferenças nas interações descritas por Sousa (2022) indicam diferentes capacidades de modular as concentrações de auxinas (expressão e síntese) disponíveis nas fases iniciais do desenvolvimento.

Apesar das lectinas da subtribo *Diocleinae* terem sido extensivamente estudadas, há poucos relatos sobre seus sítios hidrofóbicos na literatura. Embora o conhecimento sobre esses sítios tenha avançado principalmente através da resolução das estruturas tridimensionais das lectinas complexadas com ligantes hidrofóbicos, é crucial também compreender como essas interações estruturais se relacionam com os aspectos fisiológicos dessas proteínas nas plantas. Uma vez que a maioria dos resíduos presentes nos sítios hidrofóbicos são conservados em outras lectinas da subtribo *Diocleinae*, é possível que eles também desempenhem a função de carregadores de moléculas hidrofóbicas, conforme relatado por CAVADA *et al.* (2019).

## 2.2 Hormônios vegetais

Nos organismos vegetais superiores, a coordenação e a regulação do metabolismo, crescimento e morfogênese são mediadas por sinais químicos que são transmitidos de uma parte da planta para outra. Esta teoria foi originalmente proposta por Julius Von Sachs, um botânico alemão do século XIX. Sachs sugeriu que moléculas mensageiras, embora sua identidade não fosse conhecida na época, eram responsáveis por essas atividades.

Com o avanço dos estudos de fisiologia vegetal, agora sabemos que essas moléculas mensageiras são hormônios vegetais, também conhecidos como fitohormônios. Os hormônios vegetais são moléculas orgânicas naturais que desempenham um papel fundamental na regulação e coordenação do crescimento e desenvolvimento das plantas. Eles são responsáveis por controlar vários processos fisiológicos, como germinação de sementes, desenvolvimento de raízes e caules, formação de flores e frutos e resposta a estresses ambientais. Os hormônios vegetais são produzidos em diferentes partes da planta e transportados para outras partes, onde exercem seus efeitos. Existem seis principais classes de hormônios vegetais: auxinas,

citocininas, giberelinas, etileno, ácido abscísico e brassinosteróides (SHIGENAGA; ARGUESO, 2016). O estudo dos hormônios vegetais é uma área importante da fisiologia vegetal e tem aplicações em diversas áreas, desde a agricultura até a biotecnologia.


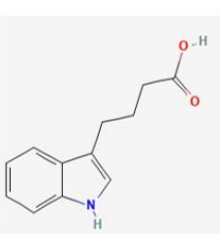
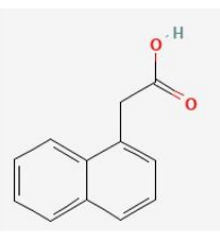
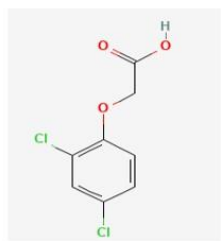
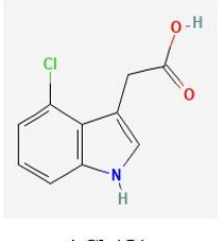
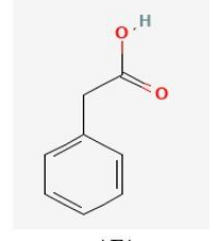
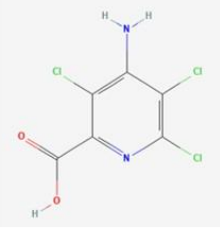
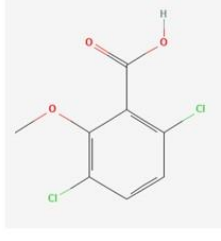
Os hormônios vegetais desempenham um papel importante na regulação da divisão celular, expansão celular e diferenciação celular, além de controlarem a resposta das plantas a estresses ambientais. No entanto, a resposta fisiológica da planta não é mediada por um único hormônio, mas sim por uma rede complexa de interações sinérgicas ou antagônicas entre os fitohormônios. Em cada célula, a percepção hormonal estimula uma rede de sinalização que regula a expressão gênica e influencia as decisões celulares, como mudanças na dinâmica de crescimento ou aquisição de uma nova identidade celular. A identificação dos componentes da rede de sinalização hormonal e a compreensão de como a percepção hormonal afeta a atividade desses componentes, incluindo possíveis regulações de *'feedback'*, permitiu recentemente a obtenção de informações essenciais sobre a topologia das redes que controlam a transcrição gênica em resposta aos hormônios (CHAPMAN; ESTELLE, 2009; SHAN; YAN; XIE, 2012; SHIGENAGA; ARGUESO, 2016).

Além disso, os níveis de hormônios vegetais nos tecidos estão diretamente ligados à sua associação com outras moléculas, como aminoácidos, açúcares, peptídeos e glicoproteínas (TAIZ; ZEIGER, 2016). Em relação às lectinas vegetais, estudos demonstraram sua capacidade de interagir com hormônios vegetais das classes das citocininas e auxinas, como observado por Meyer *et al.* (2008) e Małeck *et al.* (2012) ao analisarem a estrutura da lectina ML-I (*Viscum album*) complexada com zeatina e cinetina. Da mesma forma, Delatorre *et al.* (2013) obtiveram a estrutura tridimensional da ConM em complexo com o ácido indol-3-acético. Esses achados indicam um possível novo papel fisiológico para essas proteínas.

### **2.2.1 Auxinas**

A auxina, primeiro hormônio de crescimento estudado em plantas, foi alvo de muitos dos trabalhos pioneiros na fisiologia do mecanismo de expansão celular (TAIZ; ZEIGER, 2016). Como um grupo de hormônios vegetais, as auxinas regulam quase todas as fases do ciclo de vida das plantas, desde a germinação até a senescência (WOODWARD, 2005). A ocorrência natural de auxina é dominada pelo ácido indol-3-acético (AIA), mas outras três auxinas vegetais também foram descritas, incluindo ácido indol-3-butírico (AIB), ácido 4-cloroindol-3-acético (4-Cl-AIA) e ácido fenilacético (AFA) (Figura 11) (SAUER; ROBERT; KLEINE-VEHN, 2013).

**Figura 11.** Estrutura de auxinas naturais e sintéticas.

AUXINAS DE OCORRÊNCIA NATURAL		AUXINAS SINTÉTICAS	
			
AIA	AIB	ANA	2,4-D
			
4-Cl-AIA	AFA	PICLORAM	DICAMBA

**Nota:** As estruturas 2D das auxinas foram obtidas a partir do PubChem com os seguintes códigos de referência: AIA (802), AIB (8617), 4-Cl-AIA (100413), PAA (999), ANA (6862), 2,4-D (1486), PICLORAM (15965) e DICAMBA (3030).

**Autor:** SOUSA, 2022.

É importante destacar que existem diversos tipos de reguladores sintéticos do crescimento de plantas que possuem atividades similares às auxinas. Dentre eles, destacam-se o ácido 1-naftalacético (ANA), o 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), o ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzóico (Dicamba) e o ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (Picloram). Todos esses compostos exercem efeitos similares aos das auxinas, incluindo a inibição do alongamento da raiz e a promoção do crescimento lateral das raízes (KORASICK; ENDERS; STRADER, 2013; WOODWARD, 2005). Alguns desses compostos são utilizados como herbicidas, que são produtos químicos agrícolas usados para controlar o crescimento de plantas daninhas indesejáveis, com o objetivo de aumentar a produtividade das culturas. Esses herbicidas podem ser não seletivos, matando ou danificando todo o crescimento vegetal, e geralmente são usados em áreas grandes ou muito cobertas por vegetação. Já os herbicidas seletivos são usados para controlar determinados tipos de plantas daninhas e geralmente funcionam interrompendo o sistema hormonal das plantas. As auxinas sintéticas são utilizadas especificamente como herbicidas seletivos (SONG, 2014).

A síntese de ácido indol-3-acético (AIA) em plantas pode ocorrer tanto a partir do

triptofano (Trp), utilizando vias dependentes de Trp, que é produzido na via do chiquimato nos plastídios, quanto a partir de um precursor indólico de Trp, utilizando vias independentes de Trp. A rota predominante para a síntese de AIA em plantas é a via IPyA (ácido indol-3-pirúvico), que envolve várias etapas e é catalisada por monooxigenases contendo flavina da família YUCCA. Essa via consiste em uma reação de duas etapas, onde o Trp é primeiramente desaminado para IPyA e, em seguida, IPyA é descarboxilado irreversivelmente para AIA. Acredita-se que as principais rotas para biossíntese e degradação do AIA ocorram no citosol, já que a maioria das enzimas envolvidas compartilha a localização citoplasmática. Além disso, a inativação metabólica do AIA modula as concentrações de auxina nas células e tecidos vegetais. A maioria do AIA em plantas existe como conjugados inativos e formas de éster metílico, que podem ser rapidamente convertidos em AIA (formas de armazenamento de auxina), ou como AIA inativo irreversível (catabólicos de auxina), que resulta da remoção do excesso de auxina ou de uma resposta regulada para criar mínimos de auxina. As plantas também podem obter AIA por  $\beta$ -oxidação do AIB ou por hidrólise de conjugados de AIA, nos quais o AIA está ligado a aminoácidos, açúcares ou peptídeos. (CASANOVA-SÁEZ; MATEO-BONMATÍ; LJUNG, 2021; KORASICK; ENDERS; STRADER, 2013).

As plantas superiores possuem a capacidade de armazenar ácido indol-3-acético (AIA) na forma de conjugados de AIA e ácido indol-3-butírico (AIB), os quais podem ser convertidos em AIA livre por hidrólise ou  $\beta$ -oxidação, respectivamente. O transporte de auxina, normalmente AIA, ocorre em curtas e longas distâncias no corpo da planta, através do sistema vascular (floema) por fluxo de massa ou célula a célula, que é principalmente polar. Devido ao fato de que todas as auxinas são ácidos fracos e podem apresentar-se na forma próton-dissociada ou não-dissociada, sua capacidade de penetrar na célula depende do pH. Em plantas, o pH apoplástico é de aproximadamente 5,5, e a maioria das moléculas de AIA ( $pK_a = 4,85$ ) está dissociada (aniônica,  $A^-$ ) em cerca de 83% e não dissociada (HA) em cerca de 17%. Somente as moléculas não dissociadas podem difundir-se através da membrana plasmática por difusão lipofílica sem a necessidade de uma proteína transportadora. Portanto, o transporte ativo de ânions de auxina é essencial para a saída das células. Há diversos transportadores de auxina já descritos na literatura (ZAZIMALOVA *et al.*, 2010).

As auxinas livres são consideradas a forma mais ativa do AIA, mas a sua forma conjugada é considerada uma molécula inativa e de armazenamento, sendo os ésteres glicosilados de auxina o estado inativo mais comum (DELATORRE *et al.*, 2013). Esta forma de auxina é a mais encontrada em sementes e órgãos de armazenamento. Estudos demonstram que os níveis endógenos de AIA livre são baixos em diferentes tecidos e órgãos, possivelmente



devido à conjugação do AIA com aminoácidos e açúcares (NORMANLY, 2010). Além disso, estudos sugerem a existência de um mecanismo regulador adicional, baseado na capacidade das lectinas de formar complexos com AIA (EDELMAN; WANG, 1978).

Em 2013, foi publicado um estudo sobre a interação da lectina de *C. maritima* com AIA. Foi observado que o AIA está localizado no sítio de ligação da ConM, cercado pelos resíduos Ser108 e Asn131. A interação da ConM com AIA pode ser uma estratégia para tornar o fitohormônio indisponível para a célula e proteger as raízes de sua atividade inibitória. Este novo papel fisiológico proposto para as lectinas de leguminosas pode representar um novo mecanismo, além da degradação e formação de novos complexos, pelo qual os níveis de AIA são reduzidos nas fases posteriores da germinação das sementes. Além disso, os níveis elevados de AIA induzidos por um grupo de patógenos conhecidos como BIPS (Produtores de ácido indol acético bacteriano) podem estar associados ao desenvolvimento de doenças em várias espécies de plantas. Nesse sentido, os autores sugeriram que a capacidade das lectinas de interagir com AIA também poderia ser um mecanismo de defesa contra esses patógenos (DELATORRE *et al.*, 2013).

### **2.2.2. Sinalização das auxinas em plantas**

A auxina possui a capacidade de regular sua distribuição dentro dos tecidos vegetais, criando gradientes de concentração que guiam os padrões de desenvolvimento por meio de um mecanismo de auto-organização. Essa propriedade de auto-organização assegura que a auxina possa estabelecer áreas localizadas de influência de forma independente, direcionando os processos de crescimento e diferenciação de acordo com essa organização (LEYSER, 2005). Nesse processo, a auxina organiza autonomamente o estabelecimento de canais polarizados de transporte de auxina, fornecendo sinais posicionais para o desenvolvimento subsequente de uma vascularização intrínseca durante a organogênese, ramificação dos brotos e regeneração vascular das folhas (HAJNÝ; TAN; FRIML, 2022).

Através do mecanismo de canalização da auxina, a auxina promove a formação de canais auto organizados que se originam de um campo amplo de células transportadoras de auxina e gradualmente se refinam em canais bem definidos com capacidade de transporte de auxina aprimorada. Esses canais surgem de uma fonte de auxina e se estendem em direção a um dreno de auxina, com células individuais passando por polarização coordenada ao integrar sinais da fonte de auxina, do sumidouro, do contexto tecidual e do estado das células circundantes (BENNETT; HINES; LEYSER, 2014; HAJNÝ; TAN; FRIML, 2022).

A auxina atua de maneira multifuncional em diversas concentrações, resultando em diferentes efeitos no desenvolvimento das plantas. Em concentrações mais baixas, a auxina principalmente estimula o alongamento celular, promovendo o crescimento de certos tecidos vegetais. Em contrapartida, concentrações mais elevadas de auxina podem inibir o alongamento celular e favorecer a divisão celular, contribuindo para a formação de novos tecidos e órgãos (BHALERAO; BENNETT, 2003). A regulação do desenvolvimento pela auxina é específica para cada tecido, já que diferentes tecidos vegetais apresentam sensibilidades distintas ao hormônio, permitindo crescimento diferencial e respostas de desenvolvimento que são cruciais para a arquitetura e adaptabilidade da planta.

Adicionalmente, diversos estudos sugerem que as diferenças no tempo de resposta e na concentração de auxina apontam para mecanismos distintos no crescimento celular induzido em caules e raízes (BAILLY *et al.*, 2008; PAŘÍZKOVÁ; PERNISOVÁ; NOVÁK, 2017; RAKUSOVÁ *et al.*, 2011, 2016; TANIGUCHI *et al.*, 2017). Raízes e brotos respondem de maneira distinta à auxina devido às suas sensibilidades e funções específicas. Por exemplo, a aplicação exógena de auxina em concentrações de até 10  $\mu\text{M}$  promove o alongamento do hipocótilo em *Arabidopsis* sob condições de luz (ADAMOWSKI; LI; FRIML, 2019), enquanto concentrações tão baixas quanto 5 nM podem inibir o crescimento radicular (FENDRYCH *et al.*, 2018).

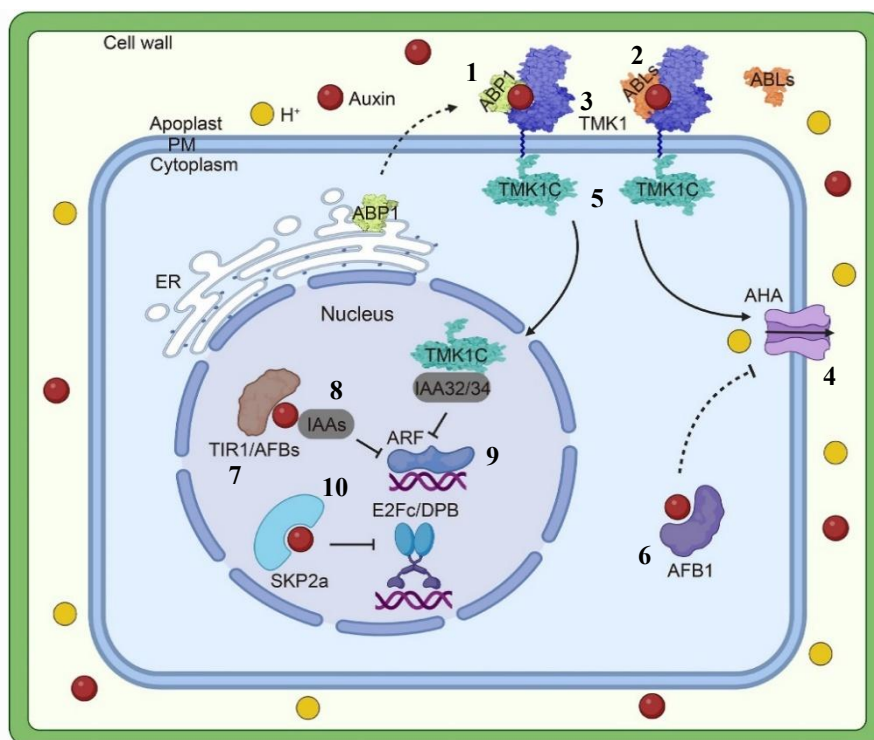
A auxina pode desencadear respostas celulares rápidas e lentas, dependendo do contexto de desenvolvimento ou das condições ambientais. As respostas rápidas ocorrem em segundos ou minutos, frequentemente em menos de 1 minuto, e incluem despolarização da membrana celular, fluxo de íons de hidrogênio, oscilações de íons de cálcio, aumento do volume do protoplasto, remodelação do citoesqueleto e regulação do tráfego endocítico de transportadores de auxina, como os PIN (ADAMOWSKI; LI; FRIML, 2019; BARBEZ *et al.*, 2017; BATES; GOLDSMITH, 1983; FIEDLER; FRIML, 2023; MONSHAUSEN *et al.*, 2009; NARASIMHAN *et al.*, 2021; SERRE *et al.*, 2021; ZHOU *et al.*, 2024). As respostas celulares lentas se desenvolvem ao longo de horas a dias, caracterizando-se por mudanças sustentadas na expressão gênica e na síntese de proteínas, influenciando o crescimento, a divisão e a diferenciação celular, e, conseqüentemente, processos de desenvolvimento associados (DUBROVSKY *et al.*, 2008; HEISLER *et al.*, 2005; REINHARDT *et al.*, 2003).

As vias de sinalização extracelular da auxina são mediadas por um complexo formado pela proteína *Auxin-Binding Protein 1* (ABP1), pela família de proteínas *Auxin-Binding Proteins like* (ABLs) e pelas *Tyrphostin-Activated Kinases* (TMKs), desempenhando um papel crucial na resposta às auxinas. A ABP1 liga-se à auxina, facilitando a percepção do

hormônio e a subsequente resposta celular. As ABLs, semelhantes à ABP1, também estão envolvidas na ligação da auxina e na modulação da sinalização. As TMKs, ou tirosina quinases ativadas por *tyrphostin*, atuam como mediadoras na transdução do sinal, catalisando reações de fosforilação essenciais para a resposta à auxina. A proteína ABP1, identificada há três décadas como uma das primeiras quinases receptoras do tipo repetição rica em leucina (RLKs) em *Arabidopsis*, é um componente essencial na sinalização da auxina na superfície celular (CAO *et al.*, 2019; CHANG *et al.*, 1992; XU *et al.*, 2014; YU *et al.*, 2023).

Por outro lado, nas vias de sinalização de auxina intracelulares, a sinalização baseada em *Transport Inhibitor Response 1* (TIR1)/*Auxin Signaling F-box* (AFB) é fundamental. A regulação transcricional mediada por TIR1/AFBs, conhecida como a via clássica de sinalização de auxina, é vital para as respostas de auxina (XU *et al.*, 2014) (Figura 12). Estudos recentes indicam que o complexo ABP1-TMK1 é essencial para respostas rápidas mediadas por fosfato, fluxo citoplasmático e desenvolvimento de estruturas vasculares após tratamento com auxina (HAJNÝ; TAN; FRIML, 2022).

**Figura 12.** As vias de sinalização de auxina extracelulares e intracelulares em plantas.



**Nota:** As vias de sinalização de auxina extracelulares envolvem a interação das proteínas ABLs (1) e ABP1 (2) com a quinase TMK1 (3) na membrana plasmática, ativando a H<sup>+</sup>-ATPases (4) para acidificação do apoplasto e promovendo a clivagem do domínio C-terminal de TMK1 (5) para regulação gênica no núcleo. No citosol, o receptor AFB1 (6) inibe a H<sup>+</sup>-ATPases inibindo o fluxo de H<sup>+</sup> para o apoplasto. No núcleo, a auxina se liga aos receptores TIR1/AFBs (7), induzindo a degradação de repressores Aux/IAA (8) e liberando os fatores de

transcrição ARF (9), além de interagir com SKP2a (complexo SCF Skp1-Cullin-F-box) (10) para promover a expressão de genes do ciclo celular.

**Fonte:** TANG; YU; XU, 2024

A interação entre as vias de sinalização de auxina extracelulares e intracelulares é essencial para a coordenação das respostas de auxina. As diferentes vias de percepção e sinalização de auxina são coordenadas em resposta ao hormônio para direcionar os mesmos componentes de sinalização, desempenhando papéis sobrepostos, antagonistas ou específicos através dos receptores intracelulares TIR1/AFBs e dos co-receptores extracelulares ABP1/ABLs-TMKs. Essa coordenação é importante para controlar diversos processos associados à auxina no desenvolvimento das plantas, incluindo crescimento ácido, efeitos de dosagem, respostas rápidas e lentas, e canalização (CAO *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2014; YU *et al.*, 2023). A coordenação dessas vias permite que as plantas se adaptem rapidamente às mudanças nas condições ambientais, enquanto sustentam estratégias de desenvolvimento a longo prazo. As propriedades combinadas da auxina formam um sistema regulatório complexo e dinâmico, onde a auxina atua como um regulador principal, guiando de forma eficiente e precisa o desenvolvimento das plantas e suas respostas aos estímulos ambientais (TANG; YU; XU, 2024).

### **2.2.3 Regulação transcricional mediada pelas auxinas**

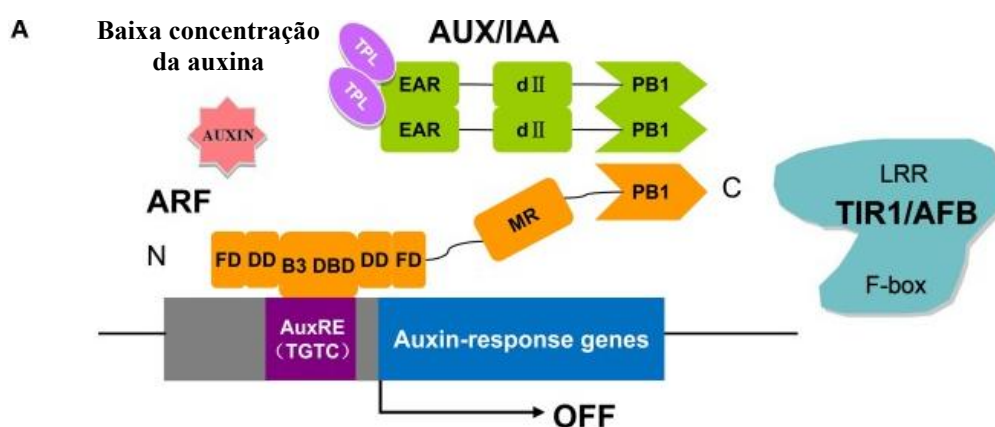
A resposta das plantas à auxina envolve alterações na regulação gênica (LISCUM; REED, 2002). Genes que são ativados ou reprimidos pela auxina contêm elementos de resposta à auxina (AuxRE) em seus promotores, que interagem com fatores de transcrição da família ARF (GUILFOYLE; HAGEN, 2007; LI *et al.*, 2016; MOCKAITIS; ESTELLE, 2008). Variações nos níveis de auxina podem induzir rapidamente a expressão de certos genes, conhecidos como genes de resposta precoce à auxina (AERGs). Esses genes incluem a família dos ARFs, genes Auxina/Ácido indol-3-acético (Aux/IAA), a família GH3, que é responsiva à auxina, e a família de pequenos RNAs regulados positivamente pela auxina (SAUR) (BAO *et al.*, 2024).

A família dos genes ARF é composta por fatores de transcrição modulares com domínios conservados ao longo de centenas de milhões de anos de evolução (FINET *et al.*, 2013). Esses genes são expressos de forma dinâmica e diferencial durante o desenvolvimento das plantas, e estudos genéticos mostram que diferentes ARFs regulam processos de

desenvolvimento distintos (RADEMACHER *et al.*, 2012). As proteínas ARF contêm domínios responsáveis pela ligação ao DNA, ativação ou repressão transcricional e interações proteína-proteína, desempenhando papéis essenciais na percepção e sinalização da auxina (DI; ZHANG; GUO, 2015; GUILFOYLE; HAGEN, 2007). A sinalização da auxina é transmitida por meio da interação entre fatores de resposta à auxina e proteínas Aux/IAA.

As proteínas Aux/IAA, são de curta duração e atuam no núcleo, interagem com os ARFs em condições de baixo nível de auxina para inibir a ativação dos genes-alvo dos ARFs. Quando os níveis de auxina aumentam, as Aux/IAA são ubiquitinadas por meio da interação com o *Transport Inhibitor Response 1/Auxin Signaling F-box* (TIR1/AFB) e degradadas pelo proteossoma 26S, resultando na liberação da atividade das ARFs (LI, Si-Bei *et al.*, 2016; TAN *et al.*, 2007; WEIJERS; WAGNER, 2016). A diversificação e a complexidade dos papéis reguladores da auxina no desenvolvimento são alcançadas por várias combinações regulatórias transcricionais Aux/IAA-ARF (CHAPMAN; ESTELLE, 2009; JING *et al.*, 2023; LEYSER, 2018; WEIJERS; WAGNER, 2016) (Figura 13).

**Figura 13.** Os principais componentes na percepção e sinalização da auxina. (A) Proteínas Aux/IAA formam multímeros com os ARFs e recrutam TPL para a cromatina. (B) Altos níveis de auxina promovem a ubiquitinação e degradação dos Aux/IAs através do SCFTIR1/AFB e do proteossoma 26S.





complexas da auxina não podem ser completamente explicadas por essa via. Algumas proteínas Aux/IAA são incapazes de se ligar à proteína TIR1/AFB devido à falta dos domínios estruturais conservados I e/ou II. Consequentemente, seu mecanismo de ação difere do mecanismo clássico de sinalização da auxina mediado por TIR1/AFB (BAO *et al.*, 2024). Estudos realizados por (CHANDLER, 2016; YU *et al.*, 2023) confirmaram a existência de mecanismos não clássicos de transdução de sinal da auxina em múltiplos níveis regulatórios. Esses mecanismos não clássicos controlam conjuntamente os complexos processos de desenvolvimento das plantas, coordenando-se com as vias clássicas de transdução de sinal.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da interação da ConM, isoladas das sementes de *Canavalia maritima*, com a auxina ácido indol-3-acético na biodisponibilidade do fitohormônio em segmentos foliares de *Nicotiana tabacum* cultivados *in vitro*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência da ConM no processo de organogênese em segmentos foliares de *N. tabacum*.
- Examinar as alterações morfológicas em segmentos foliares de *N. tabacum* infiltrados a vácuo com AIA juntamente com a ConM.
- Investigar o efeito oxidativo da ConM em segmentos foliares e calos de *N. tabacum*.
- Analisar os níveis de expressão dos genes relacionados na resposta ao AIA, fatores de regulação do crescimento e fatores de resposta à auxina.



## 4 MATERIAS E METODOS

### 4.1 Purificação da lectina

#### 4.1.1 Obtenção do material biológico e extração proteica

A ConM foi obtida a partir das sementes de *C. maritima*, e purificadas seguindo protocolos previamente estabelecidos por Ceccatto e colaboradores (2002). As sementes de *C. maritima* foram coletadas na praia de Tabuba (Latitude: -3.64766052 e Longitude: -38.6925441) no município de Caucaia, no estado do Ceará. O cadastro para atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA foi obtido junto ao SisGen com o seguinte número: AFD4698.

As sementes foram coletadas maduras, lavadas e secas em estufa por 24h a 37 °C. Em seguida, os tegumentos das sementes foram removidos, expondo-se o endosperma do qual foi triturado em um moedor de café e peneirado, obtendo-se uma farinha fina, apropriada para o processo de extração proteica. As proteínas solúveis foram extraídas pelo contato com a solução NaCl 0,15 M, na proporção (1:10,  $m_{\text{farinha}}/V_{\text{NaCl}}$ ), sob agitação por 3 horas à temperatura ambiente. O material, em seguida, foi centrifugado a 16.000 xg durante 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi denominado extrato total, sendo filtrado em papel de filtro e em seguida submetido à purificação em coluna cromatográfica por afinidade.

#### 4.1.2 Cromatografia de afinidade em gel de Sephadex G-100

A ConM foi purificada através de uma única etapa de cromatografia de afinidade, como adaptado por Ceccatto e colaboradores (2002). O extrato total, obtido da extração total de proteínas, foi aplicado em uma coluna de Sephadex G-100 (a coluna é constituída de cadeias poliméricas de dextrana por meio de ligações covalentes cruzadas), previamente equilibrada com a solução NaCl 0,15 M. O extrato permaneceu em contato com a matriz *overnight*. Após o período de contato, a coluna foi lavada com a mesma solução de equilíbrio para remover o material que não interagiu com a coluna, denominado P<sub>1</sub>. Em seguida, o material retido, denominado P<sub>2</sub>, foi eluído com a solução glicina 0,1 M pH 2,6. A cromatografia foi realizada a um fluxo de aproximadamente 1 mL/min e as foram coletados em frações de aproximadamente 5,0 mL e monitorados na absorbância no comprimento de onda de 280 nm. O P<sub>2</sub>, que corresponde teoricamente a lectina purificada, foi dialisado exaustivamente contra água deionizada, liofilizado e armazenado.

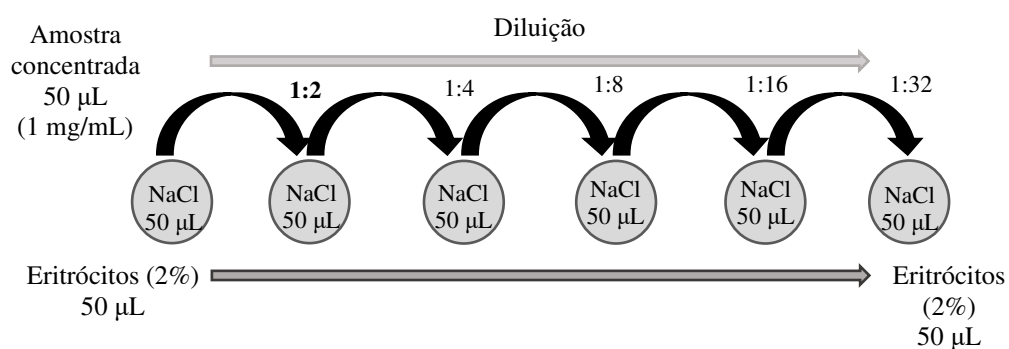
A concentração de proteínas totais solúveis no extrato e nas frações foi verificada pelo método descrito por Bradford (1976). A massa molecular aparente da ConM durante as etapas de purificação foi acompanhada através de eletroforese em gel de poliacrilamida, baseada na técnica desenvolvida por Laemmli (1970).

#### 4.2 Detecção da atividade hemaglutinante

Os ensaios para a detecção de atividade hemaglutinante das amostras foram realizados através de diluições seriadas em microplaca de 96 poços do tipo fundo “V”, a partir de uma adaptação ao método descrito por Moreira e Perrone (1977).

As amostras contendo a ConM foram diluídas, em triplicata, em solução NaCl 0,15 M, de forma seriada nos poços, seguindo a proporção de 1:2, 1:4, 1:8 e assim por diante. Após a diluição seriada, foi adicionado 50  $\mu$ L da suspensão de eritrócitos de coelho 2% (v/v) (Figura 14). Para o controle negativo os volumes de NaCl 0,15 M e solução de hemácias 2% (v/v) foram iguais. Após 30 min de incubação a 37 °C e repouso por mais 30 min a temperatura ambiente. A presença ou não de hemaglutinação foi observada macroscopicamente a olho nu.

**Figura 14.** Esquema ilustrativo para a determinação da atividade hemaglutinante para a lectina de *Canavalia maritima* (ConM)



**Fonte:** Autor, 2024.

Os títulos de hemaglutinação foram expressos em unidade de hemaglutinação ( $\text{UH.mL}^{-1}$ ) que corresponde ao inverso da maior diluição da amostra que apresente nítida aglutinação.

### **4.3 Cultivo *in vitro* dos explantes foliares de *Nicotiana tabacum***

#### **4.3.1 Obtenção e desinfestação do material vegetal**

As plântulas de *N. tabacum* foram obtidas a partir da germinação das sementes. A desinfestação das sementes foi realizada em câmara de fluxo laminar, utilizando uma solução de etanol a 70% (v/v) por 30 segundos. O excesso da solução etanólica foi removido com água autoclavada. Na segunda etapa do processo de desinfestação, foi utilizada uma solução de hipoclorito de sódio a 33% (v/v) com 1% de cloro ativo, por 12 minutos. Após esse período, o excesso de hipoclorito de sódio foi removido com água autoclavada.

As sementes de *N. tabacum*, previamente desinfestadas, foram transferidas para placas de Petri contendo algodão e papel filtro estéreis umedecidos com água autoclavada. Após a germinação, as plântulas foram transferidas para frascos contendo 25 mL de meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), sem regulador de crescimento, contendo sacarose (2%), ágar (0,7%) e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem (121 °C, 15 minutos). As plântulas foram mantidas em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, a uma temperatura de  $27 \pm 2$  °C. Após o desenvolvimento das mudas, foram realizados subcultivos para a micropropagação do material vegetal.

#### **4.3.2 Infiltração à vácuo dos segmentos foliares de fumo em solução suplementada com AIA e lectina**

Os segmentos foliares de *N. tabacum* foram obtidos a partir das plantas de tabaco durante os ciclos de subcultivo na etapa de micropropagação (ver item 4.3.1). As folhas foram seccionadas em discos foliares com área de 0,5 cm<sup>2</sup>, preservando as nervuras secundárias, e submetidas ao processo de infiltração a vácuo.

Para os experimentos de infiltração a vácuo, seguiu-se a metodologia descrita por Chen et al. (2013) e King et al. (2014). Os segmentos foliares foram imersos em 100 mL de soluções contendo 20 µM de ácido indol-3-acético (AIA) sem a ConM (controle) e nas concentrações de 5 µM, 20 µM e 40 µM da ConM, previamente filtradas com membranas de microfiltração de 0,2 µm. Os segmentos imersos nas soluções foram submetidos por 1 minuto à frequência de 40 Hz, em seguida, os segmentos foliares na solução foram mantidos no vácuo de 600 mmHg por 5 minutos. Após o processo de infiltração à vácuo, os segmentos foliares

foram inoculados em placas de Petri (90 mm) contendo meio MS, sacarose (2%), ágar (0,7%) e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem (121 °C, 15 minutos).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis repetições, sendo cada repetição composta por 10 segmentos foliares por placa. As placas de Petri, contendo os segmentos foliares co-infiltrados com a lectina, foram mantidas em sala de crescimento sob fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, a uma temperatura de  $27 \pm 2$  °C por um período de 28 dias.

#### **4.3.3 Avaliação do desenvolvimento dos explantes**

O desenvolvimento dos explantes foi avaliado através de parâmetros morfológicos (formação de calos, biomassa fresca e seca), bioquímicos (atividade do sistema antioxidante e quantificação de pigmentos fotossintéticos) e de níveis de expressão de genes relacionados a regulação do AIA. Esses parâmetros foram medidos para observar os efeitos dos tratamentos estudados no desenvolvimento dos explantes. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prism®.

#### **4.4 Peroxidação de lipídeos**

Para avaliar a peroxidação de lipídeos, foi estimado o conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, do inglês, *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*), conforme descrito por Heath e Packer (1968). Para isso, 200 mg dos segmentos foliares dos diferentes tratamentos foram macerados na presença de nitrogênio líquido. Durante a maceração, adicionou-se 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1%, e o material foi macerado por mais três minutos. O material resultante foi centrifugado a  $12.000 \times g$  por 15 minutos a 4 °C. Em seguida, 500 µL desse extrato foram adicionados a uma solução de TCA 20% (p/v) e TBA 0,5% (p/v) em microtubos. A reação foi incubada em banho-maria a 95 °C por 25 minutos e interrompida resfriando os tubos de ensaio em banho de gelo. Após 30 minutos à temperatura ambiente, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a dois comprimentos de onda distintos: 532 nm e 660 nm (para a formação do complexo MDA-TBA).

O conteúdo de lipídeos foi determinado após a subtração das leituras de absorbância em 532 nm e 660 nm, utilizando o coeficiente de extinção molar de  $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , sendo o resultado expresso em  $\text{nmol/g}^{-1}$  MF. Esta análise foi realizada utilizando amostras compostas,

formadas pelos diferentes segmentos foliares para cada tratamento, e as análises foram feitas em triplicata.

#### **4.5 Extração de Proteínas Totais**

O protocolo para extração das proteínas totais dos calos e dos segmentos foliares de *N. tabacum* seguiu a metodologia descrita por (PONTE *et al.*, 2014). Para isso, 500 mg do material vegetal foram pulverizados com nitrogênio líquido e macerados com 2 mL de tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, contendo DTT 2 mM. A mistura foi centrifugada a  $12.000 \times g$  por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido foi utilizado como extrato proteico total para as determinações das atividades enzimáticas e quantificação proteica.

#### **4.6 Análise das enzimas do sistema antioxidante**

##### **4.6.1 Atividade da Ascorbato Peroxidase (APX)**

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi determinada pelo método de Nakano e Asada (1981). Para isso, alíquotas de 0,1 mL do extrato enzimático foram adicionadas a 2,7 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, contendo 0,5 mM de ácido ascórbico (m/v). Em seguida, adicionou-se 0,2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 mM ao meio de reação, acompanhando-se o decaimento da absorbância a 290 nm. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro no intervalo de 0 a 300 segundos, com medições a cada 15 segundos. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar do ascorbato, e os resultados foram expressos em consumo de  $\mu\text{M}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>·min<sup>-1</sup>·g<sup>-1</sup>.

##### **4.6.2 Atividade da Catalase (CAT)**

A atividade da catalase (CAT) foi determinada pelo método descrito por (BEERS; SIZER, 1952). A reação foi iniciada com a adição de 50 uL do extrato enzimático ao meio de reação, contendo 2,95 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, adicionado de 20 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi monitorado em espectrofotômetro a 240 nm, e a atividade foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os resultados foram expressos em consumo de  $\mu\text{M}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>·min<sup>-1</sup>·g<sup>-1</sup>.

#### 4.6.3 Atividade da Peroxidase do Guaiacol (POX)

A atividade da peroxidase do guaiacol (POX) foi determinada pela metodologia descrita por Urbanek et al. (1991). A mistura reacional continha tampão fosfato de potássio 100 mM acrescido de EDTA 0,1  $\mu$ M, pH 7,0, e  $\text{H}_2\text{O}_2$  15 mM. A reação foi iniciada pela adição de 10  $\mu$ L do extrato enzimático ao meio de reação, e o aumento da absorbância foi medido a 470 nm por minuto. A atividade foi determinada pela quantidade de tetraguaicol formado, utilizando o coeficiente de extinção molar de  $26,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , considerando que 4 moles de guaiacol são necessários para reduzir 1 mol de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Os resultados foram expressos em consumo de  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ .

#### 4.7 Estimativa das Concentrações de Pigmentos Fotossintéticos

As concentrações de pigmentos fotossintéticos foram estimadas conforme adaptações dos procedimentos descritos por (LICHTENTHALER, Hartmut K.; BUSCHMANN, 2001). Os extratos foram preparados utilizando-se 200 mg dos segmentos foliares dos diferentes tratamentos macerados na presença de nitrogênio líquido em seguida foi adicionado 2 ml de acetona 80%. As leituras de absorbância nos comprimentos de onda de 665, 649 e 480 nm. O conteúdo de pigmento foi determinado usando as equações:

##### Equação 1.

$$\text{Clorofila a} = 12.47 (A_{665}) - 3.62 (A_{649});$$

##### Equação 2.

$$\text{Clorofila b} = 25.06 (A_{649}) - 6.50 (A_{665});$$

##### Equação 3.

$$\text{Carotenoides} = [1000 (A_{480}) - 1.29 (\text{clorofila a}) - 53.78 (\text{clorofila b}) ]/220.$$

#### 4.8 Análise de expressão de genes relacionados com a resposta ao fitohormônio AIA

##### 4.8.1 Extração do RNA total e síntese de cDNA

Para a análise da expressão dos genes Aux/IAA responsivos à auxina, fatores de regulação do crescimento e fator de resposta à auxina, foram utilizados segmentos foliares de *N. tabacum* (conforme item 4.3.1), coletados após o processo de infiltração a vácuo nos tempos de 24h, 48h e 72h. Aproximadamente 200 mg do segmento foliar foram macerados em

nitrogênio líquido, e o RNA total foi extraído utilizando o RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), conforme as instruções do fabricante. Foi adicionado 700 µL do tampão RLT e 10 µL de β-mercaptoetanol às amostras maceradas, homogeneizando a mistura com vórtex. A solução resultante foi transferida para uma coluna QIAshredder spin, acoplada a um tubo coletor de 2 mL, e centrifugada a 25 °C por 2 minutos a 12.000 xg. O sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo microtubo, onde foram adicionados 0,4 mL de etanol 95%, misturando por inversão.

A solução foi então transferida para uma coluna RNeasy Mini Spin, também acoplada a um tubo coletor de 2 mL, e centrifugada à temperatura ambiente (25 °C) por 15 segundos a 8.000 xg. O eluído foi descartado e 400 µL de tampão RW1 foram adicionados à coluna, seguida de centrifugação por 15 segundos a 8.000 xg. Após esta lavagem com RW1, a coluna foi transferida para um novo tubo coletor e 500 µL de tampão RPE foram adicionados, centrifugando-se a temperatura ambiente por 15 segundos a 8.000 xg. O eluído foi descartado e mais 500 µL de tampão RPE foram adicionados à coluna, com uma nova centrifugação a temperatura ambiente por 2 minutos a 8.000 xg para eliminar resíduos de etanol que pudessem interferir em reações posteriores. O eluído e o tubo coletor foram descartados e a coluna foi transferida para um novo tubo coletor de 1,5 mL. Foram adicionados 40 µL de água livre de RNases diretamente na coluna, seguida de centrifugação por 1 minuto a 8.000 xg para eluição do RNA. O RNA eluído foi armazenado a -20 °C para posterior quantificação, análises eletroforéticas e ensaios de RT-PCR.

O RNA total foi utilizado para a síntese de DNA complementar (cDNA), empregando o Kit de Transcriptase Reversa IMpromII™ (Promega), conforme as instruções do fabricante. Para a reação, 1 µg da amostra de RNA foi incubado com 500 ng de iniciador Oligo(dT)18 por 5 minutos a 70 °C, seguido de 5 minutos a 4 °C. Em seguida, foi adicionada uma mistura reacional contendo: 4 µL de tampão de transcrição reversa 5x concentrado, 2,4 µL de MgCl<sub>2</sub> 0,025 M, 1 µL de dNTP 0,01 M e 1 µL da enzima transcriptase reversa (1 U/µL). A síntese da fita complementar ocorreu a 25 °C por 5 minutos, 42 °C por 1 hora, seguida de inativação da enzima a 75 °C por 15 minutos. O cDNA obtido foi armazenado a -20 °C para posteriores reações de PCR. Para a realização da PCR, utilizou-se 1 µL do cDNA resultante.

#### **4.8.2 PCR em tempo real**

As reações de PCR quantitativa (qPCR) foram realizadas para avaliar a expressão dos genes Aux/IAA responsivos à auxina, Nt-IAA14 e Nt-IAA17, do fator de resposta à auxina,

ARF1, e do gene da família de RNAs pequenos induzidos por auxina, SAUR59 (Apêndice A). Como referência interna, foram utilizados quatro genes de expressão constitutiva em *N. tabacum*: actin, L25, Ntubc2 e EF-1 $\alpha$  (Apêndice A) (SCHMIDT; DELANEY, 2010). Amostras sem a adição de cDNA foram utilizadas como controles negativos (NTC = *no template control*). As reações foram preparadas conforme as instruções do kit GoTaq qPCR Sybr Green (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. As reações foram realizadas em triplicata e executadas no QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). A otimização das reações foi realizada para obter uma eficiência na faixa de 95-105%. O nível de expressão de cada gene foi avaliado pelo Cq (Ciclo de quantificação). Ao término da reação de qPCR, foi gerada a curva de dissociação de 60 a 99 °C para verificar a presença de um único pico das amostras para os genes utilizados individualmente. Os cálculos das quantificações gênicas foram feitos pelo método Delta-Delta-CT (PFAFFL, 2001). Foram gerados gráficos de expressão relativa para cada gene analisado, comparando-se com os genes de referência.

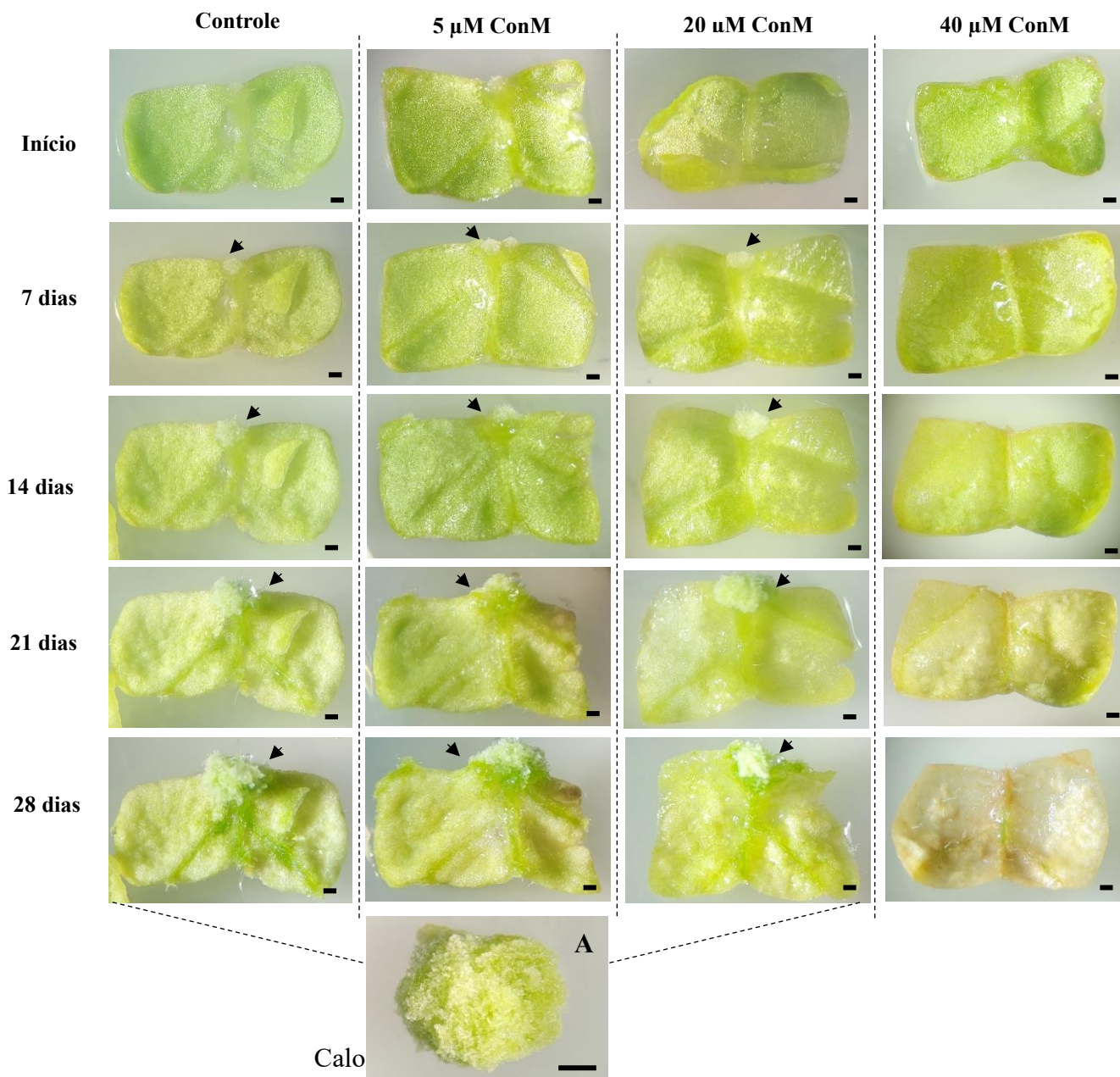
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Efeito da interação da ConM com o AIA em segmentos foliares de *N. tabacum* cultivados *in vitro*

A presença da auxina induziu a formação de calos nos explantes foliares de *N. tabacum* cultivados *in vitro*, porém os volumes dos calos são distintos nas diferentes concentrações da ConM. A formação de calos foi observada após 7 dias de cultivo em todos os tratamentos, exceto nos segmentos foliares infiltrados com 40  $\mu$ M de ConM. A origem dos calos nos segmentos foliares ocorreu predominantemente na região vascular, apresentando coloração branco-esverdeada (Figura 15A). Nos segmentos foliares infiltrados com 40  $\mu$ M da ConM, foi observado uma alteração morfológica, caracterizada por um clareamento tecidual, sugerindo um processo de oxidação e perda de pigmentos fotossintetizantes (Figura 15).



**Figura 15.** Segmentos foliares de *Nicotiana tabacum* tratados com 20  $\mu\text{M}$  de AIA e 5, 20 ou 40  $\mu\text{M}$  da ConM. Segmentos foliares de *N. tabacum* infiltrados a vácuo com 20  $\mu\text{M}$  de ácido indol-3-acético juntamente com 5  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  ou 40  $\mu\text{M}$  da ConM, em seguida, cultivados em meio MS sem regulador de crescimento por 28 dias a 26 °C foto período 12h. (Escala 1 mm). (A) Calo formado com 28 dias de cultivo, com coloração branco-esverdeado.



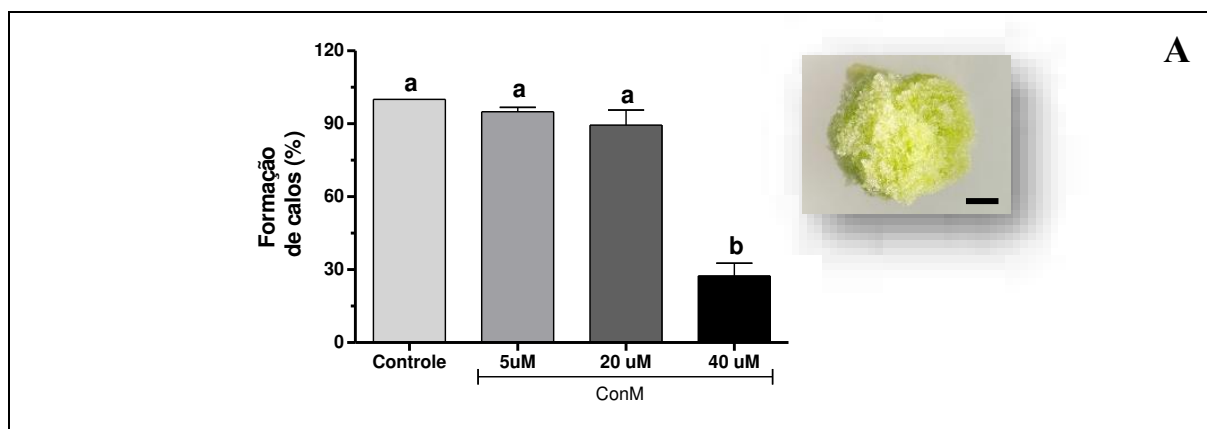
Fonte: Autor, 2024.

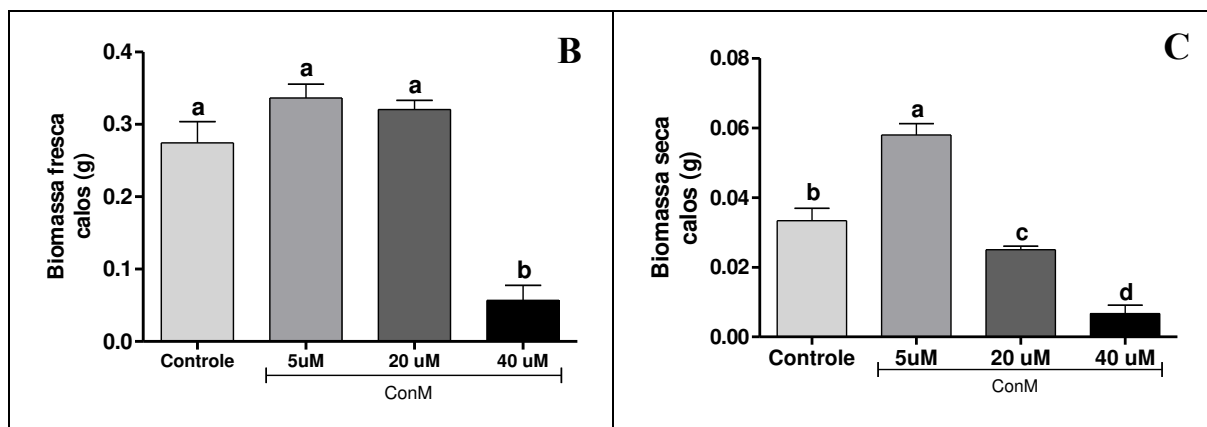
Segundo Ikeuchi *et al.* (2019), na cultura de tecidos vegetais, o calo se forma a partir de explantes vegetais em resposta a uma alta proporção da auxina em relação a citocinina, esse equilíbrio entre auxina e citocinina determina o destino dos órgãos em regeneração. Durante o cultivo *in vitro*, as propriedades do tecido de origem podem influenciar

significativamente as características do calo, incluindo os níveis de auxina e seu transporte. Esta influência é especialmente relevante quando o calo se origina de tipos de células foliares produtoras de auxina, como aquelas encontradas no ápice e nas bordas da folha, tecido do mesofilo vascular ou células meristemóides (KNEUPER *et al.*, 2021).

O tratamento com 40  $\mu\text{M}$  de ConM reduziu a formação de calos em 72,60%, o que foi acompanhado por uma diminuição na biomassa fresca e seca dos calos (Figura 16). O peso fresco dos calos tratados com a maior concentração da ConM apresentou uma redução de 77,78% em comparação ao tratamento controle (sem lectina). No entanto, não foram observadas diferenças significativas na formação e no peso fresco dos calos nos tratamentos com 5  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$  da ConM (Figura 16A e 16B). Em relação à biomassa seca, os calos tratados com 5  $\mu\text{M}$  da ConM apresentaram um aumento de 25,93% em comparação ao controle, enquanto os tratamentos com 20  $\mu\text{M}$  e 40  $\mu\text{M}$  da ConM resultaram em reduções de 18,52% e 77,78%, respectivamente (Figura 16B e 16C).

**Figura 16.** Formação, determinação da biomassa fresca e seca dos calos gerados a partir de segmentos foliares de *Nicotiana tabacum* infiltrados com ConM. (A) Porcentagem da formação, (B) Biomassa fresca e (C) seca dos calos obtidos a partir dos segmentos foliares de *N. tabacum* infiltrados a vácuo com 20  $\mu\text{M}$  de ácido indol-3-acético juntamente com 5  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  ou 40  $\mu\text{M}$  da ConM, em seguida, cultivados em meio MS sem regulador de crescimento por 28 dias a 26 °C foto período 12h.





**Nota:** Resultados expressos em termos de média  $\pm$  desvio padrão, obtidos a partir de três determinações independentes. A análise estatística foi realizada por meio da ANOVA. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Tukey, considerando um nível de significância de  $p < 0,05$ . A esquerda fotografia do calo de *Nicotiana tabacum* (Escala 1 mm).

**Fonte:** Autor, 2024.

De acordo com Ghanbari *et al.* (2018) e Hu *et al.* (2017), a indução da formação de calos em diversas espécies vegetais ainda apresenta desafios, e os mecanismos moleculares subjacentes à transição inicial do destino celular durante esse processo permanecem pouco compreendidos. Contudo, apesar da falta de evidências empíricas, suspeita-se que a organogênese da formação do calo a partir de explantes foliares compartilhem o processo inicial de reprogramação celular, que potencialmente envolve o acúmulo do AIA, no local da ferida (LIU *et al.*, 2014). Após a etapa inicial compartilhada de formação das células fundadoras da raiz, acredita-se que a organogênese da raiz e a formação de calos divergem, dependendo do tratamento com auxina exógena: a ausência de auxina exógena leva à regeneração da raiz, enquanto a aplicação de tratamento com altas concentrações de auxinas exógeno induz a formação de calos proliferantes (YU *et al.*, 2017).

O AIA é a forma mais ubíqua de auxina em plantas superiores e destaca-se entre todos os hormônios vegetais por ser transportado de forma polar e ativa a curta distância (de célula para célula), além de participar do transporte de longa distância entre órgãos. Este complexo mecanismo de transporte depende da interação entre a força quimiosmótica, a hidrólise de ATP e os transportadores de auxina (FRIML, 2022).

A proliferação das células do calo e a especificação das suas vias de desenvolvimento são fortemente influenciadas por fitohormônios exógenos, que controlam a biossíntese e a distribuição de hormônios endógenos. Os fitohormônios, por sua vez, desencadeiam uma cascata de vias de sinalização que iniciam o processo de diferenciação

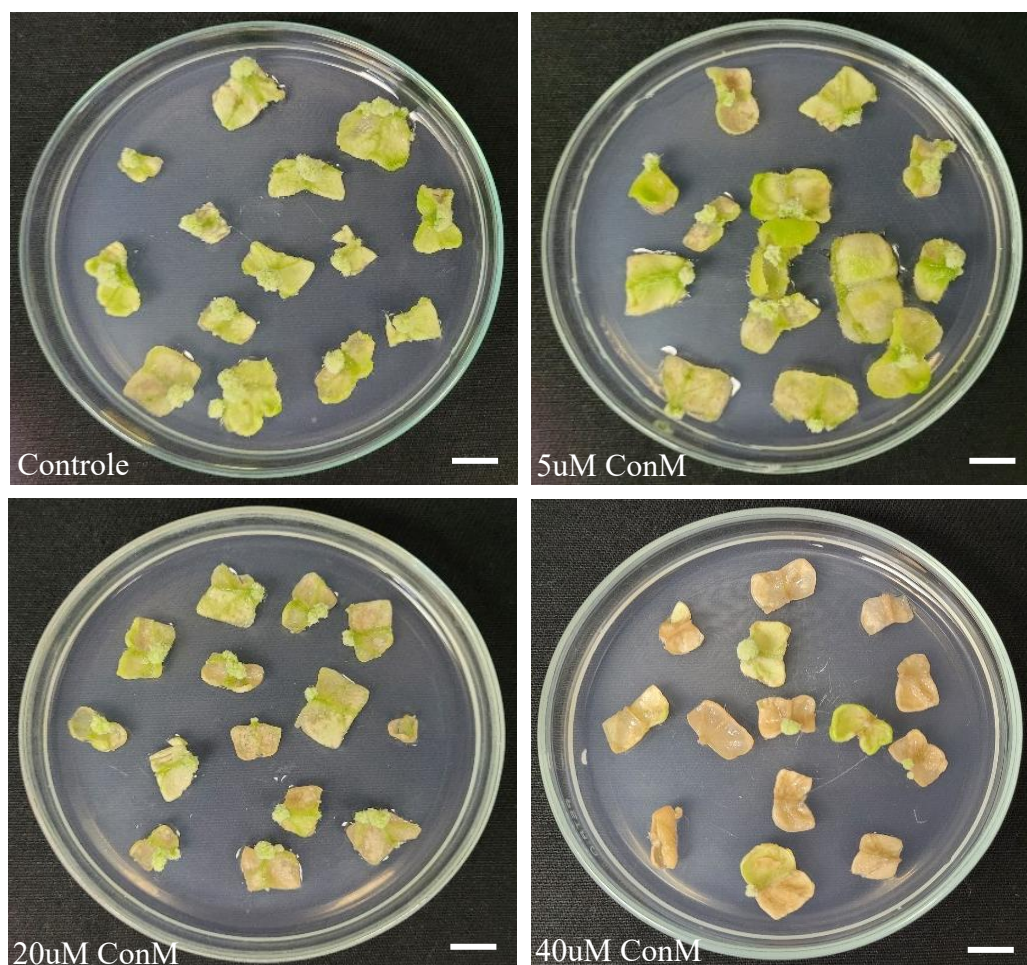


celular (IKEUCHI; SUGIMOTO; IWASE, 2013).

## 5.2 Conteúdo de pigmentos fotossintéticos dos segmentos foliares na presença da ConM

Os segmentos foliares de *N. tabacum* tratados com 5  $\mu$ M e 20  $\mu$ M da ConM apresentaram morfologia semelhante aos segmentos não tratados com lectina, mantendo pigmentação esverdeada (Figura 17). No entanto, os segmentos foliares submetidos à infiltração com 40  $\mu$ M da ConM exibiram alterações morfológicas atípicas, caracterizadas por descoloração do tecido foliar, indicando possível oxidação e degradação dos pigmentos relacionados à fotossíntese.

**Figura 17.** Placa com segmentos foliares de *Nicotiana tabacum* infiltrados com a ConM. Segmentos foliares de *N. tabacum* infiltrados à vácuo com 20  $\mu$ M de ácido indol-3-acético juntamente com 5  $\mu$ M, 20  $\mu$ M ou 40  $\mu$ M da ConM, em seguida, cultivados em meio MS sem regulador de crescimento por 28 dias a 26 °C foto período 12h. (Escala 1 cm).



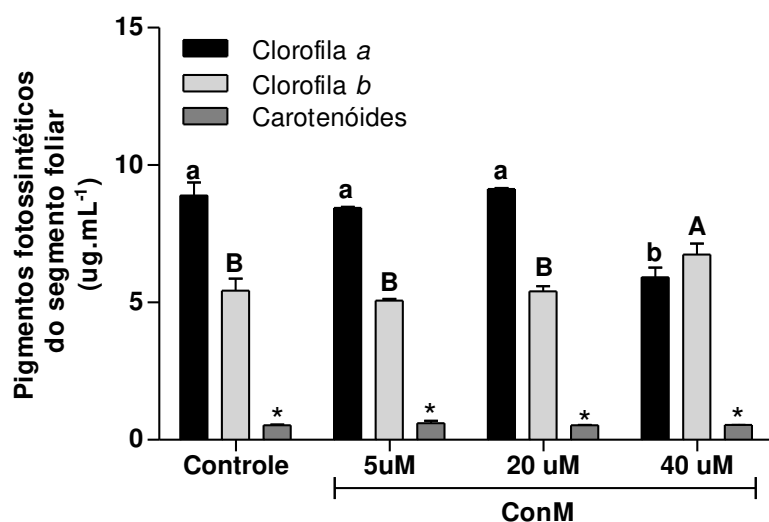
Fonte: Autor, 2024.

Os segmentos foliares da *N. tabacum* tratados com 5  $\mu$ M e 20  $\mu$ M da ConM, o conteúdo total da clorofila a foi superior ao da clorofila b, assim como, no controle. Esse resultado é consistente com a literatura atual, uma vez que, no centro de reação (RC), a antena interna liga apenas moléculas de Chl a, com proporção relativa, cerca de 100 Chl a no PSI e 35 Chl a no PSII. O núcleo dessas moléculas é altamente conservado em organismos fotossintéticos oxigenados. Enquanto que, os sistemas de antena externa podem ligar tanto Chl a quanto Chl b, com proporções gerais de Chl a/Chl b variando de 2 a 3, pois Chl b limita a transferência de energia excitônica (EET). O tamanho e a composição das antenas variam de acordo com os organismos e seus ambientes de crescimento, refletindo um equilíbrio entre a quantidade de Chl a e a adaptação ao ambiente (BELYAEVA *et al.*, 2016; CROCE; VAN AMERONGEN, 2020; LICHTENTHALER; BABANI; LANGSDORF, 2007; MIRKOVIC *et al.*, 2017).

A clorofila é um pigmento essencial na fotossíntese, e qualquer alteração em seu conteúdo pode afetar a eficiência desse processo. Devido à sensibilidade das reações fotossintéticas mediadas pela clorofila em ambientes diversos, as proteínas de ligação à clorofila a/b, bem como a própria clorofila e os carotenoides, são os primeiros componentes a serem monitorados e controlados em condições adversas (NG *et al.*, 2013). As clorofilas a (Chl a) e b (Chl b) são as principais moléculas coletoras de luz nos complexos de antena (LHCs) das plantas (GRUBER *et al.*, 2019).

No entanto, nos segmentos tratados com 40  $\mu$ M da ConM, a proporção entre clorofila a e clorofila b foi significativamente alterada, resultando em uma redução de 33,52% no conteúdo de clorofila a e um aumento de 24,29% no conteúdo de clorofila b em comparação ao controle (Figura 18). Segundo Gao, Guo e Shen (2024), essas alterações podem refletir uma modificação no tipo de complexo antena como estratégia de otimização do processo fotossintético em resposta ao tratamento, promovendo adaptação e sobrevivência.

**Figura 18.** Determinação dos teores de pigmentos fotossintéticos em segmentos foliares de *Nicotiana tabacum* na presença da ConM. Teores de pigmentos fotossintéticos em segmentos foliares de *N. tabacum* infiltrados a vácuo com 20  $\mu\text{M}$  de ácido indol-3-acético juntamente com 5  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  ou 40  $\mu\text{M}$  da ConM, em seguida, cultivados em meio MS sem regulador de crescimento por 28 dias a 26 °C foto período 12h.



**Nota:** Resultados expressos em termos de média  $\pm$  desvio padrão, obtidos a partir de três determinações independentes. A análise estatística foi realizada por meio da ANOVA. A presença do (\*) e letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre as concentrações. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Tukey, considerando um nível de significância de  $p < 0,05$ . A diferenciação entre tratamentos foi indicada por meio da utilização de letras distintas, sendo que letras minúsculas indicaram diferenças significativas entre as concentrações da clorofila a e letras maiúsculas indicaram diferenças entre as concentrações da clorofila b.

**Fonte:** Autor, 2024.

Segundo Jiang e Dehesh (2021), como resultado da evolução, os cloroplastos não apenas realizam a produção primária de biomassa, mas também sentem ambientes estressantes para desenvolver a regulação biogênica e operacional da expressão gênica do plastídio e do núcleo por meio de várias sinalizações retrógradas e sinalizações de fitohormônios.

Estudos indicam que tanto a auxina endógena quanto a exógena atuam como reguladores negativos do acúmulo de clorofila nos cotilédones durante a estiolação (LUO *et al.*, 2023). A relação entre auxina e desenvolvimento do cloroplasto foi destacada em diversos trabalhos (LIU *et al.*, 2020; SALAZAR-IRIBE; DE-LA-PEÑA, 2020). As alterações observadas em nosso estudo podem estar relacionadas à interação entre ConM e AIA, que afeta componentes do sistema fotossintético, como o conteúdo de clorofila. Isso sugere um possível

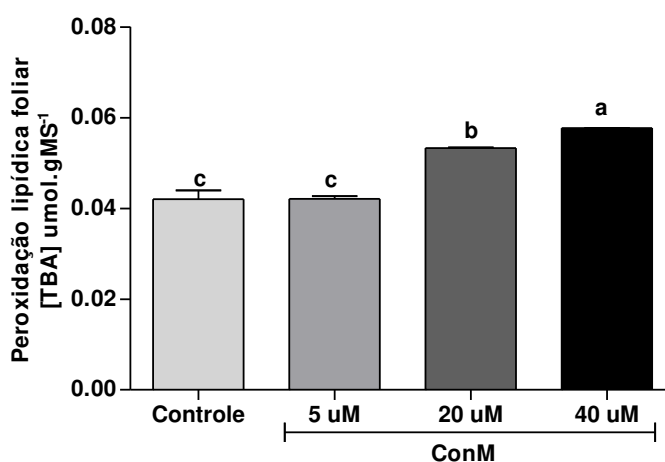
papel regulador da lectina na biodisponibilidade de AIA. Visto que a transdução do sinal da auxina, mediada pelos fatores de transcrição, é essencial na regulação da biossíntese de clorofila, interagindo direta ou indiretamente com genes de biossíntese de clorofila (SAGAR *et al.*, 2013; YUAN *et al.*, 2019, 2018).

Diversos genes relacionados à sinalização de auxina, como IAA/AUXs, ARFs, GH3, SAUR e TIR1, foram identificados como reguladores do desenvolvimento do cloroplasto (ARSOVSKI *et al.*, 2018; CRUZ *et al.*, 2018; ZOU *et al.*, 2020). Além disso, genes relacionados à biossíntese de auxina (YUCCA) e ao transporte de auxina (PIN) desempenham papéis críticos nesse processo (CHEN; ZOU; ZHAO, 2015; ZHENG *et al.*, 2016).

### 5.3 Efeito da ConM nas membranas dos segmentos foliares de *N. tabacum*

Os segmentos foliares de *N. tabacum* co-infiltrados com 20  $\mu\text{M}$  do AIA e 20  $\mu\text{M}$  ou 40  $\mu\text{M}$  da ConM apresentaram aumento na peroxidação lipídica após 28 dias de cultivo *in vitro*, conforme indicado pelo aumento dos níveis de TBA. Observou-se um incremento de 25% e 50% nos níveis de TBA nos segmentos tratados com 20  $\mu\text{M}$  e 40  $\mu\text{M}$  da ConM, respectivamente, em comparação com o controle (Figura 19). Esses resultados sugerem que concentrações superiores a 5  $\mu\text{M}$  da ConM provocam um aumento significativo nos danos às membranas celulares.

**Figura 19.** Avaliação da peroxidação lipídica em segmentos foliares de *Nicotiana tabacum* na presença da ConM. Peroxidação lipídica em segmentos foliares de *N. tabacum* infiltrados a vácuo com 20  $\mu\text{M}$  de ácido indol-3-acético juntamente com 5  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  ou 40  $\mu\text{M}$  da ConM, em seguida, cultivados em meio MS sem regulador de crescimento por 28 dias a 26 °C foto período 12h.



**Nota:** Resultados expressos em termos de média  $\pm$  desvio padrão, obtidos a partir de três determinações independentes. A análise estatística foi realizada por meio da ANOVA. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Tukey, considerando um nível de significância de  $p < 0,05$ .

**Fonte:** Autor, 2024.

Existem diversos relatos na literatura que fatores ambientais como a salinidade, temperatura extremas, concentrações de metais, danos mecânicos causam o aumento no nível de peroxidação de lipídeos e danos de membrana (LU *et al.*, 2018). Contudo, os resultados obtidos por este trabalho é o primeiro relato que peroxidação dos lipídios de membrana ocasionados por lectinas. Comparado com o controle, o TBA não aumentou significativamente na concentração de 5  $\mu\text{M}$  da lectina. Este resultado indica que a peroxidação lipídica grave da membrana plasmática ocorre em concentrações superiores a 5  $\mu\text{M}$  da ConM.

Neste estudo, o conteúdo de malondialdeído (MDA) foi avaliado por meio da formação do complexo TBA-MDA. Observou-se que o aumento nos níveis de MDA nos segmentos foliares está diretamente relacionado à concentração da ConM, indicando que as membranas celulares foram afetadas pelas altas concentrações da proteína. Conforme YONNY *et al.* (2017), o MDA é um subproduto gerado pelas plantas em resposta ao estresse, refletindo no grau de peroxidação lipídica das membranas celulares.

Os lipídeos são biomoléculas que desempenham um papel importante como componente estrutural da maioria das membranas celulares (PARIDA; DAS, 2005). O conteúdo de MDA, produto da peroxidação lipídica, tem sido considerado um indicador de dano oxidativo (MELONI *et al.*, 2003).

#### **5.4 Efeito oxidativo da ConM em segmentos foliares e calos de *N. tabacum***

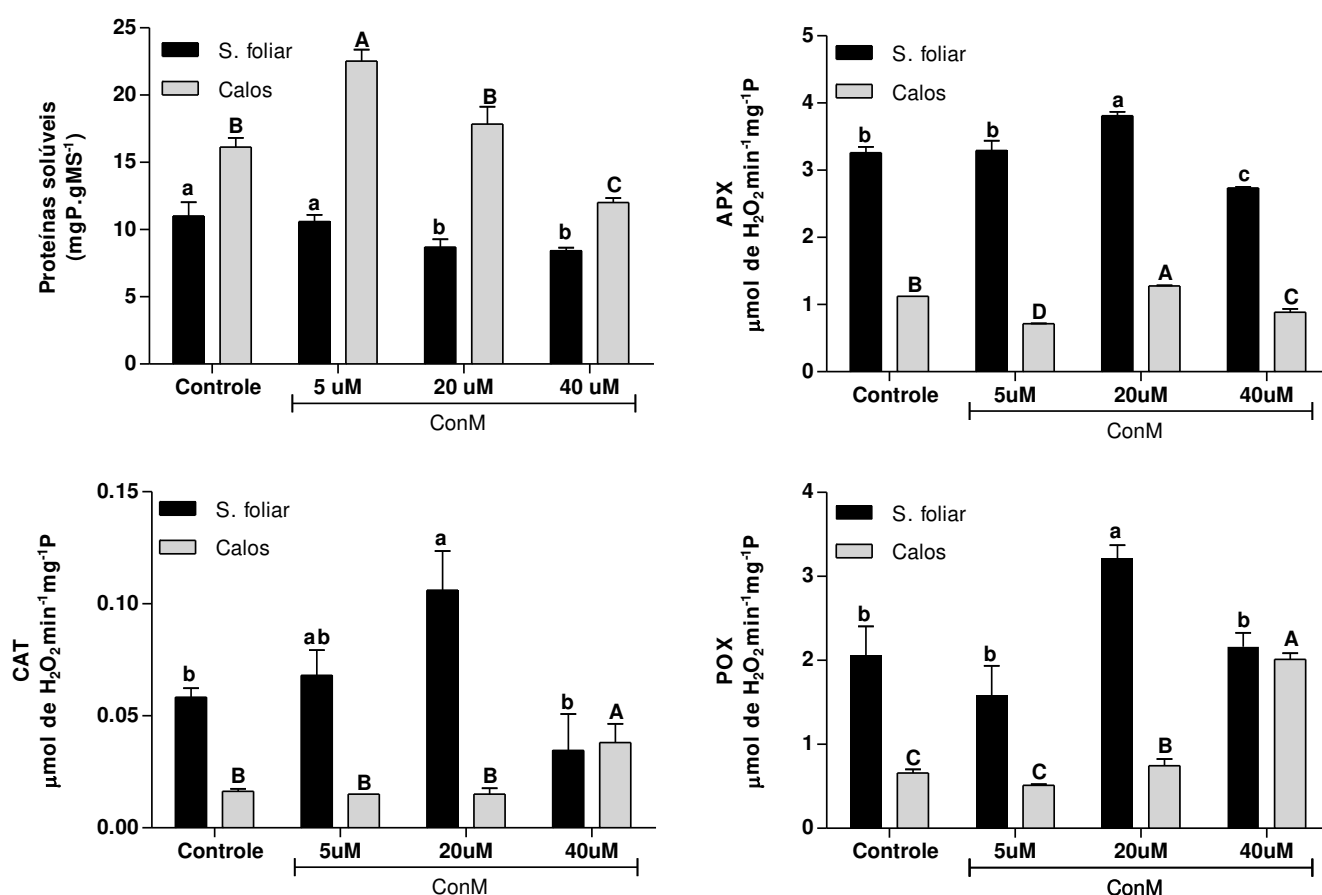
Como apresentado no item 5.1 deste trabalho a presença da auxina induziu a formação de calos nos explantes foliares de *N. tabacum*. Logo, foi verificado a atividade enzimática separadamente tanto para os segmentos foliares, assim como, para os calos formados em cada tratamento.

Observou-se que a quantidade das proteínas solúveis nos calos foi superior àquela nos segmentos foliares em todos os tratamentos (Figura 20). Nos calos tratados com 5  $\mu\text{M}$  da lectina, verificou-se um aumento de 39,59% nas proteínas solúveis, enquanto nos tratados com 40  $\mu\text{M}$  da ConM, houve uma redução de 25,53% em comparação ao controle. Esses resultados



são consistentes com o acúmulo de biomassa seca sob essas condições.

**Figura 20.** Quantificação de proteínas solúveis e atividade enzimática das enzimas ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) e peroxidase (POX) em segmentos foliares e calos de *Nicotiana tabacum*. Quantidade de proteínas solúveis e atividade enzimática das enzimas ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) e peroxidase (POX) em segmentos foliares e calos de *Nicotiana tabacum* infiltrados a vácuo com 20  $\mu\text{M}$  de ácido indol-3-acético juntamente com 5  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  ou 40  $\mu\text{M}$  da ConM, em seguida, cultivados em meio MS sem regulador de crescimento por 28 dias a 26 °C foto período 12h.



**Nota:** Resultados expressos em termos de média  $\pm$  desvio padrão, obtidos a partir de três determinações independentes. A análise estatística foi realizada por meio da ANOVA, seguida do teste de Tukey, considerando um nível de significância de  $p < 0,05$ . Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos. A diferenciação entre tratamentos foi indicada por meio da utilização de letras distintas, sendo que letras minúsculas indicaram diferenças significativas entre tratamentos em segmentos foliares e letras maiúsculas indicaram diferenças entre tratamentos em calos.

**Fonte:** Autor, 2024.

Os calos atuaram como estruturas dreno, evidenciado pelo aumento na quantidade de proteínas solúveis em comparação aos segmentos foliares. Segundo Ikeuchi *et al.* (2019), os calos apresentam essa característica devido à alta taxa mitótica e à intensa proliferação celular. A relação fonte/dreno pode ser manipulada pelo tecido, aumentando ou diminuindo a força da fonte (taxa fotossintética da cultura) ou a força do dreno (demanda por assimilados) (DUARTE; PEIL, 2010).

Adicionalmente, foi observado que a atividade das enzimas antioxidantes nos segmentos foliares foi superior àquela nos calos, indicando uma maior resposta antioxidativa nos segmentos foliares (Figura 20). Segundo Mittler *et al.* (2022), a superprodução de espécies reativas de oxigênio está associada a danos oxidativos e morte celular programada em plantas. Contudo, a produção equilibrada das EROs está amplamente implicada na regulação de vários processos de desenvolvimento e respostas ao estresse (BISWAS *et al.*, 2019; QI *et al.*, 2018).

Os resultados obtidos sugerem que a lectina impacta significativamente a atividade das enzimas do sistema antioxidativo no tecido vegetal. A atividade das enzimas catalase e peroxidase nos calos infiltrados com 40  $\mu\text{M}$  de ConM aumentou 137,50% e 205,16%, respectivamente, em relação ao controle, indicando uma alta atividade do sistema antioxidativo no tecido. Nos segmentos foliares tratados com 20  $\mu\text{M}$  da ConM, observou-se um aumento significativo na atividade das enzimas APX, CAT e POX, de 16,77%, 82,76% e 56,34%, respectivamente, em relação ao controle.

As espécies reativas de oxigênio (EROs) desempenham um papel fundamental no crescimento, desenvolvimento, respostas ao estresse e muitos outros processos nas células vegetais. Níveis basais das EROs são essenciais para esses processos celulares, enquanto um aumento nos níveis das EROs ativa respostas ao estresse, incluindo a biossíntese de metabólitos especializados. No entanto, um excesso das EROs resulta em estresse oxidativo, que tem um efeito citotóxico (MITTLER, 2017).

Segundo Mittler *et al.*, (2022), a homeostase das espécies reativas de oxigênio é crucial para a modulação das respostas das plantas ao estresse, com as funções das ERO e dos eliminadores de ERO desempenhando papéis fundamentais. Durante o estresse oxidativo, a auxina estimula a atividade antioxidante por meio da regulação transcricional de genes específicos (SINGH *et al.*, 2021). Estudos indicam uma relação complexa entre as vias de sinalização de ROS e auxina, essenciais para o ajuste fino das respostas de desenvolvimento e ambientais das plantas (LAMERS; VAN DER MEER; TESTERINK, 2020; MITTLER *et al.*, 2022; QI *et al.*, 2018; SHEN *et al.*, 2020; WANG, Ting *et al.*, 2021).

A literatura relata o papel das lectinas na sensibilidade de espécies vegetais aos

estresses abióticos e bióticos, evidenciando o aumento dos níveis de transcrição de lectinas em cultivares de importância agronômica sob esses estresses. Além disso, as lectinas estão envolvidas nas respostas a estímulos ambientais, atuando na sinalização e nas respostas ao estresse da planta (DE SCHUTTER *et al.*, 2017; DE SCHUTTER; VAN DAMME, 2015). Diversos estudos demonstraram a contribuição de lectinas induzidas por estresse para a imunidade das plantas (AL ATALAH *et al.*, 2014; DE SCHUTTER *et al.*, 2017; HE *et al.*, 2017; JIANG; MA; RAMACHANDRAN, 2010; LAMBIN *et al.*, 2020; PEUMANS *et al.*, 2000)

### **5.5 Efeito da ConM na expressão de genes regulados pela auxina em segmentos foliares de *Nicotiana tabacum***

As diferentes concentrações de ConM alteraram significativamente os padrões de expressão dos genes ao longo do tempo. Os níveis de expressão dos genes ARF1 e IAA14 apresentaram uma tendência consistente com a literatura, que descreve a interação entre fatores de resposta à auxina e proteínas Aux/IAA. Nessa interação, a elevada expressão dos genes Aux/IAA inibe a ativação dos genes-alvo ARFs.

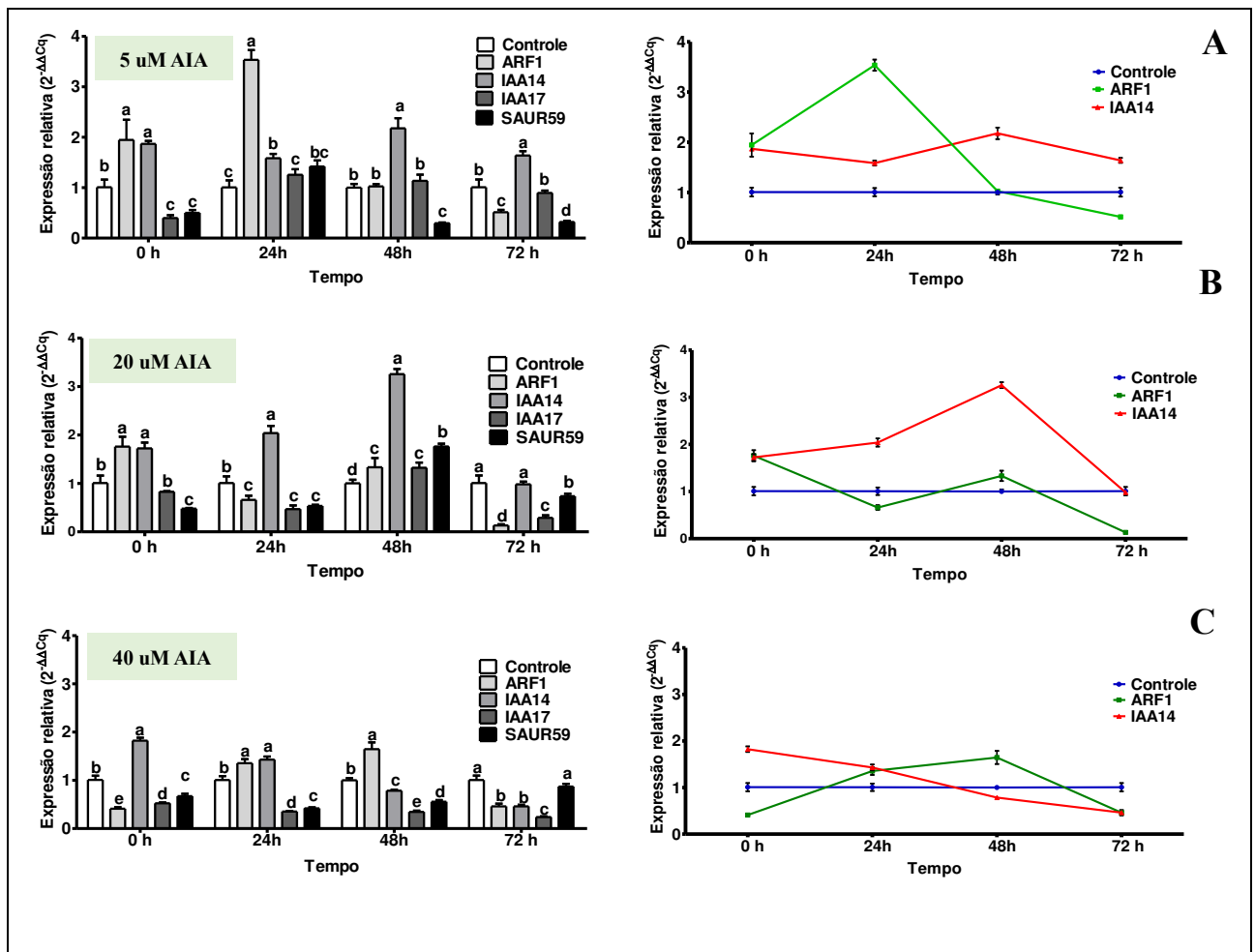
No Tempo 0h, as concentrações de 5  $\mu$ M e 20  $\mu$ M da ConM induziram o aumento da expressão dos genes ARF1 e IAA14, enquanto a concentração de 40  $\mu$ M reprimiu a expressão do gene ARF1. Após 24 horas, os segmentos foliares tratados com 5  $\mu$ M da ConM apresentaram uma superexpressão do gene ARF1, seguida de um declínio ao longo de 72 horas. Em contraste, a expressão do gene IAA14 mostrou um padrão inverso (Figura 21A). Nos segmentos foliares tratados com 20  $\mu$ M da ConM, houve indução da expressão do gene IAA14 após 48 horas, enquanto a expressão do gene ARF1 permaneceu baixa ao longo de 72 horas (Figura 21B). Diferentemente, nos segmentos tratados com 40  $\mu$ M de ConM, observou-se uma repressão da expressão do gene IAA14 após 24 horas (Figura 21C).

Segundo TAN *et al.* (2007) e Li *et al.* (2016) as proteínas Aux/IAA interagem com os fatores de resposta à auxina (ARFs) em condições de baixos níveis de auxina, inibindo a ativação dos genes-alvo das ARFs. Com o aumento da concentração de auxina, as proteínas Aux/IAA são ubiquitinadas e degradadas pelo proteassoma 26S, liberando assim a atividade das ARFs e promovendo a maior expressão dos genes-alvo nos tecidos.

A auxina regula processos cruciais do desenvolvimento nas plantas. Ela se transporta de célula para célula, formando gradientes de auxina extracelular e intracelular que são detectados por diferentes receptores de auxina. Os efeitos fisiológicos da auxina são mediados pela regulação transcricional dos genes de resposta à auxina (ROOSJEN; PAQUE;

WEIJERS, 2018; TANG; YU; XU, 2024). A sinalização da auxina envolve a interação entre fatores de resposta à auxina (ARFs) e proteínas Aux/IAA.

**Figura 21.** Análise dos níveis de expressão dos genes NtARF1, NtIAA14, NtIAA17 e NtSAUR59 em segmentos foliares de *Nicotiana tabacum*. Os níveis de expressão dos genes NtARF1, IAA14, IAA17, SAUR59 em segmentos foliares de *N. tabacum* infiltrados a vácuo com 20  $\mu$ M de ácido indol-3-acético juntamente com 5  $\mu$ M, 20  $\mu$ M ou 40  $\mu$ M da ConM, em seguida, mantidos em meio MS sem regulador de crescimento por 0h, 24h 48h e 72h a 26 °C foto período 12h.



**Nota:** Resultados expressos em termos de média  $\pm$  desvio padrão, obtidos a partir de três determinações independentes. A análise estatística foi realizada por meio da ANOVA. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos do mesmo grupo. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Tukey, considerando um nível de significância de  $p < 0,05$ .

**Fonte:** Autor, 2024.

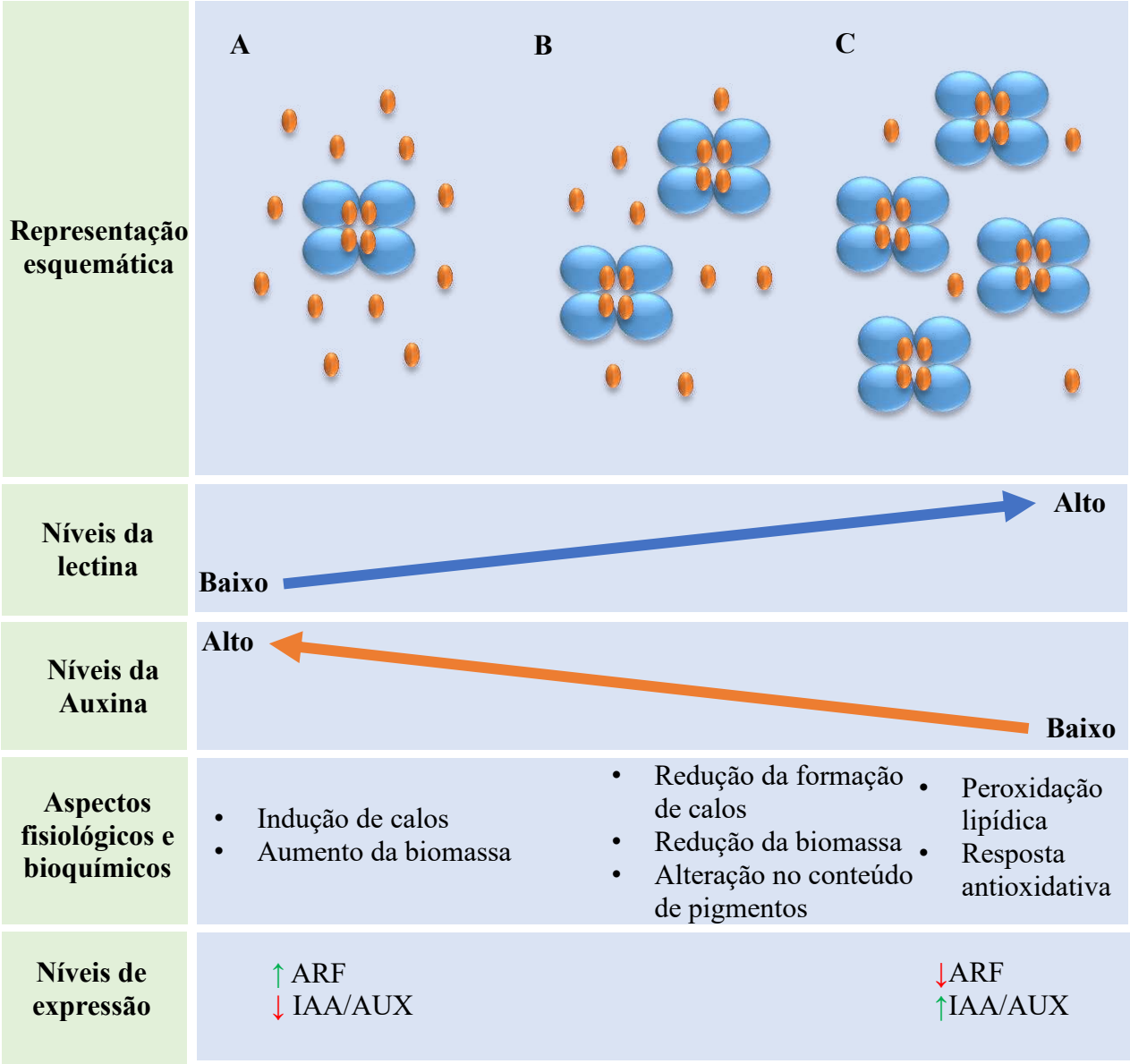
De acordo com (LISCUM; REED, 2002), os membros da família de fatores de resposta à auxina (ARF) têm um papel fundamental na regulação da expressão de genes de resposta à auxina. A regulação dos ARFs é bem compreendida, e um modelo funcional para a ativação desses fatores está estabelecido (SALEHIN; BAGCHI; ESTELLE, 2015). Em baixos níveis de auxina, as proteínas Aux/IAA formam dímeros com ARFs para inibir a atividade destes, recrutando o correpessor TOPLESS (TPL), o que resulta na repressão de genes responsivos à auxina (SZEMENYEI; HANNON; LONG, 2008). Em níveis mais altos de auxina, Aux/IAAs se ligam ao complexo SCF/TIR1/AFB, tornando-se ubiquitinadas e degradadas pelo proteassoma 26S. Isso libera os ARFs, permitindo a transcrição dos genes alvo em resposta à auxina (WANG; ESTELLE, 2014).

Embora o padrão de expressão do gene IAA17 não tenha sido linear ao longo do tempo, houve regulação positiva em alguns pontos do tratamento. O gene SAUR59, por sua vez, apresentou respostas mistas, com expressão reduzida em relação ao controle, indicando que suas respostas às concentrações da lectina podem ser complexas.

Além disso, um pequeno número de genes SAUR são reprimidos pela auxina, incluindo o SAUR59. Em geral, os genes SAUR induzidos por auxina tendem a ser mais altamente expressos em brotos, enquanto que os genes SAURs reprimidos por auxina são expressos preferencialmente em raízes (PAPONOV *et al.*, 2008; REN; GRAY, 2015; WANG *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos mostram que a lectina de *C. maritima* regula a biodisponibilidade do hormônio vegetal ácido indole-3-acético (AIA) modulando a concentração da auxina para o tecido vegetal (Figura 22). No campo das pesquisas estruturais das lectinas, estudos como os realizados por Delatorre *et al.* (2013) sugerem que, nos estágios iniciais do desenvolvimento das plântulas, essas proteínas desempenham um papel fisiológico significativo. Nossos achados indicam que as lectinas apresentam não apenas uma interação estrutural, mas apresentam uma interação fisiológica no desenvolvimento das plantas, modulando a atividade da auxina.

**Figura 22.** Esquema ilustrativo da modulação da concentração da auxina no tecido vegetal pela lectina. (A) Baixa concentração da lectina, resultando em mais moléculas de auxina livres no tecido vegetal. (B) Concentração equimolar de lectina, deixando algumas moléculas de auxina livres no tecido vegetal. (C) Alta concentração da lectina, resultando em poucas moléculas de auxina livres no tecido vegetal.



**Nota:** Esferas laranja representam as moléculas de ácido indol-3-acético, estruturas azuis representam o arranjo quaternário da ConM.

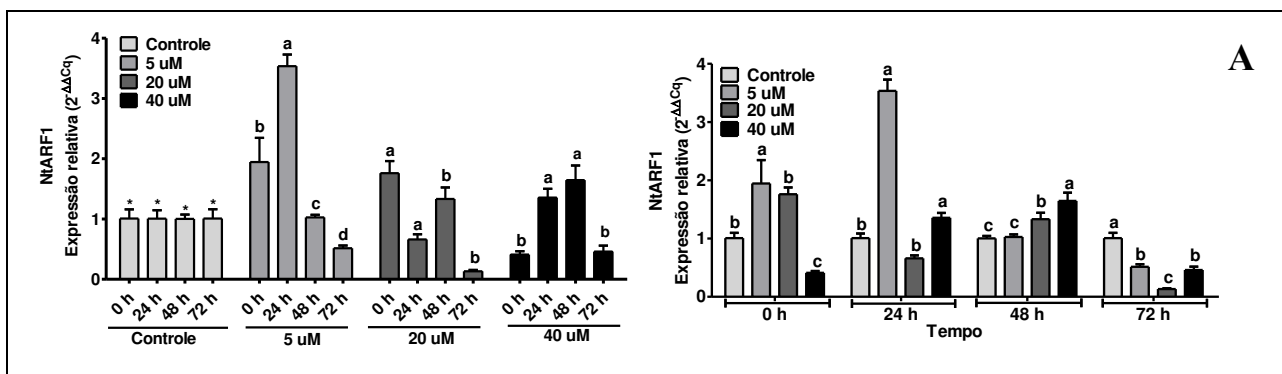
**Autor:** Autor, 2024.

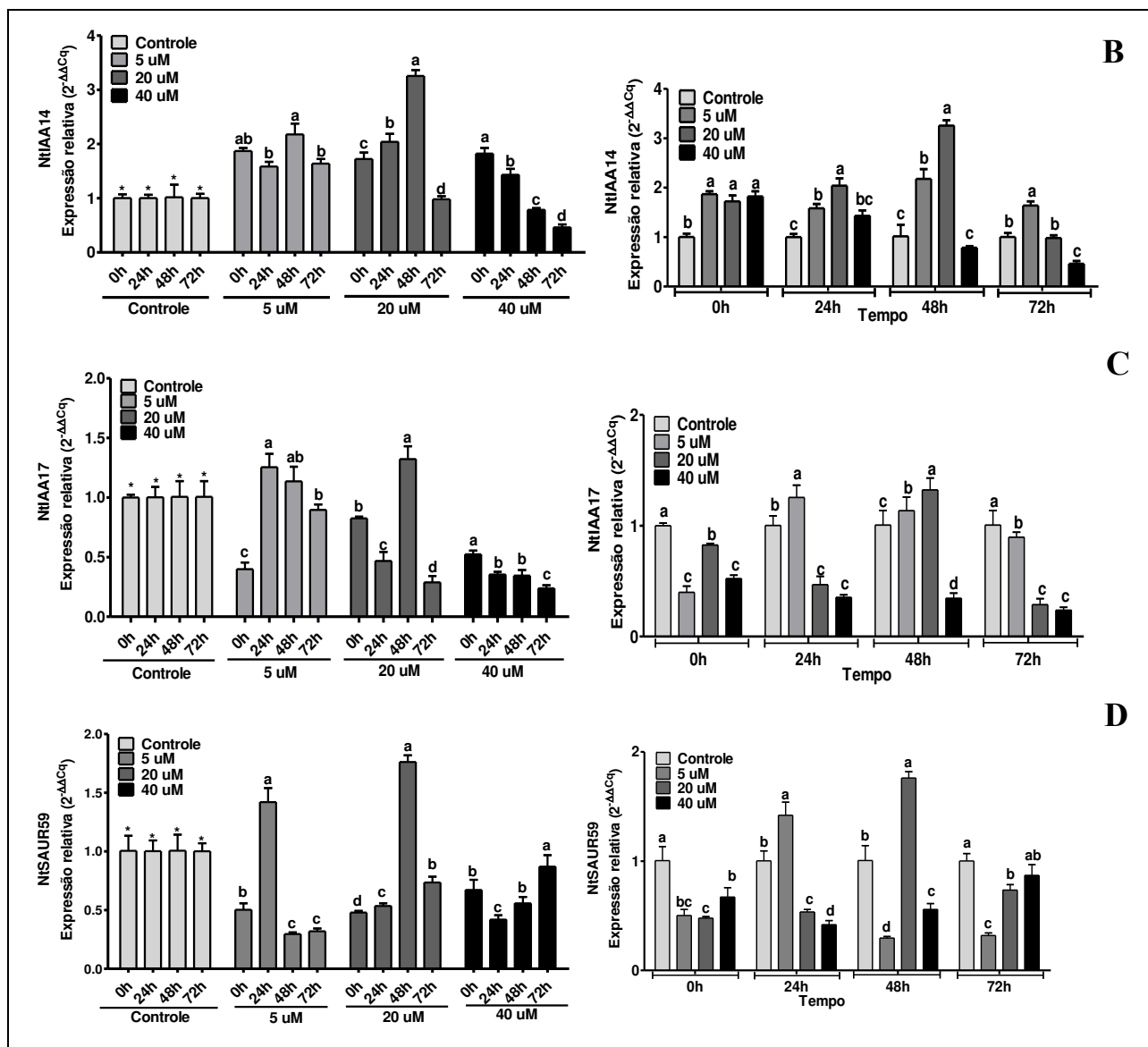
### 5.6 Variações temporais nos perfis de expressão dos genes em segmentos foliares de *N. tabacum* em resposta a tratamentos com lectina

A expressão dos genes ARF1, IAA14, IAA17, SAUR59 variou ao longo do tempo em resposta à concentração da ConM. A expressão do gene ARF1 na concentração de 5  $\mu\text{M}$  da ConM inicialmente aumentou (Figura 23A), mas, com o passar do tempo, o nível de expressão diminuiu significativamente. Em contraste, ao elevar a concentração da ConM para 40  $\mu\text{M}$ , o padrão se inverteu, indicando uma modulação da expressão com o aumento da concentração da ConM para este gene.

A auxina exerce sua funcionalidade versátil em um amplo espectro de concentrações, desencadeando diferentes resultados de desenvolvimento. Em concentrações mais baixas, a auxina promove o alongamento celular, aumentando o crescimento de certos tecidos vegetais e inibindo a atividade dos ARFs. Por outro lado, níveis mais altos de auxina podem inibir o alongamento celular e estimular a divisão celular, sustentando a formação de novos tecidos e órgãos (BHALERAO; BENNETT, 2003) e ativam os ARFs, permitindo que regulem a transcrição de seus genes alvo de resposta à auxina (WANG; ESTELLE, 2014).

**Figura 23.** Análise da variação temporal dos níveis de expressão dos genes NARF1, IAA14, IAA17 e SAUR59 em segmentos foliares de *Nicotiana tabacum*. Variação temporal nos perfis de expressão dos genes NARF1, IAA14, IAA17, SAUR59 em segmentos foliares de *N. tabacum* infiltrados a vácuo com 20  $\mu\text{M}$  de ácido indol-3-acético juntamente com 5  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  ou 40  $\mu\text{M}$  da ConM, em seguida, mantidos em meio MS sem regulador de crescimento por 0h, 24h, 48h e 72h a 26 °C foto período 12h.





**Nota:** Resultados expressos em termos de média  $\pm$  desvio padrão, obtidos a partir de três determinações independentes. A análise estatística foi realizada por meio da ANOVA. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos do mesmo grupo. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Tukey, considerando um nível de significância de  $p < 0,05$ .

A modulação de expressão do gene IAA14 foi observada com concentrações superiores a 5  $\mu\text{M}$  da lectina (Figura 23B). Na concentração de 20  $\mu\text{M}$ , nas primeiras 48 horas, houve uma modulação positiva para o gene IAA14. No entanto, ao aumentar a concentração da ConM, ocorreu uma redução significativa no nível de expressão do IAA14, indicando uma modulação negativa nessas condições. Esse padrão também foi observado para o gene IAA17 (Figura 23C).

A auxina desencadeia respostas celulares rápidas e lentas, dependendo do contexto de desenvolvimento ou ambiental. Respostas rápidas geralmente ocorrem em segundos a



minutos, frequentemente em menos de um minuto, incluindo despolarização da membrana celular, fluxo de íons de hidrogênio, oscilações de íons de cálcio, inchaço do protoplasto, remodelação do citoesqueleto e regulação do tráfego endocítico de transportadores de auxina formados por PIN (PIN) (BARBEZ *et al.*, 2017; BATES; GOLDSMITH, 1983; FIEDLER; FRIML, 2023; MONSHAUSEN *et al.*, 2009; NARASIMHAN *et al.*, 2021; SERRE *et al.*, 2021; ZHOU *et al.*, 2024).

Respostas celulares lentas se desenvolvem gradualmente ao longo de um período de horas a dias, caracterizadas por mudanças sustentadas na expressão gênica e na síntese de proteínas, influenciando o crescimento, a divisão e a diferenciação celular, levando, em última análise, a processos de desenvolvimento associados (DUBROVSKY *et al.*, 2008; HEISLER *et al.*, 2005; REINHARDT *et al.*, 2003). Essas propriedades facilitam um sistema regulatório complexo e dinâmico, no qual a auxina atua como um regulador mestre, orientando de forma rápida e específica o desenvolvimento das plantas e a resposta ambiental.

A expressão do gene SAUR59 mostrou variação ao longo do tempo, sem um padrão linear claro. Durante os tratamentos com 5  $\mu$ M e 20  $\mu$ M da ConM, foi observada uma regulação positiva em determinados momentos, mas, de maneira geral, a expressão foi menor em comparação com o controle (Figura 23D). Esses resultados sugerem que a resposta do gene SAUR59 às diferentes concentrações da ConM é complexa e não segue um comportamento previsível.

A ação da auxina é caracterizada por diversas características críticas: auto-organização, efeitos dependentes da concentração e específicos do tecido, e responsividade temporal (BENNETT; HINES; LEYSER, 2014; BHALERAO; BENNETT, 2003; CUI *et al.*, 2024; HAJNÝ; TAN; FRIML, 2022; LI; GALLEI; FRIML, 2022). Essas características destacam o papel complexo da auxina no desenvolvimento das plantas e sua adaptabilidade às condições ambientais.

## 6 CONCLUSÃO

Este estudo investigou a influência da ConM na fisiologia da *Nicotiana tabacum*, destacando seu impacto na modulação da biodisponibilidade do ácido indol-3-acético (AIA). Os experimentos demonstraram que a interação da ConM com o AIA reduz a biodisponibilidade da auxina e desencadeia uma resposta molecular nos níveis de expressão dos genes responsivos à auxina. Isso resulta em alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas, afetando processos como a formação de calos, o conteúdo de pigmentos fotossintéticos e a atividade antioxidante. Os resultados mostram que a ConM atua como um modulador significativo da expressão gênica em resposta à auxina, proporcionando uma compreensão mais aprofundada das interações entre lectinas e hormônios vegetais.

## REFERÊNCIAS

- ABHILASH, J. *et al.* The crystal structure of a lectin from *Butea monosperma*: Insight into its glycosylation and binding of ligands. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 72, p. 1376–1383, Jan. 2015.
- ABHINAV, K. V.; VIJAYAN, M. Structural diversity and ligand specificity of lectins. The Bangalore effort. **Pure and Applied Chemistry**, vol. 86, no. 9, p. 1335–1355, 19 Sep. 2014.
- ADAMOWSKI, M.; LI, L.; FRIML, J. Reorientation of Cortical Microtubule Arrays in the Hypocotyl of *Arabidopsis thaliana* Is Induced by the Cell Growth Process and Independent of Auxin Signaling. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 20, no. 13, p. 3337, 7 Jul. 2019.
- AL ATALAH, B. *et al.* Transcriptional behavior of EUL-related rice lectins toward important abiotic and biotic stresses. **Journal of Plant Physiology**, vol. 171, no. 12, p. 986–992, Jul. 2014.
- ARSOVSKI, A. A. *et al.* Phytochrome B regulates resource allocation in *Brassica rapa*. **Journal of Experimental Botany**, vol. 69, no. 11, p. 2837–2846, 19 May 2018.
- ARUN, A. B.; SRIDHAR, K. R. Symbiotic performance of fast-growing rhizobia isolated from the coastal sand dune legumes of west coast of India. **Biology and Fertility of Soils**, vol. 40, no. 6, p. 435–439, 15 Dec. 2004.
- BAILLY, A. *et al.* Modulation of P-glycoproteins by Auxin Transport Inhibitors Is Mediated by Interaction with Immunophilins. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 283, no. 31, p. 21817–21826, Aug. 2008.
- BALZARINI, J. Carbohydrate-Binding Agents: A Potential Future Cornerstone for the Chemotherapy of Enveloped Viruses? **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, vol. 18, no. 1, p. 1–11, 24 Feb. 2007.
- BANERJEE, R. *et al.* Conformation, Protein-Carbohydrate Interactions and a Novel Subunit Association in the Refined Structure of Peanut Lectin-Lactose Complex. **Journal of Molecular Biology**, vol. 259, no. 2, p. 281–296, Jun. 1996.
- BAO, D.; CHANG, S.; LI, X.; QI, Y. Advances in the study of auxin early response genes: Aux/IAA, GH3, and SAUR. **The Crop Journal**, Jul. 2024.
- BARBEZ, E. *et al.* Auxin steers root cell expansion via apoplastic pH regulation in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 114, no. 24, 13 Jun. 2017.
- BARBOSA, T. *et al.* In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the Diocleinae subtribe. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 96, no. 5, p. 673–678, Jul. 2001.
- BARONDES, S. H. Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. **Trends in Biochemical Sciences**, vol. 13, no. 12, p. 480–482, Dec. 1988.

BARRE, A. *et al.* Overview of the Structure–Function Relationships of Mannose-Specific Lectins from Plants, Algae and Fungi. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 20, no. 2, p. 254, 10 Jan. 2019.

BATES, G. W.; GOLDSMITH, M. H. M. Rapid response of the plasma-membrane potential in oat coleoptiles to auxin and other weak acids. **Planta**, vol. 159, no. 3, p. 231–237, Nov. 1983.

BEERS, R F; SIZER, I W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **The Journal of biological chemistry**, vol. 195, no. 1, p. 133–40, Mar. 1952.

BELLANDE, K. *et al.* Plant Lectins and Lectin Receptor-Like Kinases: How Do They Sense the Outside? **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 18, no. 6, p. 1164, 31 May 2017.

BELYAEVA, N. E.; BULYCHEV, A. A.; RIZNICHENKO, G. Yu; RUBIN, A. B. Thylakoid membrane model of the Chl a fluorescence transient and P700 induction kinetics in plant leaves. **Photosynthesis Research**, vol. 130, no. 1–3, p. 491–515, 1 Dec. 2016.

BENNETT, T.; HINES, G.; LEYSER, O. Canalization: what the flux? **Trends in Genetics**, vol. 30, no. 2, p. 41–48, Feb. 2014.

BEZERRA, E. H. S. *et al.* Structural analysis of ConBr reveals molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and endothelial NO synthase activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 408, no. 4, p. 566–570, May 2011.

BHALERAO, R. P.; BENNETT, M. J. The case for morphogens in plants. **Nature Cell Biology**, vol. 5, no. 11, p. 939–943, Nov. 2003.

BISWAS, Md. S. *et al.* Reactive oxygen species and reactive carbonyl species constitute a feed-forward loop in auxin signaling for lateral root formation. **The Plant Journal**, vol. 100, no. 3, p. 536–548, 21 Nov. 2019.

BLOISE, N. *et al.* Targeting the “Sweet Side” of Tumor with Glycan-Binding Molecules Conjugated-Nanoparticles: Implications in Cancer Therapy and Diagnosis. **Nanomaterials**, vol. 11, no. 2, p. 289, 22 Jan. 2021.

BOER, D. R. *et al.* Structural Basis for DNA Binding Specificity by the Auxin-Dependent ARF Transcription Factors. **Cell**, vol. 156, no. 3, p. 577–589, Jan. 2014.

BONNARDEL, F.; PEREZ, S.; LISACEK, F.; IMBERTY, A. Structural Database for Lectins and the UniLectin Web Platform. [*S. l.: s. n.*], 2020. p. 1–14.

BREITENBACH B. C. *et al.* Lectins as antimicrobial agents. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 125, no. 5, p. 1238–1252, Nov. 2018.

BRINDA, K.V.; MITRA, N.; SUROLIA, A.; VISHVESHWARA, S. Determinants of quaternary association in legume lectins. **Protein Science**, vol. 13, no. 7, p. 1735–1749, Jul.

2004.

CAO, M. *et al.* TMK1-mediated auxin signalling regulates differential growth of the apical hook. **Nature**, vol. 568, no. 7751, p. 240–243, 3 Apr. 2019.

CARRINGTON, D. M.; AUFFRET, A.; HANKE, D. E. Polypeptide ligation occurs during post-translational modification of concanavalin A. **Nature**, vol. 313, no. 5997, p. 64–67, Jan. 1985.

CASANOVA-SÁEZ, R.; MATEO-BONMATÍ, E.; LJUNG, K. Auxin Metabolism in Plants. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, vol. 13, no. 3, p. a039867, Mar. 2021.

CAVADA, B. *et al.* Revisiting proteus: Do Minor Changes in Lectin Structure Matter in Biological Activity? Lessons from and Potential Biotechnological Uses of the Diocleinae Subtribe Lectins. **Current Protein & Peptide Science**, vol. 2, no. 2, p. 123–135, 1 Jun. 2001.

CAVADA, B. S. *et al.* One century of ConA and 40 years of ConBr research: A structural review. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 134, p. 901–911, Aug. 2019.

CHANDLER, J. W. Auxin response factors. **Plant, Cell & Environment**, vol. 39, no. 5, p. 1014–1028, 23 May 2016.

CHANG, C *et al.* The TMK1 gene from Arabidopsis codes for a protein with structural and biochemical characteristics of a receptor protein kinase. **The Plant Cell**, vol. 4, no. 10, p. 1263–1271, Oct. 1992.

CHAPMAN, E. J.; ESTELLE, M. Mechanism of Auxin-Regulated Gene Expression in Plants. **Annual Review of Genetics**, vol. 43, no. 1, p. 265–285, 1 Dec. 2009.

CHEN, H.; ZOU, W.; ZHAO, J. Ribonuclease J is required for chloroplast and embryo development in Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany**, vol. 66, no. 7, p. 2079–2091, Apr. 2015.

CHEN, Y.; HAO, X.; CAO, J. Small auxin upregulated RNA ( *SAUR* ) gene family in maize: Identification, evolution, and its phylogenetic comparison with *Arabidopsis* , rice, and sorghum. **Journal of Integrative Plant Biology**, vol. 56, no. 2, p. 133–150, Feb. 2014.

CHOI, Y. *et al.* Exosome-mediated diagnosis of pancreatic cancer using lectin-conjugated nanoparticles bound to selective glycans. **Biosensors and Bioelectronics**, vol. 177, p. 112980, Apr. 2021.

CHRISPEELS, M J; RAIKHEL, N V. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. **The Plant Cell**, vol. 3, no. 1, p. 1–9, Jan. 1991.

COELHO, L. *et al.* Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2017, p. 1–22, 2017.

CROCE, R.; VAN AMERONGEN, H. Light harvesting in oxygenic photosynthesis: Structural

biology meets spectroscopy. **Science**, vol. 369, no. 6506, 21 Aug. 2020.

CRUZ, A. *et al.* Light, Ethylene and Auxin Signaling Interaction Regulates Carotenoid Biosynthesis During Tomato Fruit Ripening. **Frontiers in Plant Science**, vol. 9, 18 Sep. 2018.

CUI, X. *et al.* Protein post-translational modifications in auxin signaling. **Journal of Genetics and Genomics**, vol. 51, no. 3, p. 279–291, Mar. 2024.

D'CUNHA, M.; SRIDHAR, K. Micropropagation of the wild legume *Canavalia rosea* (Sw.) DC. from coastal sand dunes. **BIOLET**, vol. 48, no. 1, p. 85–96, 1 Jan. 2011.

DAMME, E. *et al.* Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, vol. 17, no. 6, p. 575–692, Nov. 1998.

DANG, K. *et al.* Application of Lectin Microarrays for Biomarker Discovery. **ChemistryOpen**, vol. 9, no. 3, p. 285–300, 2 Mar. 2020.

DE CONINCK, T.; VAN DAMME, E. J.M. Plant lectins: Handymen at the cell surface. **The Cell Surface**, vol. 8, p. 100091, Dec. 2022.

DE SCHUTTER, K. *et al.* Evolutionary relationships and expression analysis of EUL domain proteins in rice (*Oryza sativa*). **Rice**, vol. 10, no. 1, p. 26, 30 Dec. 2017.

DE SCHUTTER, K.; VAN DAMME, E. Protein-Carbohydrate Interactions as Part of Plant Defense and Animal Immunity. **Molecules**, vol. 20, no. 5, p. 9029–9053, 19 May 2015.

DEDOLA, S. *et al.* Revisiting the Language of Glycoscience: Readers, Writers and Erasers in Carbohydrate Biochemistry. **ChemBioChem**, vol. 21, no. 3, p. 423–427, 3 Feb. 2020.

DELATORRE, P. *et al.* Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: new structural insights for old molecules. **BMC Structural Biology**, vol. 7, no. 1, p. 52, 2 Dec. 2007.

DELATORRE, P. *et al.* Interactions between indole-3-acetic acid (IAA) with a lectin from *Canavalia maritima* seeds reveal a new function for lectins in plant physiology. **Biochimie**, vol. 95, no. 9, p. 1697–1703, Sep. 2013.

DI, D.; ZHANG, C.; GUO, G.. Involvement of secondary messengers and small organic molecules in auxin perception and signaling. **Plant Cell Reports**, vol. 34, no. 6, p. 895–904, 19 Jun. 2015.

DUARTE, Tatiana da S; PEIL, Roberta MN. Relações fonte: dreno e crescimento vegetativo do meloeiro. **Horticultura Brasileira**, vol. 28, no. 3, p. 271–276, Sep. 2010.

DUBROVSKY, J. G. *et al.* Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 105, no. 25, p. 8790–8794, 24 Jun. 2008.

EDELMAN, G.M.; WANG, J.L. Binding and functional properties of concanavalin A and its

derivatives. III. Interactions with indoleacetic acid and other hydrophobic ligands. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 253, no. 9, p. 3016–3022, May 1978.

ELLIS, C. M. *et al.* Auxin response factor1 and auxin response factor2 regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. **Development**, vol. 132, no. 20, p. 4563–4574, 15 Oct. 2005.

FAYE, L.; CHRISPEELS, M. J. Transport and processing of the glycosylated precursor of Concanavalin A in jack-bean. **Planta**, vol. 170, no. 2, p. 217–224, Feb. 1987.

FENDRYCH, M. *et al.* Rapid and reversible root growth inhibition by TIR1 auxin signalling. **Nature Plants**, vol. 4, no. 7, p. 453–459, 25 Jun. 2018.

FIEDLER, L.; FRIML, J.. Rapid auxin signaling: Unknowns old and new. **Current Opinion in Plant Biology**, vol. 75, p. 102443, Oct. 2023.

FINET, C. *et al.* Evolution of the ARF Gene Family in Land Plants: Old Domains, New Tricks. **Molecular Biology and Evolution**, vol. 30, no. 1, p. 45–56, Jan. 2013.

FRIML, J. Fourteen Stations of Auxin. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, vol. 14, no. 5, p. a039859, May 2022.

GAO, F.; GUO, J.; SHEN, Y. Advances from chlorophyll biosynthesis to photosynthetic adaptation, evolution and signaling. **Plant Stress**, vol. 12, p. 100470, Jun. 2024.

GAUTAM, A. K.; SRIVASTAVA, N.; NAGAR, D. P.; BHAGYAWANT, S. S. Biochemical and functional properties of a lectin purified from the seeds of *Cicer arietinum* L. **3 Biotech**, vol. 8, no. 6, p. 272, 26 Jun. 2018.

GHANBARI, S. *et al.* New protocol for the indirect regeneration of the *Lilium ledebourii* Bioss by using bulb explants. **Journal of Plant Biotechnology**, vol. 45, no. 2, p. 146–153, 30 Jun. 2018.

GOLDSTEIN, I.J.; HUGHES, R.C.; MONSIGNY, M.; OSAWA, T.; SHARON, N. What should be called a lectin? . **Nature**, vol. 285, no. 66, 1980.

GRUBER, E.; KJÆR, C.; NIELSEN, S.; ANDERSEN, L. H. Intrinsic Photophysics of Light-harvesting Charge-tagged Chlorophyll *a* and *b* Pigments. **Chemistry – A European Journal**, vol. 25, no. 39, p. 9153–9158, 11 Jul. 2019.

GUILFOYLE, T. J.; HAGEN, G. Auxin response factors. **Current Opinion in Plant Biology**, vol. 10, no. 5, p. 453–460, Oct. 2007.

HAAB, B. B.; KLAMER, Z. Advances in Tools to Determine the Glycan-Binding Specificities of Lectins and Antibodies. **Molecular & Cellular Proteomics**, vol. 19, no. 2, p. 224–232, Feb. 2020.

HAJNÝ, J.; TAN, S.; FRIML, J.. Auxin canalization: From speculative models toward molecular players. **Current Opinion in Plant Biology**, vol. 65, p. 102174, Feb. 2022.

HARDMAN, K. D.; AINSWORTH, C. F. Binding of nonpolar molecules by crystalline concanavalin A. **Biochemistry**, vol. 12, no. 22, p. 4442–4448, 1 Oct. 1973.

HARDMAN, K. D.; AINSWORTH, C. F. Structure of concanavalin A at 2.4-Å resolution. **Biochemistry**, vol. 11, no. 26, p. 4910–4919, 19 Dec. 1972.

HASHIM, O. H.; JAYAPALAN, J. J.; LEE, C. Lectins: an effective tool for screening of potential cancer biomarkers. **PeerJ**, vol. 5, p. e3784, 7 Sep. 2017.

HE, X. *et al.* A rice jacalin-related mannose-binding lectin gene enhances *Escherichia coli* viability under high salinity stress and improves salinity tolerance of rice. **Plant Biology**, vol. 19, no. 2, p. 257–267, Mar. 2017.

HEISLER, M. G. *et al.* Patterns of Auxin Transport and Gene Expression during Primordium Development Revealed by Live Imaging of the Arabidopsis Inflorescence Meristem. **Current Biology**, vol. 15, no. 21, p. 1899–1911, Nov. 2005.

HIVRALE, A.U.; INGALE, A.G. Plant as a plenteous reserve of lectin. **Plant Signaling & Behavior**, vol. 8, no. 12, p. e26595, 28 Dec. 2013.

HU, B. *et al.* Divergent regeneration-competent cells adopt a common mechanism for callus initiation in angiosperms. **Regeneration**, vol. 4, no. 3, p. 132–139, 27 Jun. 2017.

IKEUCHI, M. *et al.* Molecular Mechanisms of Plant Regeneration. **Annual Review of Plant Biology**, vol. 70, no. 1, p. 377–406, 29 Apr. 2019.

IKEUCHI, M.; SUGIMOTO, K.; IWASE, A. Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. **The Plant Cell**, vol. 25, no. 9, p. 3159–3173, Sep. 2013.

JIANG, J.; DEHESH, K. Plastidial retrograde modulation of light and hormonal signaling: an odyssey. **New Phytologist**, vol. 230, no. 3, p. 931–937, 4 May 2021.

JIANG, Q.-L. *et al.* Plant lectins, from ancient sugar-binding proteins to emerging anti-cancer drugs in apoptosis and autophagy. **Cell Proliferation**, vol. 48, no. 1, p. 17–28, 9 Feb. 2015.

JIANG, S.-Y.; MA, Z.; RAMACHANDRAN, S. Evolutionary history and stress regulation of the lectin superfamily in higher plants. **BMC Evolutionary Biology**, vol. 10, no. 1, p. 79, 18 Dec. 2010.

JING, H. *et al.* Nitric oxide-mediated S-nitrosylation of IAA17 protein in intrinsically disordered region represses auxin signaling. **Journal of Genetics and Genomics**, vol. 50, no. 7, p. 473–485, Jul. 2023.

KNEUPER, I. *et al.* Auxin biosynthesis and cellular efflux act together to regulate leaf vein patterning. **Journal of Experimental Botany**, vol. 72, no. 4, p. 1151–1165, 24 Feb. 2021.

KONOZY, E. E.; OSMAN, M. El-f. M. Plant lectin: A promising future anti-tumor drug. **Biochimie**, vol. 202, p. 136–145, Nov. 2022.

KONOZY, E. *et al.* Plant lectins: A new antimicrobial frontier. **Biomedicine &**



**Pharmacotherapy**, vol. 155, p. 113735, Nov. 2022

KORASICK, D. A.; ENDERS, T. A.; STRADER, L. C. Auxin biosynthesis and storage forms. **Journal of Experimental Botany**, vol. 64, no. 9, p. 2541–2555, Jun. 2013.

KURODA, Y. *et al.* Lectin-based phototherapy targeting cell surface glycans for pancreatic cancer. **International Journal of Cancer**, vol. 152, no. 7, p. 1425–1437, 7 Apr. 2023.

LAGARDA-DIAZ, I.; GUZMAN-PARTIDA, A.; VAZQUEZ-MORENO, L. Legume Lectins: Proteins with Diverse Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 18, no. 6, p. 1242, 12 Jun. 2017.

LAMBIN, J. *et al.* OsEUL Lectin Gene Expression in Rice: Stress Regulation, Subcellular Localization and Tissue Specificity. **Frontiers in Plant Science**, vol. 11, 2 Mar. 2020.

LAMERS, J.; VAN DER MEER, T.; TESTERINK, C. How Plants Sense and Respond to Stressful Environments. **Plant Physiology**, vol. 182, no. 4, p. 1624–1635, Apr. 2020.

LANNOO, N.; VAN DAMME, E. J.M. Nucleocytoplasmic plant lectins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, vol. 1800, no. 2, p. 190–201, Feb. 2010.

LANNOO, N.; VAN DAMME, E. J. M. Lectin domains at the frontiers of plant defense. **Frontiers in Plant Science**, vol. 5, 13 Aug. 2014.

LEYSER, O. Auxin Distribution and Plant Pattern Formation: How Many Angels Can Dance on the Point of PIN? **Cell**, vol. 121, no. 6, p. 819–822, Jun. 2005.

LEYSER, O. Auxin Signaling. **Plant Physiology**, vol. 176, no. 1, p. 465–479, Jan. 2018.

LI, C.-Y.; XU, H.-L.g; LIU, B.; BAO, J.-K.. Concanavalin A, from an Old Protein to Novel Candidate Anti-Neoplastic Drug. **Current Molecular Pharmacology**, vol. 3, no. 3, p. 123–128, 1 Nov. 2010.

LI, L.; GALLEI, M.; FRIML, J. Bending to auxin: fast acid growth for tropisms. **Trends in Plant Science**, vol. 27, no. 5, p. 440–449, May 2022.

LI, Si-Bei *et al.* A Review of Auxin Response Factors (ARFs) in Plants. **Frontiers in Plant Science**, vol. 7, 3 Feb. 2016.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV /VIS Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, vol. 1, no. 1, Aug. 2001.

LICHTENTHALER, H. K.; BABANI, F.; LANGSDORF, G. Chlorophyll fluorescence imaging of photosynthetic activity in sun and shade leaves of trees. **Photosynthesis Research**, vol. 93, no. 1–3, p. 235, 8 Jul. 2007.

LISCUM, E.; REED, J.W. Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. **Plant Molecular Biology**, vol. 49, no. 3/4, p. 387–400, 2002.

- LIU, J. *et al.* WOX11 and 12 Are Involved in the First-Step Cell Fate Transition during de Novo Root Organogenesis in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, vol. 26, no. 3, p. 1081–1093, Mar. 2014.
- LIU, L. *et al.* From Chloroplast Biogenesis to Chlorophyll Accumulation: The Interplay of Light and Hormones on Gene Expression in *Camellia sinensis* cv. Shuchazao Leaves. **Frontiers in Plant Science**, vol. 11, 11 Mar. 2020.
- LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, vol. 1572, no. 2–3, p. 198–208, 19 Sep. 2002.
- LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, vol. 1383, no. 1, p. 9–36, Mar. 1998.
- LU, Y. *et al.* Effect of Silicon on Growth, Physiology, and Cadmium Translocation of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) in Cadmium-Contaminated Soil. **Pedosphere**, vol. 28, no. 4, p. 680–689, Aug. 2018.
- LUO, W.-G. *et al.* Auxin inhibits chlorophyll accumulation through ARF7-IAA14-mediated repression of chlorophyll biosynthesis genes in *Arabidopsis*. **Frontiers in Plant Science**, vol. 14, 20 Apr. 2023.
- MACEDO, M.; OLIVEIRA, C.; OLIVEIRA, C. Insecticidal Activity of Plant Lectins and Potential Application in Crop Protection. **Molecules**, vol. 20, no. 2, p. 2014–2033, 27 Jan. 2015.
- MAŁECKI, P. H. *et al.* Binding of the plant hormone kinetin in the active site of Mistletoe Lectin I from *Viscum album*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, vol. 1824, no. 2, p. 334–338, Feb. 2012.
- MELONI, D. A. *et al.* Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, vol. 49, no. 1, p. 69–76, Feb. 2003.
- MENDOZA-GONZÁLEZ, G.; MARTÍNEZ, M. L.; LITHGOW, D. Biological Flora of Coastal Dunes and Wetlands: *Canavalia rosea* (Sw.) DC. **Journal of Coastal Research**, vol. 296, p. 697–713, Jul. 2014.
- MEYER, A. *et al.* Structure of mistletoe lectin I from *Viscum album* in complex with the phytohormone zeatin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, vol. 1784, no. 11, p. 1590–1595, Nov. 2008.
- MIGUEL, E.C. *et al.* Seed structure in *Canavalia brasiliensis* Mart. ex Benth. (Leguminosae) and subcellular localization of ConBr lectin: Implications for ConBr biological functions. **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, vol. 215, p. 46–53, Aug. 2015.
- MIRKOVIC, T. *et al.* Light Absorption and Energy Transfer in the Antenna Complexes of Photosynthetic Organisms. **Chemical Reviews**, vol. 117, no. 2, p. 249–293, 25 Jan. 2017.

- MITCHELL, C. A.; RAMESSAR, K.; O'KEEFE, B. R. Antiviral lectins: Selective inhibitors of viral entry. **Antiviral Research**, vol. 142, p. 37–54, Jun. 2017.
- MITTLER, R.. ROS Are Good. **Trends in Plant Science**, vol. 22, no. 1, p. 11–19, Jan. 2017.
- MITTLER, R. *et al.* Reactive oxygen species signalling in plant stress responses. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, vol. 23, no. 10, p. 663–679, 27 Oct. 2022.
- MOCKAITIS, K.; ESTELLE, M. Auxin Receptors and Plant Development: A New Signaling Paradigm. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, vol. 24, no. 1, p. 55–80, 1 Nov. 2008.
- MONSHAUSEN, G. B. *et al.* Ca<sup>2+</sup> Regulates Reactive Oxygen Species Production and pH during Mechanosensing in *Arabidopsis* Roots . **The Plant Cell**, vol. 21, no. 8, p. 2341–2356, 2 Oct. 2009.
- MOREIRA, R. A.; PERRONE, J. C. Purification and Partial Characterization of a Lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, vol. 59, no. 5, p. 783–787, 1 May 1977.
- MORENO, F. B. M. B. *et al.* Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of an anti-H(O) lectin from *Lotus tetragonolobus* seeds. **Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications**, vol. 62, no. 7, p. 680–683, 1 Jul. 2006.
- MURDOCK, L. L.; SHADE, R. E. Lectins and Protease Inhibitors as Plant Defenses against Insects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 50, no. 22, p. 6605–6611, 1 Oct. 2002.
- NAITHANI, S. *et al.* Plant lectins and their many roles: Carbohydrate-binding and beyond. **Journal of Plant Physiology**, vol. 266, p. 153531, Nov. 2021.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Aug. 1981.
- NARASIMHAN, M. *et al.* Systematic analysis of specific and nonspecific auxin effects on endocytosis and trafficking. **Plant Physiology**, vol. 186, no. 2, p. 1122–1142, 11 Jun. 2021.
- NG, S. *et al.* Cyclin-dependent Kinase E1 (CDKE1) Provides a Cellular Switch in Plants between Growth and Stress Responses. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 288, no. 5, p. 3449–3459, Feb. 2013.
- NONIS, S. G. *et al.* Structural and biochemical analyses of concanavalin A circular permutation by jack bean asparaginyl endopeptidase. **The Plant Cell**, vol. 33, no. 8, p. 2794–2811, 31 Aug. 2021.
- NORMANLY, J. Approaching Cellular and Molecular Resolution of Auxin Biosynthesis and Metabolism. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, vol. 2, no. 1, p. a001594–a001594, 1 Jan. 2010.

PAPONOV, I. A. *et al.* Comprehensive Transcriptome Analysis of Auxin Responses in Arabidopsis. **Molecular Plant**, vol. 1, no. 2, p. 321–337, Mar. 2008.

PARIDA, A. K.r; DAS, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 60, no. 3, p. 324–349, Mar. 2005.

PAŘÍZKOVÁ, B.; PERNISOVÁ, M.; NOVÁK, O. What Has Been Seen Cannot Be Unseen—Detecting Auxin In Vivo. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 18, no. 12, p. 2736, 16 Dec. 2017.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as Plant Defense Proteins. **Plant Physiology**, vol. 109, no. 2, p. 347–352, 1 Oct. 1995.

PEUMANS, W. J. *et al.* Isolation and characterization of a jacalin-related mannose-binding lectin from salt-stressed rice ( *Oryza sativa* ) plants. **Planta**, vol. 210, no. 6, p. 970–978, 16 May 2000.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, vol. 29, no. 9, p. 45e – 45, 1 May 2001.

POIROUX, G. *et al.* Plant Lectins Targeting O-Glycans at the Cell Surface as Tools for Cancer Diagnosis, Prognosis and Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 18, no. 6, p. 1232, 9 Jun. 2017.

PONTE, L. F. A. *et al.* Salt-induced delay in cotyledonary globulin mobilization is abolished by induction of proteases and leaf growth sink strength at late seedling establishment in cashew. **Journal of Plant Physiology**, vol. 171, no. 15, p. 1362–1371, Sep. 2014.

POWELL, K. S. *et al.* Immunohistochemical and developmental studies to elucidate the mechanism of action of the snowdrop lectin on the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stal). **Journal of Insect Physiology**, vol. 44, no. 7–8, p. 529–539, Jul. 1998.

PUROHIT, S. *et al.* Multiplex glycan bead array for high throughput and high content analyses of glycan binding proteins. **Nature Communications**, vol. 9, no. 1, p. 258, 17 Jan. 2018.

QI, J. *et al.* Reactive oxygen species signaling and stomatal movement in plant responses to drought stress and pathogen attack. **Journal of Integrative Plant Biology**, vol. 60, no. 9, p. 805–826, 3 Sep. 2018.

RADEMACHER, E. H. *et al.* Different Auxin Response Machineries Control Distinct Cell Fates in the Early Plant Embryo. **Developmental Cell**, vol. 22, no. 1, p. 211–222, Jan. 2012.

RADEMACHER, E. H. *et al.* A cellular expression map of the Arabidopsis *AUXIN RESPONSE FACTOR* gene family. **The Plant Journal**, vol. 68, no. 4, p. 597–606, 30 Nov. 2011.

RAKUSOVÁ, H. *et al.* Termination of Shoot Gravitropic Responses by Auxin Feedback on PIN3 Polarity. **Current Biology**, vol. 26, no. 22, p. 3026–3032, Nov. 2016.

- RAKUSOVÁ, H. *et al.* Polarization of PIN3-dependent auxin transport for hypocotyl gravitropic response in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, vol. 67, no. 5, p. 817–826, 29 Sep. 2011.
- RAMIS, C. *et al.* Deglycosylation is necessary but not sufficient for activation of proconcanavalin A. **Journal of Experimental Botany**, vol. 52, no. 358, p. 911–917, 1 May 2001.
- REINHARDT, D. *et al.* Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. **Nature**, vol. 426, no. 6964, p. 255–260, Nov. 2003.
- REN, H.; GRAY, W. M. SAUR Proteins as Effectors of Hormonal and Environmental Signals in Plant Growth. **Molecular Plant**, vol. 8, no. 8, p. 1153–1164, Aug. 2015.
- ROBERTS, D. D.; GOLDSTEIN, I. J. Binding of hydrophobic ligands to plant lectins: Titration with arylaminonaphthalenesulfonates. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 224, no. 2, p. 479–484, Jul. 1983.
- ROOSJEN, M.; PAQUE, S.; WEIJERS, D. Auxin Response Factors: output control in auxin biology. **Journal of Experimental Botany**, vol. 69, no. 2, p. 179–188, 4 Jan. 2018.
- RÜDIGER, H.; GABIUS, Hans-J. Plant lectins : occurrence , biochemistry, functions and applications. **Glycoconjugate Journal**, vol. 18, no. 8, p. 589–613, 2001.
- SAGAR, M. *et al.* SIARF4, an Auxin Response Factor Involved in the Control of Sugar Metabolism during Tomato Fruit Development. **Plant Physiology**, vol. 161, no. 3, p. 1362–1374, 28 Feb. 2013.
- SALAZAR-IRIBE, A.; DE-LA-PEÑA, C. Auxins, the hidden player in chloroplast development. **Plant Cell Reports**, vol. 39, no. 12, p. 1595–1608, 22 Dec. 2020.
- SALEHIN, M.; BAGCHI, R.; ESTELLE, M. TIR1/AFB-Based Auxin Perception: Mechanism and Role in Plant Growth and Development. **The Plant Cell**, vol. 27, no. 1, p. 9–19, Jan. 2015.
- SALES, M. V. **Bases estruturais da interação da lectina de *Canavalia brasiliensis* Mart. ex Benth. (Conbr) com o fitohormônio ácido indole-3-acético.** 2019. 81 f. Dissertação, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.
- SAUER, M.; ROBERT, S.; KLEINE-VEHN, J. Auxin: simply complicated. **Journal of Experimental Botany**, vol. 64, no. 9, p. 2565–2577, Jun. 2013.
- SCHMIDT, G. W.; DELANEY, S.K. Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress. **Molecular Genetics and Genomics**, vol. 283, no. 3, p. 233–241, 23 Mar. 2010.
- SERRE, N. B. C. *et al.* AFB1 controls rapid auxin signalling through membrane depolarization in *Arabidopsis thaliana* root. **Nature Plants**, vol. 7, no. 9, p. 1229–1238, 19 Jul. 2021.

- SHAN, X.; YAN, J.; XIE, D. Comparison of phytohormone signaling mechanisms. **Current Opinion in Plant Biology**, vol. 15, no. 1, p. 84–91, Feb. 2012.
- SHARON, N. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, vol. 14, no. 11, p. 53R–62R, 30 Jun. 2004.
- SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific Reagents and Biological Recognition Molecules. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 282, no. 5, p. 2753–2764, Feb. 2007.
- SHARON, N.; LIS, H. How Proteins Bind Carbohydrates: Lessons from Legume Lectins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 50, no. 22, p. 6586–6591, 1 Oct. 2002.
- SHEN, J. *et al.* Persulfidation-based Modification of Cysteine Desulfhydrase and the NADPH Oxidase RBOHD Controls Guard Cell Abscissic Acid Signaling. **The Plant Cell**, vol. 32, no. 4, p. 1000–1017, Apr. 2020.
- SHIGENAGA, A. M.; ARGUESO, C.T. No hormone to rule them all: Interactions of plant hormones during the responses of plants to pathogens. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, vol. 56, p. 174–189, Aug. 2016.
- SHUKLE, R. H.; SUBRAMANYAM, S.; WILLIAMS, C. E. Effects of antinutrient proteins on Hessian fly (Diptera: Cecidomyiidae) larvae. **Journal of Insect Physiology**, vol. 58, no. 1, p. 41–48, Jan. 2012.
- SINGH, H. *et al.* Auxin metabolic network regulates the plant response to metalloids stress. **Journal of Hazardous Materials**, vol. 405, p. 124250, Mar. 2021.
- SINHA, S. *et al.* Subunit assembly of plant lectins. **Current Opinion in Structural Biology**, vol. 17, no. 5, p. 498–505, Oct. 2007.
- SONG, Y. Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide. **Journal of Integrative Plant Biology**, vol. 56, no. 2, p. 106–113, 24 Feb. 2014.
- SOUSA, J. P. D. **Análises estruturais da lectina de *Canavalia maritima* complexada com auxinas naturais e sintéticas**. 2022. 86 f. Tese de doutorado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022.
- SRIDHAR, K.R.; SEENA, S. Nutritional and antinutritional significance of four unconventional legumes of the genus *Canavalia* – A comparative study. **Food Chemistry**, vol. 99, no. 2, p. 267–288, Jan. 2006.
- SUPRIYA, P.; SRIDHAR, K. R.; GHATE, S. D. Impact of Electron-Beam Irradiation on Functional Attributes of Seeds of Two Coastal Wild Legume Landraces of *Canavalia*. **Recent Patents on Biotechnology**, vol. 12, no. 3, p. 177–185, 12 Sep. 2018.
- SZEMENYEI, H.; HANNON, M.; LONG, J. A. TOPLESS Mediates Auxin-Dependent Transcriptional Repression During *Arabidopsis* Embryogenesis. **Science**, vol. 319, no. 5868, p. 1384–1386, 7 Mar. 2008.
- TAIZ, L. ; ZEIGER, E. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6 ed. [S. l.]: Artmed, [s. d.].

TAN, X. *et al.* Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. **Nature**, vol. 446, no. 7136, p. 640–645, Apr. 2007.

TANG, W.; YU, Y.; XU, T. The interplay between extracellular and intracellular auxin signaling in plants. **Journal of Genetics and Genomics**, Jul. 2024.

TANIGUCHI, M. *et al.* The Arabidopsis LAZY1 Family Plays a Key Role in Gravity Signaling within Statocytes and in Branch Angle Control of Roots and Shoots. **The Plant Cell**, vol. 29, no. 8, p. 1984–1999, Aug. 2017.

TSANEVA, M.; VAN DAMME, E. J. M. 130 years of Plant Lectin Research. **Glycoconjugate Journal**, vol. 37, no. 5, p. 533–551, 29 Oct. 2020.

VAN DAMME, E. J. M. 35 years in plant lectin research: a journey from basic science to applications in agriculture and medicine. **Glycoconjugate Journal**, vol. 39, no. 1, p. 83–97, 24 Feb. 2022.

VAN DAMME, E. J. M. History of Plant Lectin Research. [*S. l.: s. n.*], 2014. p. 3–13.

VAN DAMME, E. J.M. *et al.* A Novel Family of Lectins Evolutionarily Related to Class V Chitinases: An Example of Neofunctionalization in Legumes. **Plant Physiology**, vol. 144, no. 2, p. 662–672, 7 Jun. 2007.

VAN DAMME, E. J.M.; LANNOO, N.; PEUMANS, W. J. Plant Lectins. [*S. l.: s. n.*], 2008. p. 107–209.

VAN HOLLE, S.; VAN DAMME, E. J. M. Messages From the Past: New Insights in Plant Lectin Evolution. **Frontiers in Plant Science**, vol. 10, 29 Jan. 2019.

VANDENBORRE, G.; SMAGGHE, G.; VAN DAMME, E. J.M. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**, vol. 72, no. 13, p. 1538–1550, Sep. 2011.

WANG, J. L.; CUNNINGHAM, B. A.; EDELMAN, G. M. Unusual Fragments in the Subunit Structure of Concanavalin A. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 68, no. 6, p. 1130–1134, Jun. 1971.

WANG, R.; ESTELLE, M. Diversity and specificity: auxin perception and signaling through the TIR1/AFB pathway. **Current Opinion in Plant Biology**, vol. 21, p. 51–58, Oct. 2014.

WANG, T. *et al.* Overexpression of OsUGT3 enhances drought and salt tolerance through modulating ABA synthesis and scavenging ROS in rice. **Environmental and Experimental Botany**, vol. 192, p. 104653, Dec. 2021.

WANG, Z. *et al.* Brassinosteroid Signaling Network and Regulation of Photomorphogenesis. **Annual Review of Genetics**, vol. 46, no. 1, p. 701–724, 15 Dec. 2012.

WEIJERS, D. *et al.* Developmental specificity of auxin response by pairs of ARF and Aux/IAA transcriptional regulators. **The EMBO Journal**, vol. 24, no. 10, p. 1874–1885, 18

May 2005.

WEIJERS, D.; WAGNER, D. Transcriptional Responses to the Auxin Hormone. **Annual Review of Plant Biology**, vol. 67, no. 1, p. 539–574, 29 Apr. 2016.

WOODWARD, A. W. Auxin: Regulation, Action, and Interaction. **Annals of Botany**, vol. 95, no. 5, p. 707–735, 8 Feb. 2005.

XU, T. *et al.* Cell Surface ABP1-TMK Auxin-Sensing Complex Activates ROP GTPase Signaling. **Science**, vol. 343, no. 6174, p. 1025–1028, 28 Feb. 2014.

YANG, D. C. H.; GALL, W. E.; EDELMAN, G. M. Rotational Correlation Time of Concanavalin A after Interaction with a Fluorescent Probe. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 249, no. 21, p. 7018–7023, Nov. 1974.

YONNY, M. E. *et al.* Development of a Novel, Sensitive, Selective, and Fast Methodology to Determine Malondialdehyde in Leaves of Melon Plants by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, vol. 2017, p. 1–9, 2017.

YU, J. *et al.* Auxin Control of Root Organogenesis from Callus in Tissue Culture. **Frontiers in Plant Science**, vol. 8, 8 Aug. 2017.

YU, Y. *et al.* ABLs and TMKs are co-receptors for extracellular auxin. **Cell**, vol. 186, no. 25, p. 5457-5471.e17, Dec. 2023.

YUAN, Y. *et al.* SlARF10, an auxin response factor, is involved in chlorophyll and sugar accumulation during tomato fruit development. **Journal of Experimental Botany**, 13 Sep. 2018.

YUAN, Y. *et al.* Auxin response factor 6A regulates photosynthesis, sugar accumulation, and fruit development in tomato. **Horticulture Research**, vol. 6, no. 1, p. 85, 11 Dec. 2019.

ZAZIMALOVA, E. *et al.* Auxin Transporters--Why So Many? **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, vol. 2, no. 3, p. a001552–a001552, 1 Mar. 2010.

ZHENG, M. *et al.* Chloroplast translation initiation factors regulate leaf variegation and development. **Plant Physiology**, , p. pp.02040.2015, 17 Aug. 2016.

ZHOU, Y.; WANG, C.; YU, Y.; DING, Z.; XU, T. Rapid auxin signaling: An ancient and conserved response in plants. **The Innovation Life**, vol. 2, no. 2, p. 100061, 2024.

ZOU, M. *et al.* The critical function of the plastid rRNA methyltransferase, CMAL, in ribosome biogenesis and plant development. **Nucleic Acids Research**, vol. 48, no. 6, p. 3195–3210, 6 Apr. 2020.



## APÊNDICE A – LISTA DE PRIMERS USADOS PARA ANÁLISE DA qRT-PCR

**Figura A1.** Tabela dos primers utilizados para análise da qRT-PCR

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<b>L25 ribosomal protein</b>	CCCCTCACCACAGAGTCTGC	AAGGGTGTTGTTGTCCTCAATCTT
<b>Elongation factor 1<math>\alpha</math> (EF-1<math>\alpha</math>)</b>	TGAGATGCACCACGAAGCTC	CCAACATTGTCACCAGGAAGTG
<b>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 (Ntubc2)</b>	CTGGACAGCAGACTGACATC	CAGGATAATTTGCTGTAACAGATTA
<b>NtActin (Tac9)</b>	CTGAGGTCCTTTTCCAACCA	TACCCGGGAACATGGTAGAG
<b>NtARF1</b>	CGGATCATCACATCATCAGC	TGGGAAATAGTAAACTCTCT
<b>NtIAA14</b>	GCGAAACGTGGACTCTCATC	GTTTGATCTCACTGGTGGCC
<b>NtSAUR59</b>	TGGGGAAGAGCAGAAGAAGA	ACGAAGACATCCTCAGTGCA
<b>NtIAA17</b>	GGAATCTCCGACGCTATGGA	GAGCTCCATCTACTGCCACT

## APÊNDICE B – MANUSCRITO DO ARTIGO DA TESE

### Modulation of IAA bioavailability by ConM in *Nicotiana tabacum* leaf segments cultured *in vitro*

Misrael V. Sales<sup>a</sup>, Cristina P. S. Carvalho<sup>a</sup>, Bruno A. M. Rocha<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará,  
Campus do Pici, Zip Code 60451-970, Fortaleza, Ceará, Brazil

\*Corresponding author; E-mail: bruno.rocha@ufc.br

#### ABSTRACT

Lectins, widely distributed in plants, are particularly abundant in legume cotyledons and interact with hydrophobic molecules such as plant hormones. This study evaluated the physiological role of ConM, a lectin from *Canavalia maritima*, in interaction with indole-3-acetic acid (IAA) using *Nicotiana tabacum* leaf segments cultured *in vitro*. Leaf segments were treated with 20  $\mu$ M IAA and varying concentrations of ConM (5  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 40  $\mu$ M). Biomass, photosynthetic pigments, antioxidant enzyme activity, lipid peroxidation, and auxin-regulated gene expression were analyzed. Results showed that higher ConM concentrations reduced chlorophyll a, biomass, and callus formation while increasing lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity. Gene expression was significantly modulated, with 40  $\mu$ M ConM reducing ARF1 and IAA14 expression. The interaction of ConM with IAA reduced auxin bioavailability, triggering a molecular response through auxin-regulated gene expression, which led to significant morphological, biochemical, and physiological changes.

**Keywords:** Auxin. Transcription factors. Physiological interaction

#### 1. INTRODUCTION

Lectins are widely distributed proteins found in plants, fungi, viruses, bacteria, and animals. They specifically bind to carbohydrates or glycoconjugates without catalyzing reactions, and have extensive applications in biotechnology, including biochemistry, cellular and molecular biology, immunology, pharmacology, medicine, and clinical diagnostics, with

potential for future innovations (Cavada et al., 2019; Coelho et al., 2017; Hashim et al., 2017; Tsaneva & Van Damme, 2020; Van Damme, 2022).

In plants, lectins occur across non-vascular organisms such as bryophytes, as well as in more complex groups like gymnosperms and angiosperms, primarily serving as defense mechanisms against pathogens. The diversity in the three-dimensional structures of lectins enables their ability to recognize the same sugar molecules or bind to different sugars, despite structural differences (Abhinav & Vijayan, 2014; Chrispeels & Raikhel, 1991; Naithani et al., 2021; Van Holle & Van Damme, 2019)

Legume lectins, in particular, exhibit high sequence homology and structural similarity, though small variations in amino acid composition can lead to differences in quaternary structures. These lectins possess a highly conserved hydrophobic region crucial for binding hydrophobic molecules and facilitating interactions with other substances. Despite decades of research, the full scope of biological functions of plant lectins remains unclear (Brinda et al., 2004; Delatorre et al., 2007; Moreno et al., 2006; Rüdiger & Gabius, 2001)

Recent studies suggest that plant lectins, beyond their traditional roles in nitrogen storage and pathogen recognition, interact with glycoconjugates of other organisms, influencing their biological functions. This aspect of lectin physiology, particularly regarding interactions with external molecules and their roles in plant defense and development, remains underexplored (De Schutter et al., 2017; Peumans & Van Damme, 1995)

For example, Delatorre et al. (2013) demonstrated that the lectin from *Canavalia maritima* (ConM) plays a role in regulating the availability of indole-3-acetic acid (IAA) during seedling development. By sequestering IAA, ConM may protect developing tissues from its inhibitory effects. This novel role of lectins suggests they could modulate IAA levels, acting as a defense mechanism against pathogens that manipulate IAA concentrations to their advantage (DELATORRE *et al.*, 2013)

Auxins, particularly IAA, are central regulators of plant growth and development. While low concentrations promote cell elongation, higher concentrations inhibit elongation and stimulate cell division, thereby influencing tissue differentiation (Bhalerao & Bennett, 2003). Auxin homeostasis is crucial for growth regulation and environmental adaptation, with tissue-specific effects depending on concentration gradients.

This study aims to investigate the interaction between ConM and IAA, specifically its impact on IAA bioavailability in *Nicotiana tabacum* leaf segments cultured in vitro. By exploring the role of ConM in modulating auxin physiology, this research may uncover new mechanisms by which legume lectins influence plant development and defense responses.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### Biological Material and Protein Extraction

Lectin ConM was isolated from *Canavalia maritima* seeds collected from Tabuba Beach, Caucaia, Ceará, with genetic access registered under SisGen (AFD4698). Mature seeds were washed, dried at 37 °C for 24 hours, and dehulled. The endosperm was ground into a fine flour. Soluble proteins were extracted using 0.15 M NaCl (1:10 w/v) for 3 hours at 298 K, followed by centrifugation at 10,000 ×g at 277 K for 30 minutes. The supernatant was filtered and subjected to affinity chromatography using a Sephadex G-100 column equilibrated with 0.15 M NaCl. The total extract was left to interact with the column overnight, and unbound materials were washed out. Bound proteins were eluted with 0.1 M glycine (pH 2.6), then dialyzed against deionized water, lyophilized, and stored.

### *In Vitro* Culture of *Nicotiana tabacum* Leaf Explants

*Nicotiana tabacum* seedlings were obtained from disinfected seeds, treated with 70% ethanol for 30 seconds and 1% sodium hypochlorite for 12 minutes. Seeds were placed in sterile Petri dishes with moistened filter paper for germination. Seedlings were transferred to flasks containing (Murashige & Skoog, 1962) (MS) medium (2% sucrose, 0.7% agar, pH 5.8) and cultured under a 12-hour photoperiod at  $300 \pm 2$  K. Subcultures were periodically performed for micropropagation.

### Vacuum Infiltration of Tobacco Leaf Segments

Leaf segments (0.5 cm<sup>2</sup>) with secondary veins were excised from micropropagated *N. tabacum* plants. These segments were vacuum-infiltrated with 100 mL of 20 μM indole-3-acetic acid (IAA) in the presence or absence of ConM (5 μM, 20 μM, or 40 μM), filtered through 0.2 μm membranes. After a 1-minute exposure to 40 Hz vibration and 5-minute vacuum at 600 mmHg, the segments were cultured on MS medium and maintained at  $300 \pm 2$  K for 28 days. The experimental design was fully randomized, with six replicates containing 14 leaf segments each.

## **Lipid Peroxidation and Enzyme Activity Assays**

Lipid peroxidation was assessed by measuring thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), following (Heath & Packer, 1968). Absorbance was measured at 532 nm and 660 nm, using an extinction coefficient of  $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , and the results were expressed as nmol/g of fresh weight. Total proteins were extracted from leaf segments and calli using a 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 2 mM DTT, and protein content was used for enzyme assays. Ascorbate peroxidase (APX) activity was measured according to Nakano and Asada (1981) by tracking  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumption at 290 nm. Catalase (CAT) activity was measured by monitoring  $\text{H}_2\text{O}_2$  decomposition at 240 nm (Beers and Sizer, 1952). Guaiacol peroxidase (POX) activity was determined by tracking the oxidation of guaiacol at 470 nm using a molar extinction coefficient of  $26.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Urbanek et al., 1991).

## **Photosynthetic Pigment Estimation**

Photosynthetic pigments were extracted from 200 mg of leaf segments using 80% acetone. Absorbance was measured at 665, 649, and 480 nm, and pigment concentrations were calculated using equations from Lichtenthaler and Buschmann (2001) to determine chlorophyll a, chlorophyll b, and carotenoid content.

## **Gene Expression Analysis of Auxin Response**

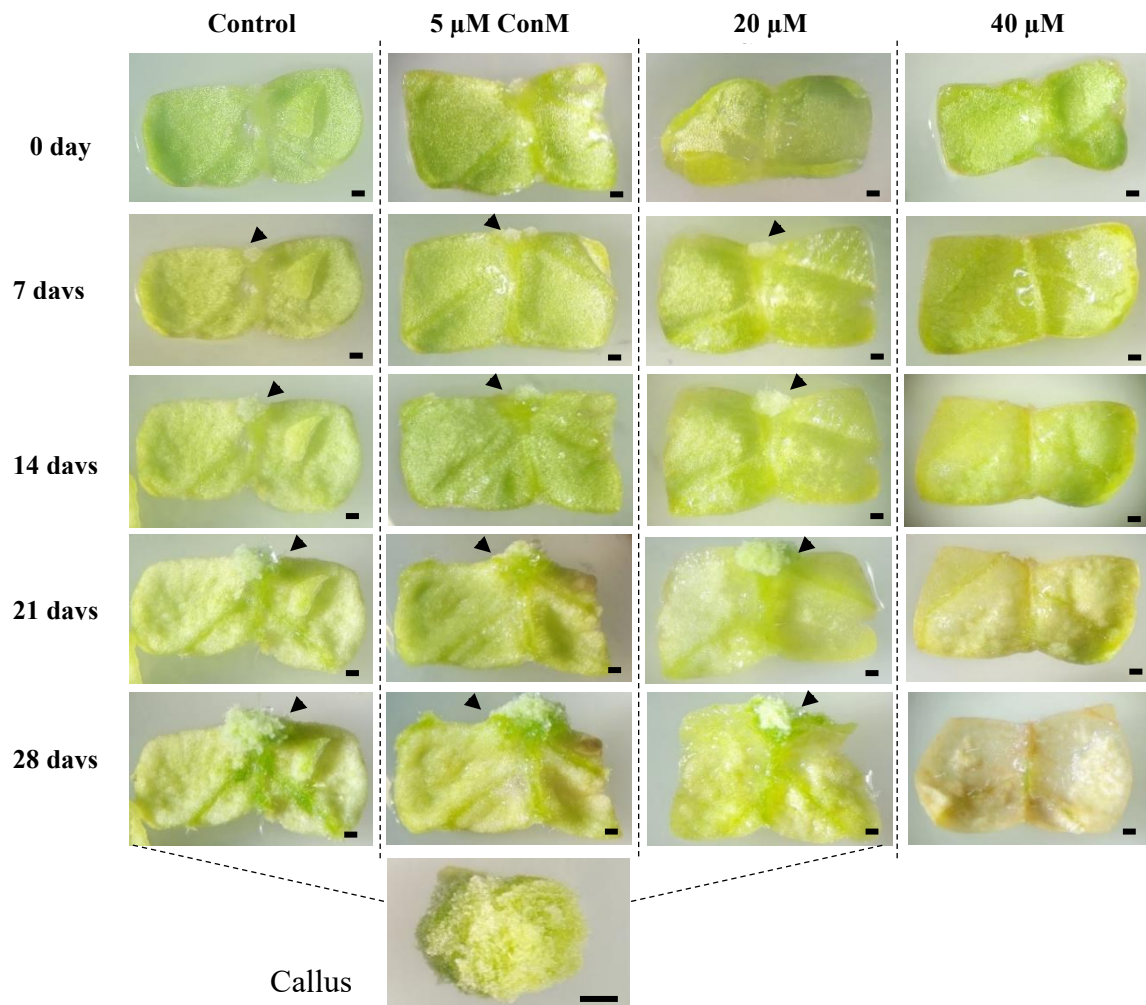
Total RNA was extracted from *N. tabacum* leaf segments after vacuum infiltration at 24, 48, and 72 hours, using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). cDNA was synthesized from 1  $\mu\text{g}$  of RNA using the IMpromII™ Reverse Transcriptase Kit (Promega). Quantitative PCR (qPCR) was performed to evaluate the expression of auxin-responsive genes, including NtIAA14, NtIAA17, NtARF1, and NtSAUR59. Reference genes (actin, L25, Ntubc2, EF-1 $\alpha$ ) were used for normalization. Reactions were performed in triplicate using the GoTaq qPCR Sybr Green Kit (Promega) on a QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). Relative gene expression was calculated using the  $\Delta\Delta\text{CT}$  method (Pfaffl, 2001).

## **RESULTS**

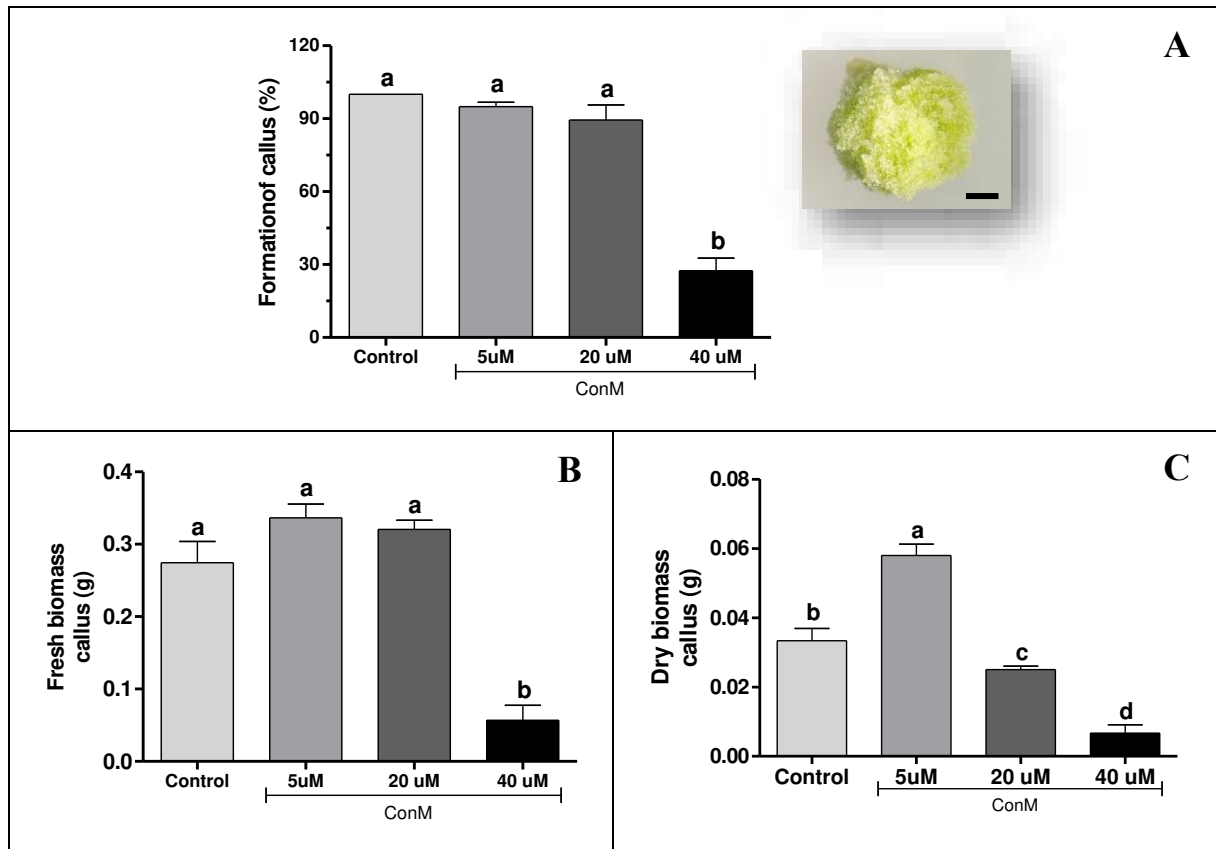
### **Effect of ConM Interaction with IAA in *N. tabacum* Leaf Segments Cultivated *In Vitro***

The presence of auxin (IAA) promoted callus formation in *N. tabacum* leaf explants cultured *in vitro*, with callus volume varying based on ConM concentration. Callus formation occurred after 7 days of culture, except at 40  $\mu$ M ConM, where tissue whitening was observed, suggesting oxidation and pigment degradation (Figure 1). Callus primarily formed in the vascular regions of the leaf segments. Treatment with 40  $\mu$ M ConM reduced callus formation by 72.6%, alongside a 77.78% reduction in fresh biomass compared to the control. No significant differences were observed in callus formation or fresh weight at 5  $\mu$ M and 20  $\mu$ M ConM. However, 5  $\mu$ M ConM increased dry biomass by 25.93%, while 20  $\mu$ M and 40  $\mu$ M reduced it by 18.52% and 77.78%, respectively (Figure 2).

**Figure 1.** Leaf segments of *Nicotiana tabacum* treated with 20  $\mu$ M IAA and 5, 20 or 40  $\mu$ M ConM. Leaf segments of *N. tabacum* vacuum infiltrated with 20  $\mu$ M indole-3-acetic acid together with 5  $\mu$ M, 20  $\mu$ M or 40  $\mu$ M ConM, then cultured in MS medium without growth regulator for 28 days at 300 K photoperiod 12h. (Scale 1 mm). (A) Callus formed after 28 days of culture, with greenish-white coloration.



**Figure 2.** Formation, determination of fresh and dry biomass of calli generated from leaf segments of *Nicotiana tabacum* infiltrated with ConM. (A) Percentage of formation, (B) fresh and (C) dry biomass of callus obtained from leaf segments of *N. tabacum* vacuum-infiltrated with 20  $\mu$ M indole-3-acetic acid together with 5  $\mu$ M, 20  $\mu$ M or 40  $\mu$ M ConM, then cultured in MS medium without growth regulator for 28 days at 300 k photoperiod 12h.

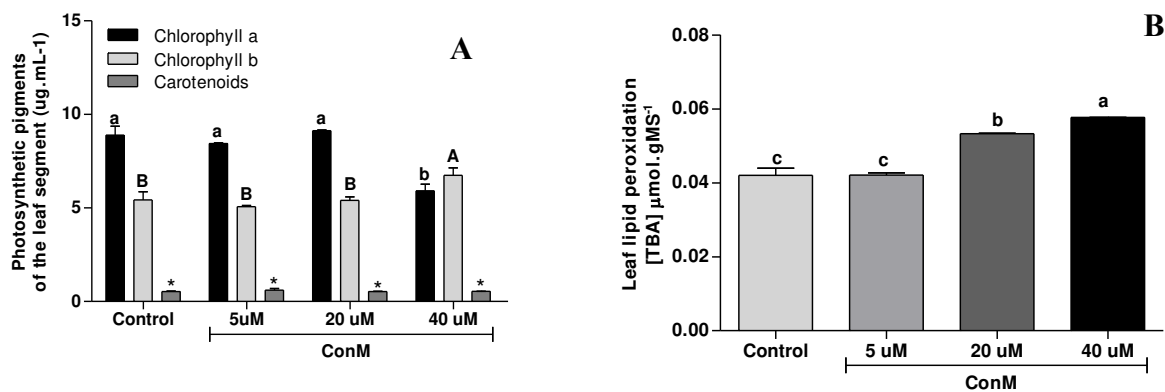


## Pigment Content of Leaf Segments in the Presence of ConM and Effect of ConM on Membrane Integrity

Leaf segments treated with 5  $\mu$ M and 20  $\mu$ M ConM retained their green pigmentation, exhibiting morphology similar to untreated controls. In contrast, those treated with 40  $\mu$ M ConM showed tissue discoloration, indicative of pigment degradation. Treatment with 5  $\mu$ M and 20  $\mu$ M ConM resulted in higher chlorophyll a content compared to chlorophyll b, consistent with controls. However, segments treated with 40  $\mu$ M ConM displayed a 33.52% reduction in chlorophyll a and a 24.29% increase in chlorophyll b, suggesting disruption of photosynthetic processes (Figure 3). Leaf segments co-infiltrated with 20  $\mu$ M IAA and 20  $\mu$ M or 40  $\mu$ M ConM exhibited increased lipid peroxidation after 28 days, as evidenced by elevated TBA levels.

Segments treated with 20  $\mu\text{M}$  and 40  $\mu\text{M}$  ConM showed a 25% and 50% increase in TBA levels, respectively, relative to the control (Figure 4). These findings suggest that ConM concentrations above 5  $\mu\text{M}$  significantly impair membrane integrity, inducing oxidative stress.

**Figure 3.** Determination of photosynthetic pigment contents (A) and Evaluation of lipid peroxidation (B) in leaf segments of *Nicotiana tabacum* vacuum-infiltrated with 20  $\mu\text{M}$  indole-3-acetic acid together with 5  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  or 40  $\mu\text{M}$  ConM, then grown in MS medium without growth regulator for 28 days at 300 K, 12-h photo period.

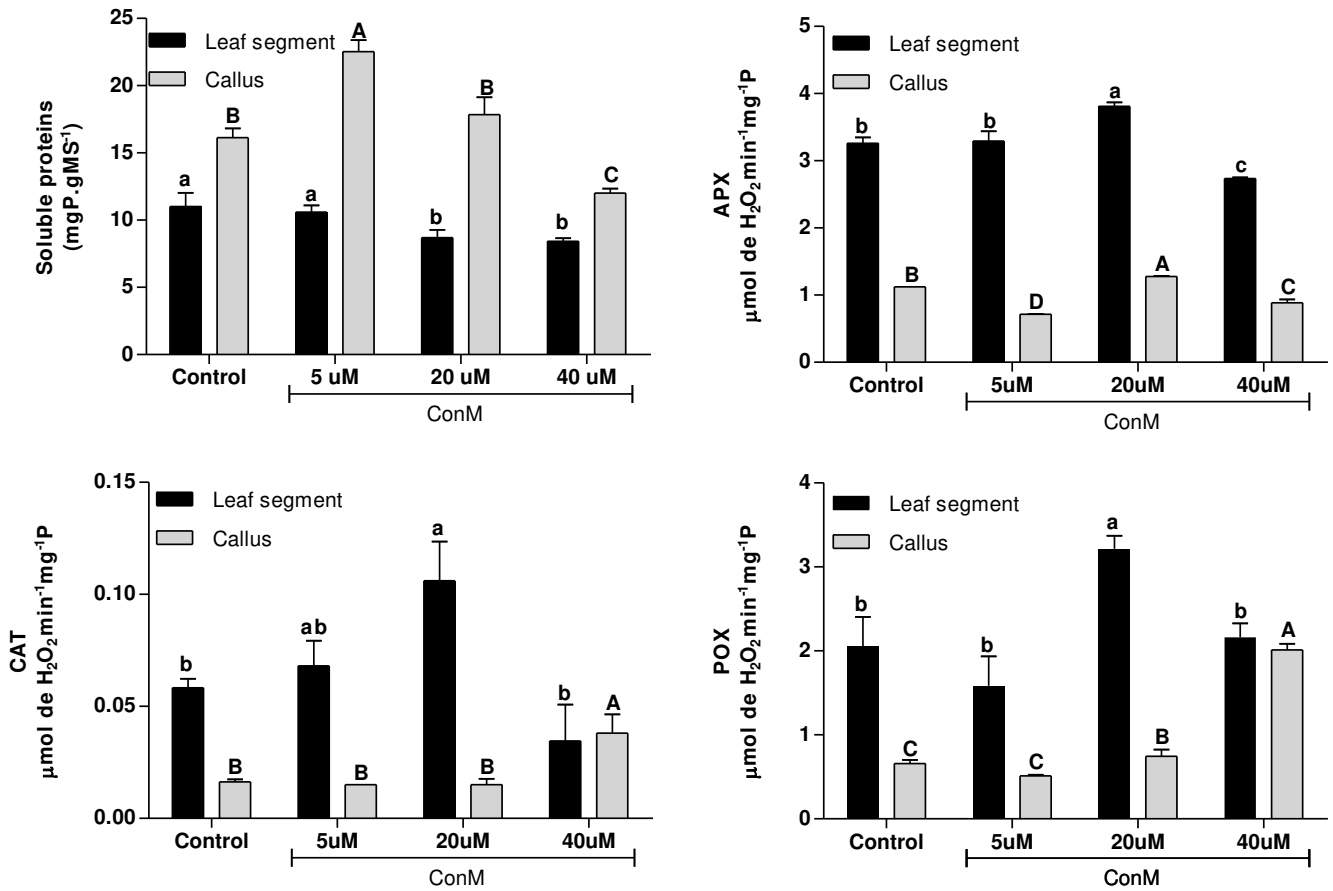


### Oxidative Effects of ConM on Leaf Segments and Callus

Callus samples exhibited higher soluble protein content than leaf segments across all treatments (Figure 4). Calli treated with 5  $\mu\text{M}$  ConM showed a 39.59% increase in soluble protein content, while those treated with 40  $\mu\text{M}$  ConM experienced a 25.53% reduction compared to the control. These patterns align with the observed dry biomass accumulation. Moreover, ConM substantially affected antioxidant enzyme activity, with catalase (CAT) and peroxidase (POX) activities increasing by 137.50% and 205.16%, respectively, in calli treated with 40  $\mu\text{M}$  ConM. Leaf segments treated with 20  $\mu\text{M}$  ConM displayed significant increases in APX, CAT, and POX activities, indicating a stress response triggered by higher ConM concentrations.



190 **Figure 4.** Quantification of soluble proteins and enzymatic activity of ascorbate peroxidase  
191 (APX), catalase (CAT) and peroxidase (POX) enzymes in leaf segments and calluses of  
192 *Nicotiana tabacum*. Quantity of soluble proteins and enzymatic activity of ascorbate peroxidase  
193 (APX), catalase (CAT) and peroxidase (POX) enzymes in leaf segments and calluses of *N.*  
194 *tabacum* vacuum infiltrated with 20  $\mu\text{M}$  indole-3-acetic acid together with 5  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  or 40  
195  $\mu\text{M}$  ConM, then cultured in MS medium without growth regulator for 28 days at 300 K  
196 photoperiod 12h.



197

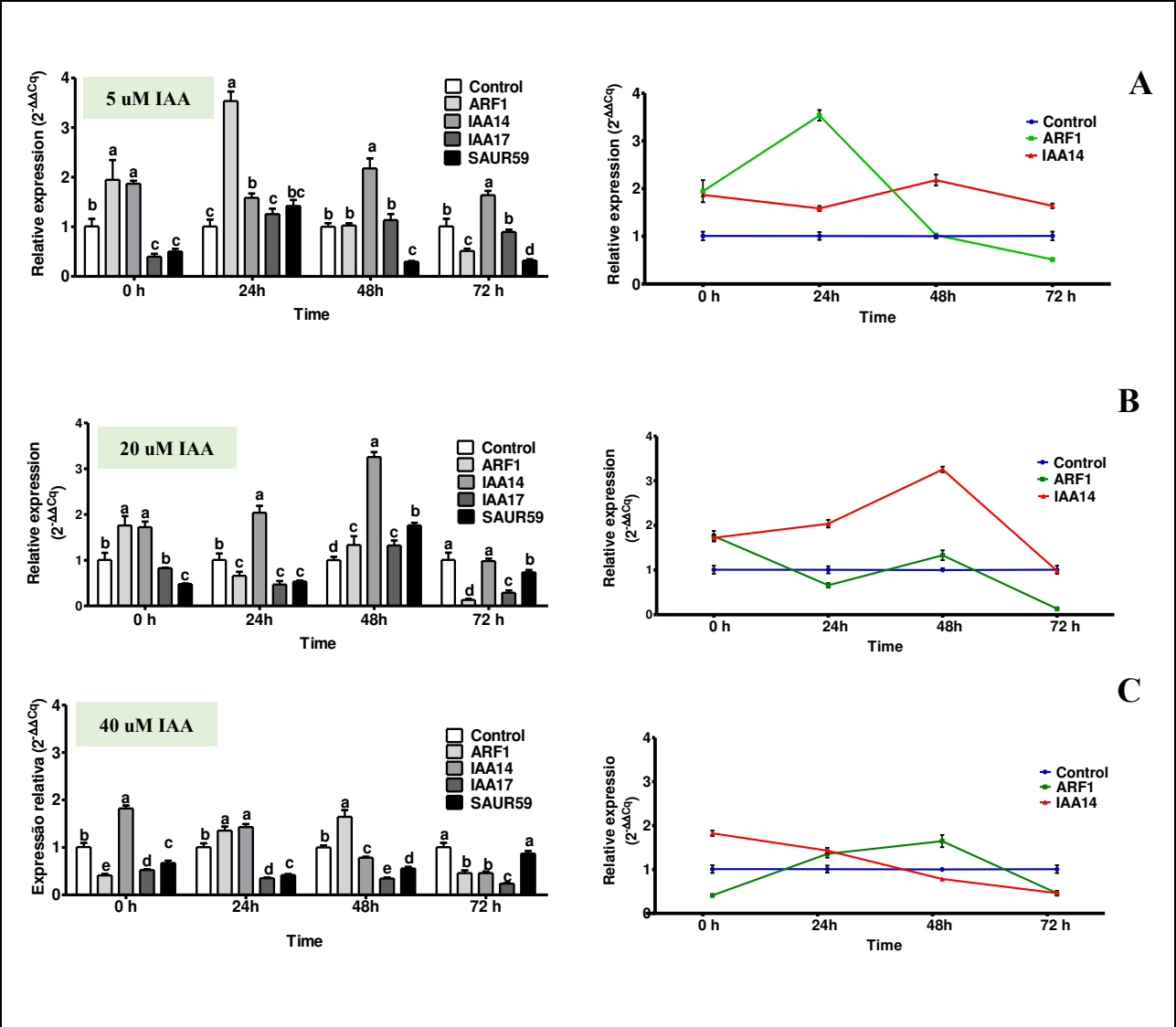
198 **Effect of ConM on Auxin-Regulated Gene Expression**

199

200 ConM concentrations significantly modulated the expression of auxin-regulated genes  
201 in *N. tabacum* leaf segments over time. The expression of ARF1 and IAA14 followed trends  
202 described in the literature, where Aux/IAA proteins inhibit ARF target genes under high  
203 Aux/IAA gene expression. At time 0 h, 5  $\mu\text{M}$  and 20  $\mu\text{M}$  ConM induced increased expression  
204 of ARF1 and IAA14, while 40  $\mu\text{M}$  ConM repressed ARF1 expression. After 24 h, segments  
205 treated with 5  $\mu\text{M}$  ConM exhibited ARF1 overexpression, followed by a decline after 72 h,  
206 while IAA14 showed an inverse pattern (Figure 5A). Segments treated with 20  $\mu\text{M}$  ConM

demonstrated upregulation of IAA14 at 48 h, with ARF1 expression remaining low (Figure 5B). Conversely, 40  $\mu$ M ConM led to repression of IAA14 after 24 h (Figure 5C). The expression of IAA17 varied, showing occasional upregulation, while SAUR59 displayed mixed responses, with overall reduced expression, suggesting complex regulation by ConM concentrations.

**Figure 5.** Analysis of the expression levels of NARF1, IAA14, IAA17, and SAUR59 genes in leaf segments of *Nicotiana tabacum*. The expression levels of NARF1, IAA14, IAA17, and SAUR59 genes in leaf segments of *N. tabacum* vacuum infiltrated with 20  $\mu$ M indole-3-acetic acid together with 5  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, or 40  $\mu$ M ConM, then maintained in MS medium without growth regulator for 0h, 24h, 48h, and 72h at 300K photoperiod 12h.



## DISCUSSION

### Callus Formation and Biomass Accumulation

The presence of IAA induced callus formation in *N. tabacum*, with variations in callus volume and biomass depending on ConM concentration. Lower concentrations of ConM (5  $\mu$ M and 20  $\mu$ M) promoted callus formation and biomass accumulation, with a notable increase in dry biomass at 5  $\mu$ M. However, at higher concentrations (40  $\mu$ M), there was a marked reduction in callus formation (72.60%) and biomass, likely due to oxidative stress, as indicated by tissue whitening and decreased chlorophyll content. This oxidative damage aligns with the findings of Ikeuchi *et al.* (2019) and Yu *et al.* (2017), who noted that high auxin concentrations can shift developmental pathways toward callus proliferation but can also induce oxidative stress, affecting cell viability. The proliferation of callus cells and the specification of their developmental pathways are significantly influenced by exogenous phytohormones, which play a crucial role in regulating the biosynthesis and distribution of endogenous hormones. These phytohormones initiate a cascade of signaling pathways that are critical for the process of cellular differentiation (Ikeuchi *et al.*, 2013).

### Pigment Content and Photosynthetic Integrity

The significant reduction in chlorophyll a content and increase in chlorophyll b at 40  $\mu$ M ConM indicate potential damage to the photosynthetic apparatus. This agrees with studies by Jiang and Dehesh (2021) and Luo *et al.* (2023), which suggest that auxin plays a critical role in regulating chloroplast development and chlorophyll biosynthesis. The interaction between ConM and IAA appears to disrupt normal chlorophyll production, particularly at high lectin concentrations, which correlates with the tissue whitening observed. Studies have shown that both endogenous and exogenous auxin act as negative regulators of chlorophyll accumulation in cotyledons during de-etiolation (Luo *et al.*, 2023).

The relationship between auxin and chloroplast development has been highlighted in several (Liu *et al.*, 2020; Salazar-Irribé and De-la-Peña, 2020). The changes observed in our study may be related to the interaction between ConM and IAA, which appears to affect components of the photosynthetic system, such as chlorophyll content. This suggests a potential regulatory role of the lectin in the bioavailability of IAA. Given that auxin signal transduction, mediated by transcription factors, is crucial in the regulation of chlorophyll biosynthesis, this

interaction could directly or indirectly influence chlorophyll biosynthesis genes (Sagar *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2018, 2019). Our findings indicate that the presence of ConM may modulate auxin levels, which in turn could impact chloroplast development and chlorophyll biosynthesis.

### **Membrane Integrity and Lipid Peroxidation**

The increase in TBA levels in leaf segments treated with 20  $\mu$ M and 40  $\mu$ M ConM indicates significant lipid peroxidation, suggesting that higher concentrations of ConM induce oxidative damage to cell membranes. These findings are consistent with the literature on plant responses to stress (LU *et al.*, 2018), where environmental factors such as oxidative stress lead to increased lipid peroxidation. The results further confirm that concentrations of ConM above 5  $\mu$ M cause oxidative stress, affecting membrane integrity and overall tissue health. In this study, malondialdehyde (MDA) content was indirectly assessed through the formation of the TBA-MDA complex. The observed increase in MDA levels in leaf segments was directly correlated with the concentration of ConM, suggesting that cellular membranes were adversely affected by high concentrations of this protein. According to Yonny *et al.* (2017), MDA is a byproduct generated by plants in response to stress, reflecting the degree of lipid peroxidation in cellular membranes. Lipids are essential biomolecules that serve as structural components of most cellular membranes (Parida and Das, 2005). The increase in MDA, a product of lipid peroxidation, is widely recognized as an indicator of oxidative damage (Meloni *et al.*, 2003). The elevated MDA levels observed in our study indicate that ConM-induced stress likely resulted in oxidative damage to the membrane lipids. This damage could impair membrane integrity and function, leading to compromised cellular processes.

### **Antioxidant Enzyme Activity**

The enhanced activity of antioxidant enzymes, particularly catalase (CAT) and peroxidase (POX), in both calli and leaf segments treated with high concentrations of ConM reflects a robust response to oxidative stress. This aligns with studies by Biswas *et al.*, (2019) and Mittler *et al.* (2022), which emphasize the role of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant systems in modulating plant responses to stress. The increased enzyme activity suggests that ConM triggers an oxidative stress response, activating the plant's antioxidant defense mechanisms to mitigate cellular damage. ROS play a critical role in plant growth, development, stress responses, and many other cellular processes. While basal levels of ROS

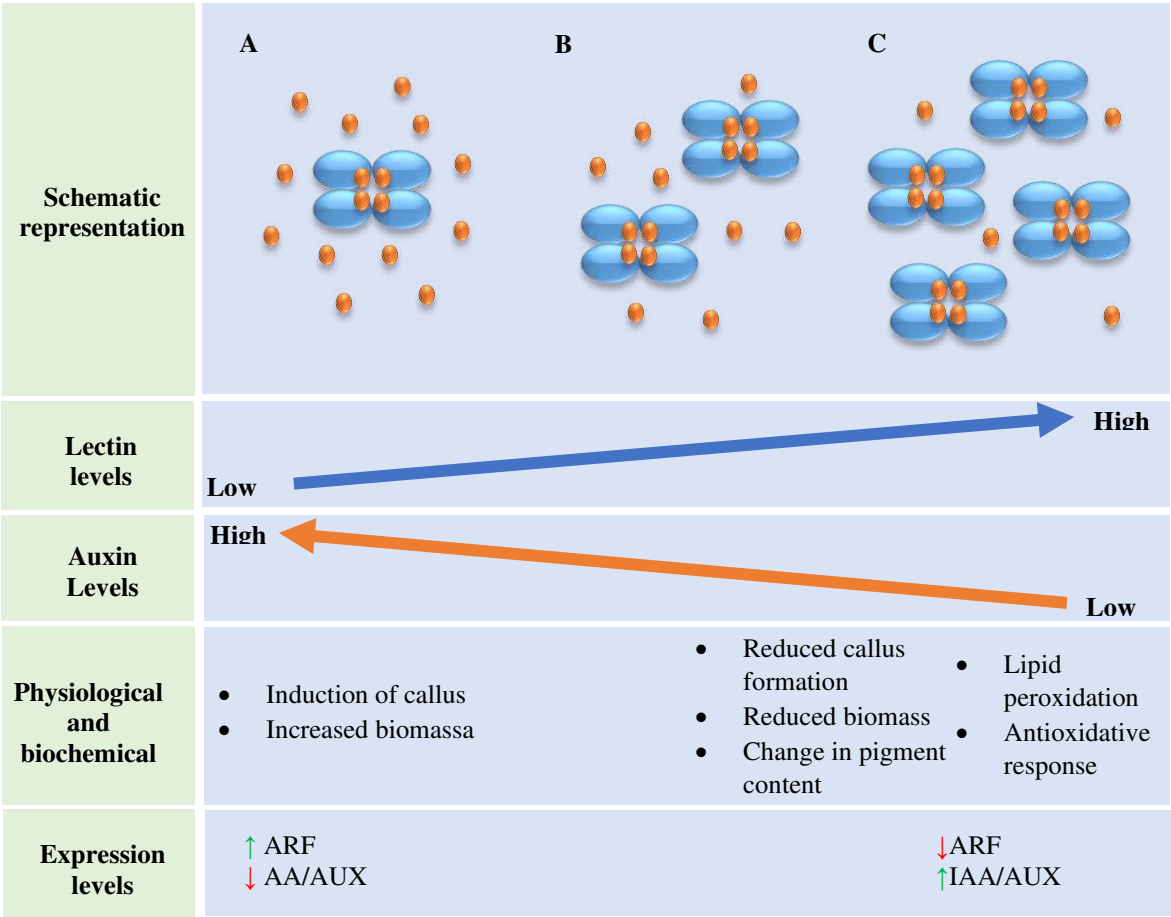
are essential for these cellular functions, an increase in ROS levels triggers stress responses, including the biosynthesis of specialized metabolites. However, excessive ROS can lead to oxidative stress, which has a cytotoxic effect (Mittler, 2017). According to Mittler *et al.* (2022), maintaining ROS homeostasis is crucial for modulating plant stress responses, with both ROS and ROS scavengers playing fundamental roles. During oxidative stress, auxin has been shown to stimulate antioxidant activity by regulating the transcription of specific genes (Singh *et al.*, 2021). This indicates a complex relationship between ROS signaling pathways and auxin, which is essential for fine-tuning plant developmental and environmental responses (Lamers *et al.*, 2020; Mittler *et al.*, 2022; Qi *et al.*, 2018; Shen *et al.*, 2020; T. Wang *et al.*, 2021).

### **Gene Expression of Auxin-Regulated Genes**

The alterations in the expression of auxin-regulated genes, such as ARF1, IAA14, and SAUR59, further highlight the impact of ConM on auxin signaling pathways. At lower concentrations, ConM induced gene expression, particularly ARF1 and IAA14, consistent with the role of auxin in promoting cell differentiation and proliferation. However, at 40  $\mu$ M ConM, the repression of these genes suggests a disruption in auxin signaling, possibly due to the oxidative stress induced by high lectin concentrations.

These findings are supported by Li *et al.* (2016) and Tan *et al.* (2007), who describe the regulation of auxin response genes through the interaction of Aux/IAA proteins and ARFs. The modulation of gene expression observed in this study indicates that ConM influences auxin signaling, potentially by affecting the bioavailability of IAA in plant tissues (Figure 6). Previous research has established that Aux/IAA proteins interact with auxin response factors (ARFs) under low auxin conditions, inhibiting the activation of ARF target genes. As auxin concentration increases, Aux/IAA proteins are ubiquitinated and degraded by the 26S proteasome, freeing ARFs to promote the expression of target genes in the tissues. This regulatory mechanism underscores the critical role of auxin in controlling key developmental processes in plants, mediated through the transcriptional regulation of auxin response (Roosjen *et al.*, 2018; Tang *et al.*, 2024).

**Figure 6.** Illustrative diagram of the modulation of auxin concentration in plant tissue by lectin. (A) Low concentration of lectin, resulting in more free auxin molecules in the plant tissue. (B) Equimolar concentration of lectin, leaving some free auxin molecules in the plant tissue. (C) High concentration of lectin, resulting in few free auxin molecules in the plant tissue.



In our experiments, we observed that the expression of the gene IAA17 was not consistently linear over time but showed positive regulation at specific treatment points. This suggests that IAA17 may respond dynamically to fluctuations in auxin levels influenced by the presence of lectins. Moreover, the expression of SAUR59 showed mixed responses, with a reduction compared to the control, indicating a more complex interaction with lectin concentrations. These findings align with previous studies, which have shown that a subset of SAUR genes, including SAUR59, can be repressed by auxin, particularly in root tissues (Paponov *et al.*, 2008; Ren and Gray, 2015; Wang *et al.*, 2012).

The regulatory role of ARFs in auxin-responsive gene expression is well established, with models describing their activation being thoroughly characterized (Salehin *et al.*, 2015).

In low auxin environments, Aux/IAA proteins form dimers with ARFs, inhibiting their activity by recruiting the co-repressor TOPLESS (TPL), leading to the repression of auxin-responsive genes (Szemenyei *et al.*, 2008). As auxin levels rise, Aux/IAA proteins bind to the SCF/TIR1/AFB complex, becoming ubiquitinated and degraded, thereby releasing ARFs to activate transcription of target genes (Wang and Estelle, 2014).

## CONCLUSION

This study explored the role of ConM lectin in modulating the physiology of *Nicotiana tabacum*, with a focus on its impact on the bioavailability of indole-3-acetic acid (IAA). The findings indicate that the interaction between ConM and IAA significantly reduces auxin bioavailability, triggering molecular responses in auxin-responsive gene expression. These interactions result in notable morphological, biochemical, and physiological changes, including effects on callus formation, photosynthetic pigment content, and antioxidant activity. Overall, the data suggest that ConM functions as a significant modulator of gene expression in response to auxin, offering deeper insights into the interactions between plant lectins and phytohormones.

## REFERENCES

- Abhinav, K. V., & Vijayan, M. (2014). Structural diversity and ligand specificity of lectins. The Bangalore effort. *Pure and Applied Chemistry*, 86(9), 1335–1355.  
<https://doi.org/10.1515/pac-2014-0607>
- Bhalerao, R. P., & Bennett, M. J. (2003). The case for morphogens in plants. *Nature Cell Biology*, 5(11), 939–943. <https://doi.org/10.1038/ncb1103-939>
- Biswas, M. S., Fukaki, H., Mori, I. C., Nakahara, K., & Mano, J. (2019). Reactive oxygen species and reactive carbonyl species constitute a feed-forward loop in auxin signaling for lateral root formation. *The Plant Journal*, 100(3), 536–548.  
<https://doi.org/10.1111/tpj.14456>
- Brinda, K. V., Mitra, N., Surolia, A., & Vishveshwara, S. (2004). Determinants of quaternary association in legume lectins. *Protein Science*, 13(7), 1735–1749.  
<https://doi.org/10.1110/ps.04651004>
- Cavada, B. S., Osterne, V. J. S., Lossio, C. F., Pinto-Junior, V. R., Oliveira, M. V., Silva, M. T. L., Leal, R. B., & Nascimento, K. S. (2019). One century of ConA and 40 years of ConBr research: A structural review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134, 901–911. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.100>
- Chrispeels, M. J., & Raikhel, N. V. (1991). Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *The Plant Cell*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.1105/tpc.3.1.1>
- Coelho, L. C. B. B., Silva, P. M. dos S., Lima, V. L. de M., Pontual, E. V., Paiva, P. M. G., Napoleão, T. H., & Correia, M. T. dos S. (2017). Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 1–22.  
<https://doi.org/10.1155/2017/1594074>
- De Schutter, K., Tsaneva, M., Kulkarni, S. R., Rougé, P., Vandepoele, K., & Van Damme, E. J. M. (2017). Evolutionary relationships and expression analysis of EUL domain proteins in rice (*Oryza sativa*). *Rice*, 10(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s12284-017-0164-3>



- 380 Delatorre, P., Rocha, B. A., Souza, E. P., Oliveira, T. M., Bezerra, G. A., Moreno, F. B.,  
 381 Freitas, B. T., Santi-Gadelha, T., Sampaio, A. H., Azevedo, W. F., & Cavada, B. S.  
 382 (2007). Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: new structural insights for  
 383 old molecules. *BMC Structural Biology*, 7(1), 52. [https://doi.org/10.1186/1472-6807-7-](https://doi.org/10.1186/1472-6807-7-52)  
 384 52
- 385 Delatorre, P., Silva-Filho, J. C., Rocha, B. A. M., Santi-Gadelha, T., da Nóbrega, R. B.,  
 386 Gadelha, C. A. A., do Nascimento, K. S., Nagano, C. S., Sampaio, A. H., & Cavada, B.  
 387 S. (2013). Interactions between indole-3-acetic acid (IAA) with a lectin from *Canavalia*  
 388 *maritima* seeds reveal a new function for lectins in plant physiology. *Biochimie*, 95(9),  
 389 1697–1703. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.05.008>
- 390 Hashim, O. H., Jayapalan, J. J., & Lee, C.-S. (2017). Lectins: an effective tool for screening  
 391 of potential cancer biomarkers. *PeerJ*, 5, e3784. <https://doi.org/10.7717/peerj.3784>
- 392 Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Archives of*  
 393 *Biochemistry and Biophysics*, 125(1), 189–198. [https://doi.org/10.1016/0003-](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)  
 394 9861(68)90654-1
- 395 Ikeuchi, M., Favero, D. S., Sakamoto, Y., Iwase, A., Coleman, D., Rymen, B., & Sugimoto, K.  
 396 (2019). Molecular Mechanisms of Plant Regeneration. *Annual Review of Plant Biology*,  
 397 70(1), 377–406. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100434>
- 398 Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. (2013). Plant Callus: Mechanisms of Induction and  
 399 Repression. *The Plant Cell*, 25(9), 3159–3173. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.116053>
- 400 Jiang, J., & Dehesh, K. (2021). Plastidial retrograde modulation of light and hormonal  
 401 signaling: an odyssey. *New Phytologist*, 230(3), 931–937.  
 402 <https://doi.org/10.1111/nph.17192>
- 403 Lamers, J., van der Meer, T., & Testerink, C. (2020). How Plants Sense and Respond to  
 404 Stressful Environments. *Plant Physiology*, 182(4), 1624–1635.  
 405 <https://doi.org/10.1104/pp.19.01464>
- 406 Li, S.-B., Xie, Z.-Z., Hu, C.-G., & Zhang, J.-Z. (2016). A Review of Auxin Response Factors  
 407 (ARFs) in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00047>

- 408 Lichtenthaler, H. K., & Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and Carotenoids: Measurement  
409 and Characterization by <scp>UV</scp> - <scp>VIS</scp> Spectroscopy. *Current*  
410 *Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1(1).  
411 <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01>
- 412 Liu, L., Lin, N., Liu, X., Yang, S., Wang, W., & Wan, X. (2020). From Chloroplast Biogenesis  
413 to Chlorophyll Accumulation: The Interplay of Light and Hormones on Gene Expression  
414 in *Camellia sinensis* cv. Shuchazao Leaves. *Frontiers in Plant Science*, 11.  
415 <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00256>
- 416 LU, Y., MA, J., TENG, Y., HE, J., CHRISTIE, P., ZHU, L., REN, W., ZHANG, M., & DENG,  
417 S. (2018). Effect of Silicon on Growth, Physiology, and Cadmium Translocation of  
418 Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) in Cadmium-Contaminated Soil. *Pedosphere*, 28(4),  
419 680–689. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60417-X](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60417-X)
- 420 Luo, W.-G., Liang, Q.-W., Su, Y., Huang, C., Mo, B.-X., Yu, Y., & Xiao, L.-T. (2023). Auxin  
421 inhibits chlorophyll accumulation through ARF7-IAA14-mediated repression of  
422 chlorophyll biosynthesis genes in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 14.  
423 <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1172059>
- 424 Meloni, D. A., Oliva, M. A., Martinez, C. A., & Cambraia, J. (2003). Photosynthesis and  
425 activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under  
426 salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, 49(1), 69–76.  
427 [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(02\)00058-8](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(02)00058-8)
- 428 Mittler, R. (2017). ROS Are Good. *Trends in Plant Science*, 22(1), 11–19.  
429 <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>
- 430 Mittler, R., Zandalinas, S. I., Fichman, Y., & Van Breusegem, F. (2022). Reactive oxygen  
431 species signalling in plant stress responses. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*,  
432 23(10), 663–679. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00499-2>
- 433 Moreno, F. B. M. B., Martil, D. E., Cavada, B. S., & de Azevedo, W. F. (2006). Crystallization  
434 and preliminary X-ray diffraction analysis of an anti-H(O) lectin from *Lotus*  
435 *tetragonolobus* seeds. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and*  
436 *Crystallization Communications*, 62(7), 680–683.

- 437 <https://doi.org/10.1107/S1744309106021312>
- 438 Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays  
439 with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.  
440 <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- 441 Naithani, S., Komath, S. S., Nonomura, A., & Govindjee, G. (2021). Plant lectins and their  
442 many roles: Carbohydrate-binding and beyond. *Journal of Plant Physiology*, 266,  
443 153531. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153531>
- 444 Paponov, I. A., Paponov, M., Teale, W., Menges, M., Chakrabortee, S., Murray, J. A. H., &  
445 Palme, K. (2008). Comprehensive Transcriptome Analysis of Auxin Responses in  
446 Arabidopsis. *Molecular Plant*, 1(2), 321–337. <https://doi.org/10.1093/mp/ssm021>
- 447 Parida, A. K., & Das, A. B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review.  
448 *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(3), 324–349.  
449 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.06.010>
- 450 Peumans, W. J., & Van Damme, E. (1995). Lectins as Plant Defense Proteins. *Plant*  
451 *Physiology*, 109(2), 347–352. <https://doi.org/10.1104/pp.109.2.347>
- 452 Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-  
453 PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 45e – 45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- 454 Qi, J., Song, C., Wang, B., Zhou, J., Kangasjärvi, J., Zhu, J., & Gong, Z. (2018). Reactive  
455 oxygen species signaling and stomatal movement in plant responses to drought stress and  
456 pathogen attack. *Journal of Integrative Plant Biology*, 60(9), 805–826.  
457 <https://doi.org/10.1111/jipb.12654>
- 458 Ren, H., & Gray, W. M. (2015). SAUR Proteins as Effectors of Hormonal and Environmental  
459 Signals in Plant Growth. *Molecular Plant*, 8(8), 1153–1164.  
460 <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.05.003>
- 461 Roosjen, M., Paque, S., & Weijers, D. (2018). Auxin Response Factors: output control in  
462 auxin biology. *Journal of Experimental Botany*, 69(2), 179–188.  
463 <https://doi.org/10.1093/jxb/erx237>

- 464 Rüdiger, H., & Gabius, H.-J. (2001). Plant lectins : occurrence , biochemistry, functions and  
 465 applications. *Glycoconjugate Journal*, 18(8), 589–613.  
 466 <https://doi.org/10.1023/A:1020687518999>
- 467 Sagar, M., Chervin, C., Mila, I., Hao, Y., Roustan, J.-P., Benichou, M., Gibon, Y., Biais, B.,  
 468 Maury, P., Latché, A., Pech, J.-C., Bouzayen, M., & Zouine, M. (2013). SIARF4, an  
 469 Auxin Response Factor Involved in the Control of Sugar Metabolism during Tomato  
 470 Fruit Development . *Plant Physiology*, 161(3), 1362–1374.  
 471 <https://doi.org/10.1104/pp.113.213843>
- 472 Salazar-Irribé, A., & De-la-Peña, C. (2020). Auxins, the hidden player in chloroplast  
 473 development. *Plant Cell Reports*, 39(12), 1595–1608. [https://doi.org/10.1007/s00299-](https://doi.org/10.1007/s00299-020-02596-y)  
 474 [020-02596-y](https://doi.org/10.1007/s00299-020-02596-y)
- 475 Salehin, M., Bagchi, R., & Estelle, M. (2015). TIR1/AFB-Based Auxin Perception:  
 476 Mechanism and Role in Plant Growth and Development. *The Plant Cell*, 27(1), 9–19.  
 477 <https://doi.org/10.1105/tpc.114.133744>
- 478 Shen, J., Zhang, J., Zhou, M., Zhou, H., Cui, B., Gotor, C., Romero, L. C., Fu, L., Yang, J.,  
 479 Foyer, C. H., Pan, Q., Shen, W., & Xie, Y. (2020). Persulfidation-based Modification of  
 480 Cysteine Desulfhydrase and the NADPH Oxidase RBOHD Controls Guard Cell Absciscic  
 481 Acid Signaling. *The Plant Cell*, 32(4), 1000–1017. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00826>
- 482 Singh, H., Bhat, J. A., Singh, V. P., Corpas, F. J., & Yadav, S. R. (2021). Auxin metabolic  
 483 network regulates the plant response to metalloids stress. *Journal of Hazardous*  
 484 *Materials*, 405, 124250. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124250>
- 485 Szemenyei, H., Hannon, M., & Long, J. A. (2008). TOPLESS Mediates Auxin-Dependent  
 486 Transcriptional Repression During *Arabidopsis* Embryogenesis. *Science*, 319(5868),  
 487 1384–1386. <https://doi.org/10.1126/science.1151461>
- 488 Tan, X., Calderon-Villalobos, L. I. A., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C. V., Estelle, M., &  
 489 Zheng, N. (2007). Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature*,  
 490 446(7136), 640–645. <https://doi.org/10.1038/nature05731>
- 491 Tang, W., Yu, Y., & Xu, T. (2024). The interplay between extracellular and intracellular auxin

- 492 signaling in plants. *Journal of Genetics and Genomics*.  
 493 <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2024.06.019>
- 494 Tsaneva, M., & Van Damme, E. J. M. (2020). 130 years of Plant Lectin Research.  
 495 *Glycoconjugate Journal*, 37(5), 533–551. <https://doi.org/10.1007/s10719-020-09942-y>
- 496 Van Damme, E. J. M. (2022). 35 years in plant lectin research: a journey from basic science to  
 497 applications in agriculture and medicine. *Glycoconjugate Journal*, 39(1), 83–97.  
 498 <https://doi.org/10.1007/s10719-021-10015-x>
- 499 Van Holle, S., & Van Damme, E. J. M. (2019). Messages From the Past: New Insights in Plant  
 500 Lectin Evolution. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00036>
- 501 Wang, R., & Estelle, M. (2014). Diversity and specificity: auxin perception and signaling  
 502 through the TIR1/AFB pathway. *Current Opinion in Plant Biology*, 21, 51–58.  
 503 <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.06.006>
- 504 Wang, T., Ma, Y., Huang, X., Mu, T., Li, Y., Li, X., Liu, X., & Hou, B. (2021). Overexpression  
 505 of OsUGT3 enhances drought and salt tolerance through modulating ABA synthesis and  
 506 scavenging ROS in rice. *Environmental and Experimental Botany*, 192, 104653.  
 507 <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104653>
- 508 Wang, Z.-Y., Bai, M.-Y., Oh, E., & Zhu, J.-Y. (2012). Brassinosteroid Signaling Network and  
 509 Regulation of Photomorphogenesis. *Annual Review of Genetics*, 46(1), 701–724.  
 510 <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102209-163450>
- 511 Yonny, M. E., Rodríguez Torressi, A., Nazareno, M. A., & Cerutti, S. (2017). Development of  
 512 a Novel, Sensitive, Selective, and Fast Methodology to Determine Malondialdehyde in  
 513 Leaves of Melon Plants by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Tandem  
 514 Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2017, 1–9.  
 515 <https://doi.org/10.1155/2017/4327954>
- 516 Yu, J., Liu, W., Liu, J., Qin, P., & Xu, L. (2017). Auxin Control of Root Organogenesis from  
 517 Callus in Tissue Culture. *Frontiers in Plant Science*, 8.  
 518 <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01385>
- 519 Yuan, Y., Mei, L., Wu, M., Wei, W., Shan, W., Gong, Z., Zhang, Q., Yang, F., Yan, F., Zhang,

- 520 Q., Luo, Y., Xu, X., Zhang, W., Miao, M., Lu, W., Li, Z., & Deng, W. (2018). SlARF10,  
521 an auxin response factor, is involved in chlorophyll and sugar accumulation during  
522 tomato fruit development. *Journal of Experimental Botany*.  
523 <https://doi.org/10.1093/jxb/ery328>
- 524 Yuan, Y., Xu, X., Gong, Z., Tang, Y., Wu, M., Yan, F., Zhang, X., Zhang, Q., Yang, F., Hu, X.,  
525 Yang, Q., Luo, Y., Mei, L., Zhang, W., Jiang, C.-Z., Lu, W., Li, Z., & Deng, W. (2019).  
526 Auxin response factor 6A regulates photosynthesis, sugar accumulation, and fruit  
527 development in tomato. *Horticulture Research*, 6(1), 85. [https://doi.org/10.1038/s41438-](https://doi.org/10.1038/s41438-019-0167-x)  
528 [019-0167-x](https://doi.org/10.1038/s41438-019-0167-x)