

EFEITO DO AUMENTO DO COMPLEXO CLOROFILA a/b - PROTEÍNA NO  
METABOLISMO FOTOSSINTÉTICO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE  
TABACO (*Nicotiana tabacum* L., cv. SR1 PETITE HAVANA)

**MARIA JULIANA USBERTI DECICO REAL**  
Engenheira Agrônoma

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Labate

Tese apresentada à Escola Superior de  
Agricultura “Luiz de Queiroz”, da  
Universidade de São Paulo, para obtenção do  
título de Doutor em Agronomia. Área de  
Concentração: Genética e Melhoramento de  
Plantas.

Piracicaba  
Estado de São Paulo  
Janeiro de 1997

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP**

Real, Maria Juliana Usberti Decico

Efeito do aumento do complexo clorofila a/b - proteína no metabolismo fotossintético de plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L., cv SR1 Petite Havana) / Maria Juliana Usberti Decico Real. - - Piracicaba, 1997.  
150 p. : il.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1997.  
Bibliografia.

1. Fumo 2. Melhoramento genético vegetal 3. Metabolismo fotossintético 4.  
Planta transgênica I. Título

CDD 633.71

EFEITO DO AUMENTO DO COMPLEXO CLOROFILA a/b - PROTEÍNA NO  
METABOLISMO FOTOSSINTÉTICO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS  
DE TABACO (*Nicotiana tabacum* L., c.v.SR1 PETITE HAVANA)

MARIA JULIANA USBERTI DECICO REAL

Aprovada em 04.03.97

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Carlos Alberto Labate	ESALQ/USP
Profa. Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira	ESALQ/USP
Prof. Dr. Márcio de Castro Silva Filho	ESALQ/USP
Prof. Dr. Walter Handro	IB/USP
Prof. Dr. Cesar Pereira dos Santos	IQ/UFRJ



Prof. Dr. Carlos Alberto Labate

Orientador

*Ao Pedro ,  
à minha filha,  
e à minha família*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate pela orientação, apoio e amizade,

Ao Dr. Kenton Ko, do Department of Biology, Queen's University, Canadá, pela doação de sementes de plantas transgênicas, para a realização deste trabalho,

À Prof. Dra. Maria Emília Estelita do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, pela colaboração na realização deste trabalho,

À Dra. Mônica Labate pelas sugestões e apoio,

Ao Luiz Humberto Gomes pela colaboração na realização deste trabalho,

Às amigas Luciana, Thaís, Flávia e Vera, pela convivência no cotidiano do laboratório, amizade e incentivo em todos os momentos,

Aos amigos do Departamento de Genética da ESALQ/USP,

Aos professores e funcionários do Departamento de Genética da ESALQ/USP, em especial aos técnicos José Carmezini e Marcos Gorga pelo auxílio,

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO.....	xv
SUMMARY.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 O fotossistema de plantas superiores.....	4
2.2 Sistema coletor de luz.....	9
2.2.1 Composição bioquímica e organização do LHCII....	9
2.2.2 Expressão e regulação de genes das proteínas que ligam as clorofilas a/b (“chlorophyll a/b binding proteins”) do LHCII... 2.3 Fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	16
2.4 Metabolismo do carbono e fotossíntese.....	27
2.4.1 Ciclo de Calvin-Benson.....	34
2.4.2 Síntese de amido e sacarose.....	38
2.4.3 Regulação da fotossíntese por amido e sacarose.....	45
2.5 Fotossíntese e assimilação de nitrogênio.....	46
2.6 Caracterização de proteínas de reserva de semente.....	50
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
3.1 Cultivo das plantas transgênicas e selvagens.....	53
3.2 Estudo anatômico e ultra-estrutural das folhas de tabaco.....	55
3.3 Caracterização das plantas transgênicas e selvagens quanto ao potencial fotossintético.....	55

3.3.1 Análise de trocas gasosas.....	56
3.3.2 Análise de fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	60
3.3.3 Preparo do extrato foliar para determinação de metabólitos.....	63
3.3.4 Determinação de feofitina.....	64
3.3.5 Determinação do conteúdo de metabólitos do Ciclo de Calvin-Benson.....	65
3.3.5.1 Determinação do conteúdo de Ácido 3-Fosfoglicérico .....	65
3.3.5.2 Determinação do conteúdo de Triose Fosfato e Frutose 1,6 Bisfosfato.....	66
3.3.5.3 Determinação do conteúdo de Hexose Fosfato.....	66
3.3.5.4 Determinação do conteúdo de ATP e ADP..	67
3.3.6 Determinação do conteúdo de Sacarose.....	67
3.3.7 Determinação do conteúdo de Amido.....	68
3.4 Medida da atividade da enzima Sacarose-Fosfato Sintase	69
3.5 Determinação da atividade enzimática das enzimas da assimilação do nitrogênio.....	70
3.5.1 Medida da atividade da Glutamina Sintetase .....	70
3.5.2 Medida da atividade da Nitrato Redutase.....	71
3.6 Determinação do conteúdo de amido e caracterização de proteínas de reserva das sementes.....	73
3.6.1 Determinação do conteúdo de amido das sementes..	74
3.6.2 Determinação da composição e conteúdo das proteínas de reserva.....	74

3.6.2.1 Extração das proteínas de reserva das sementes.....	74
3.6.2.2 Eletroforese das proteínas de reserva em gel de poliacrilamida (PAGE).....	75
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
4.1 Estudo das características de crescimento e de morfologia das plantas transgênicas e selvagens.....	77
4.2 Caracterização das plantas transgênicas e selvagens quanto ao potencial fotossintético.....	84
4.2.1 Análise de trocas gasosas.....	84
4.2.2 Análise de fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	92
4.2.3 Conteúdo de metabólitos do Ciclo de Calvin-Benson	97
4.2.4 Conteúdo de carboidratos durante o desenvolvimento	105
4.3 Medida da atividade da enzima Sacarose-Fosfato Sintase .....	110
4.4 Medida da atividade da enzima da assimilação do nitrogênio..	112
4.4.1 Medida da atividade da Nitrato Redutase.....	112
4.4.2 Medida da atividade da Glutamina Sintetase.....	114
4.5 Determinação do conteúdo de amido e caracterização de proteínas de reserva das sementes.....	115
4.5.1 Determinação do conteúdo de amido de reserva das sementes.....	115
4.5.2 Determinação da composição e conteúdo de proteína de reserva.....	117
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS DE CONTINUIDADE.....	123
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ADP	adenosina 5-difosfato
AGPase	ADPglucose pirofosforilase
AMP	adenosina 5-monofosfato
ATP	adenosina 5-trifosfato
BSA	albumina de soro bovina
CAB	complexo clorofila a/b-proteína
DHAP	dihidroxiacetona-fosfato
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido tetra acético etilenodiamino
F6P	frutose 6-fosfato
Fru1,6bisP	frutose 1,6-bisfosfato
Fru2,6bisP	frutose 2,6-bisfosfato
Fru1,6-bisPase	frutose 1,6-bisfosfatase
Fru6P,2-Kinase	frutose 6-fosfato2-quinase
GAP-dh	gliceraldeído 3-P desidrogenase
G1P	glucose 1-fosfato
G6P	glucose 6-fosfato
GS	glutanina sintetase
Hepes	ácido N-2-hidroxietilpiperazine-N' 2-etanosulfônico
LHC	complexo coletor de luz
MES	ácido 2-(N-morfolino)etanosulfônico
Mops-NaOH	ácido 3-(morfolino)propanosulfônico

NAD <sup>+</sup>	dinucleotídeo adenina nicotinamida
NADH	dinucleotídeo adenina nicotinamida (reduzido)
NADP <sup>+</sup>	dinucleotídeo adenina fosfato nicotinamida
NADPH	dinucleotídeo adenina fosfato nicotinamida (reduzido)
NR	nitrato redutase
OAA	oxalacetato
PEP	fosfoenolpiruvato
2PGA	ácido 2-fosfoglicérico
PGA	ácido 3-fosfoglicérico
PGK	fosfoglicerato quinase
P <sub>i</sub>	ortofosfato
PMSF	fenilmetilsulfonil florido
PS	fotossistema
RUBISCO	ribulose 1,5-bisfosfato caboxilase/oxigenase
RuBP	ribulose 1,5-bisfosfato
SPS	sacarose fosfato sintase
TP	triose fosfato
Tris	2-amino 2-(hidroximetil)propano 1,3-diol
UDP	uridina 5-difosfato
UDPG	uridina 5-difosfato glucose

## LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Modelo esquemático do PSII na membrana do tilacóide. A figura apresenta as subunidades proteicas com seus nomes ou pesos moleculares (em kD). A parte central representa o heterodímero D1/D2. (esquema adaptado de Anderson & Styring, 1991)..... 7
- Figura 2.** Modelo esquemático do LHCII. O esquema apresenta a organização relativa dos complexos pigmento-proteína e as associações com o Centro de Reação (CCII). As subunidades Cp29, Cp26 e Cp24 estão representadas respectivamente pelas letras **a**, **c** e **d**, enquanto os sub-complexos LHCII são indicados como trímeros, com os pesos moleculares de suas sub-unidades (kD) (esquema adaptado de Peter & Torbner, 1991)..... 12
- Figura 3.** Diagrama esquemático da possível sequência para montagem do LHCII com o Centro de Reação. Os componentes menores estão representados pelos círculos **a**, **c**, **d** e **e**, e os componentes maiores LHC IIb estão representados como discos (esquema adaptado de Dreyfuss & Thorbner, 1994)..... 15
- Figura 4.** Definição dos coeficientes de “quenching” e das terminologias dos parâmetros característicos de fluorescência  $Q_A$  (extraído de Schreiber et al., 1986)..... 30
- Figura 5.** Esquema simplificado do Ciclo de Calvin-Benson e da síntese de amido e sacarose..... 39

<b>Figura 6.</b> Representação esquemática do gene inserido.....	53
<b>Figura 7.</b> Câmara de análise da fotossíntese acoplada ao sistema de congelamento rápido das folhas.....	58
<b>Figura 8.</b> Sistema de congelamento rápido associado ao analisador de gás infra-vermelho (IRGA) e fluorômetro, usados para medida de assimilação de CO <sub>2</sub> e fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	59
<b>Figura 9.</b> Princípios da análise de “quenching” da fluorescência da clorofila <i>a</i> pelo método dos pulsos saturantes. <b>A:</b> luz modulada para obtenção de F <sub>0</sub> ; <b>B:</b> pulso de luz saturante (aproximadamente 7500μmol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> ) para a obtenção de F <sub>M</sub> ; <b>C:</b> luz actínica contínua ligada simultaneamente com o pulso de luz saturante (a cada 30s). Dependendo das condições de luz, cinco estados diferentes são distinguidos, correspondendo a pontos característicos da produção de fluorescência e coeficientes de “quenching”. <b>Indicadores de intensidade de fluorescência:</b> F <sub>0</sub> : fluorescência mínima adaptado ao escuro; F <sub>M</sub> : Fluorescência máxima adaptado às condições de escuro; F <sub>V</sub> : Fluorescência variável máxima; F' <sub>M</sub> : fluorescência máxima em qualquer estado adaptado a luz; F <sub>S</sub> : fluorescência no estado fixo; F' <sub>V</sub> : fluorescência variável máxima em qualquer estado adaptado a luz; F' <sub>0</sub> : fluorescência mínima em qualquer estado adaptado a luz. <b>Parâmetros de fluorescência:</b> q <sub>P</sub> : “quenching” fotoquímico e q <sub>N</sub> : “quenching” não fotoquímico.....	62

- Figura 10.** Diferenças fenotípicas apresentadas por plantas selvagem **A** e transgênicas **B** (CAB-1) e **C** (CAB-2) da mesma idade, cultivadas em câmara de crescimento controlada, a  $50\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ..... 78
- Figura 11.** Cortes de secções transversais comparando a sétima folha de planta selvagem (**A**) e transgênica (**B**)..... 79
- Figura 12.** Micrografia eletrônica do tecido do mesófilo de folhas de planta selvagem (**A**) e transgênica (**B**)..... 80
- Figura 13.** Micrografia eletrônica de cloroplastos de plantas selvagem (**A**) e transgênica (**B**)..... 81
- Figura 14.** Curva de resposta da taxa de evolução de  $\text{O}_2$  em função do aumento na intensidade de luz em plantas transgênicas ( $\bullet$ ) e selvagens ( $\nabla$ ) de tabaco, cultivadas em  $50\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . A fotossíntese foi medida sob condições saturantes de  $\text{CO}_2$  (5%) a  $25^\circ\text{C}$ . Os dados são médias de 5 plantas de cada fenótipo e os desvios padrões foram inferiores a 10% da média..... 86
- Figura 15.** Curva de resposta da taxa de evolução de  $\text{O}_2$  em função do aumento na intensidade de luz em plantas transgênicas ( $\bullet$ ) e selvagens ( $\nabla$ ) de tabaco, cultivadas sob  $500\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . A fotossíntese foi medida em condições saturantes de  $\text{CO}_2$  (5%) a  $25^\circ\text{C}$ . Os dados são médias de 5 plantas de cada fenótipo e os desvios padrões foram inferiores a 10% da média..... 87

**Figura 16.** Curva de resposta dos parâmetros de fluorescência da clorofila em função de intensidade luminosa, medida em ar para plantas transgênicas (●) e selvagem (∇). **A-**  $q_P$ , **B-**  $q_N$ , **C-**  $F_V/F_M$  e **D-**  $\phi_{PSII}$ . Os dados são médias de 4 plantas de cada fenótipo e os desvios padrões foram inferiores a 5% da média..... 95

**Figura 17.** Perfil eletroforético da fração albumina mais globulina corados com solução 0,2% de “Comassie Brilliant Blue”, (A) e sua representação esquemática (B), onde T refere-se à plantas transgênicas, S à plantas selvagens e PM ao peso molecular, cujos valores aparecem em kD e O a origem da eletroforese. A seta indica a diferença encontrada entre os dois tipos de plantas: ausência da banda de 70kD na canaleta referente à planta transgênica..... 119

**Figura 18.** Perfil eletroforético da fração albumina corado pela metodologia de nitrato de prata (A) e sua representação esquemática (B), onde T refere-se à plantas transgênicas, S à plantas selvagens e PM ao peso molecular, cujos valores aparecem em kD e O indica a origem da eletroforese. A seta indica a diferença encontrada entre os dois tipos de plantas: presença da banda de 20kD na canaleta referente à planta transgênica..... 120

**Figura 19.** Perfil eletroforético da fração globulina corado pela metodologia de nitrato de prata (A) e sua representação esquemática

(B), onde T refere-se à plantas transgênicas, S à plantas selvagens e PM ao peso molecular, cujos valores aparecem em kD e O indica a origem da eletroforese..As setas indicam as diferenças encontradas entre os dois tipos de plantas: ausência das bandas de 70kD,40,7kD, 24kD e 23kD na canaleta referente à planta transgênica..... 121

**Figura 20.** Perfil eletroforético da fração glutelina corado com solução 0,2% de “Comassie Brilliant Blue” (A) e sua representação esquemática (B), onde T refere-se à plantas transgênicas, S à plantas selvagens e PM ao peso molecular, cujos valores aparecem em kD e O indica a origem da eletroforese. As setas indicam as diferenças encontradas entre os dois tipos de plantas:a presença de uma banda de 56,5kD e a ausência de duas bandas de peso e stimado em 27kD e 17,4kD na canaleta refernte à planta transgênica..... 122

## LISTA DE TABELAS

Página

<p><b>Tabela 1:</b> Taxa de fotossíntese (<math>\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}</math>) de plantas transgênicas e selvagens de tabaco, cultivadas em <math>50\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}</math>, medidas em concentração atmosférica de <math>\text{CO}_2</math>, 850, e 2000ppm de <math>\text{CO}_2</math>, e temperatura foliar de <math>25^\circ\text{C}</math>. Os dados são médias de 10 plantas de cada fenótipo nas condição de <math>100\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}</math> e de 8 plantas para intensidade de <math>1000\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}</math>.....</p>	89
<p><b>Tabela 2:</b> Taxa de fotossíntese (<math>\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}</math>) de plantas transgênicas e selvagens de tabaco, cultivadas em <math>500\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}</math>, medidas em concentração atmosférica de <math>\text{CO}_2</math>, e 850ppm de <math>\text{CO}_2</math>, e temperatura foliar de <math>25^\circ\text{C}</math>. Os dados são médias de 10 plantas de cada fenótipo nas condição de <math>100\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}</math> e de 8 plantas para intensidade de <math>1000\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}</math>.....</p>	90
<p><b>Tabela 3.</b> Taxas fotossintéticas de plantas de tabaco selvagem e transgênicas (adaptado de Flachmann &amp; Kühlbrandt, 1995).....</p>	92
<p><b>Tabela 4:</b> Valores de PGA, TP (<math>\mu\text{mol.mg}^{-1}\text{Chl}</math>) e PGA/TP, para tabaco, espinafre e cevada, medidos em intensidade de luz de <math>1000\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}</math> e temperatura de <math>25^\circ\text{C}</math> (dados extraídos de Labate &amp; Leegood, 1990; Neuhaus et al., 1990; Stitt et al., 1990).....</p>	97
<p><b>Tabela 5:</b> Conteúdo de metabólito em plantas cultivadas em <math>50\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}</math>. Os dados são médias de 6 plantas <math>\pm</math> desvio padrão,</p>	

onde TR corresponde as plantas transgênicas e S as selvagens.....	98
<b>Tabela 6:</b> Conteúdo de metabólito em plantas cultivadas em $500\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Os dados são médias de 6 plantas $\pm$ desvio padrão, onde TR corresponde as plantas transgênicas e S as selvagens.....	102
<b>Tabela 7A:</b> Conteúdo de amido e sacarose em folhas jovens. Os dados representam médias de 4 plantas $\pm$ desvio padrão em $\mu\text{mol}$ hexoses equivalentes. $\text{mg}^{-1}\text{chl}$ .....	107
<b>Tabela 7B:</b> Conteúdo de amido e sacarose em folhas desenvolvidas. Os dados representam médias de 4 plantas $\pm$ desvio padrão em $\mu\text{mol}$ hexoses equivalentes. $\text{mg}^{-1}\text{chl}$ .....	107
<b>Tabela 8:</b> Atividade da enzima SPS de plantas transgênicas e selvagens cultivadas em $50\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Os dados são médias de 4 experimentos com 4 plantas de cada fenótipo por experimento, onde -F6P e -UDPG referem-se às condições limitantes para estes metabólitos.....	111
<b>Tabela 9:</b> Atividade da enzima Nitrato Redutase, em presença de $\text{Mg}^{+2}$ e na ausência de $\text{Mg}^{+2}$ (+EDTA) em $\text{U.mg}^{-1}\text{chl}$ . Os dados são médias de 5 experimentos com 4 plantas de cada tipo por experimento.....	113
<b>Tabela 10:</b> Atividade da enzima Glutamina Sintetase. Os dados são médias de sete experimentos com 4 plantas de cada fenótipo, para cada experimento.....	115

# EFEITO DO AUMENTO DO COMPLEXO CLOROFILA a/b - PROTEÍNA NO METABOLISMO FOTOSSINTÉTICO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE TABACO (*Nicotiana tabacum* L., cv SR1 PETITE HAVANA).

Autor: Maria Juliana Usberti Decico Real

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Labate

## Resumo

O complexo clorofila a/b - proteína (Cab) é o principal componente do sistema coletor de luz (“light harvesting complex” - LHC) presente nas membranas dos tilacóides de plantas superiores e algas, atuando como antena nos fotossistema I e fotossistema II, sendo portanto importante na captação de luz para a fotossíntese. A obtenção de plantas transgênicas com maior conteúdo de LHCII é uma alternativa para aumentar a eficiência de absorção de luz em ambientes sombreados. O objetivo do presente trabalho foi a caracterização do potencial fotossintético de plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) apresentando conteúdo de duas a três vezes maior de mRNA Cab e de proteínas CAB, que o nível endógeno. Esta análise foi feita através da comparação de diferentes parâmetros fisiológicos e metabólitos entre plantas transgênicas e selvagens, quando expostas a diferentes intensidades luminosas. Foi verificado também se as plantas transgênicas apresentavam outras alterações, além da capacidade fotossintética, e para isso foram estudados a morfologia e anatomia foliar e o conteúdo de amido e de proteínas de reserva das sementes

A capacidade fotossintética das plantas cultivadas em câmara de crescimento controlado em baixa ( $50\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) e média ( $500\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) irradiância foi estudada usando-se um sistema de congelamento rápido, onde as folhas foram submetidas a diferentes intensidades luminosas, concentrações de  $\text{CO}_2$  e temperaturas. O sistema estava acoplado a um fluorímetro e a um analisador de gás infravermelho, que além de permitir a medida de absorção de  $\text{CO}_2$  e fluorescência da clorofila  $a$ , possibilitou também que as folhas fossem

congeladas em nitrogênio líquido para a extração de metabólitos do Ciclo de Calvin-Benson, carboidratos e enzimas, como a Sacarose-Fosfato Sintase (SPS) e as da assimilação de nitrogênio: Glutamina Sintetase (GS) e Nitrato Redutase (NR). Foi verificado também se as plantas transgênicas apresentavam outras alterações, além da capacidade fotossintética e para isso foram estudados a morfologia, anatomia foliar e o conteúdo de amido e de proteínas de reserva das sementes.

Os resultados da análise morfológica e da anatomia foliar mostraram que as plantas transgênicas possuem espaços intercelulares maiores, maior número de cloroplastos por célula, além de folhas mais largas e maior biomassa. Quanto à capacidade fotossintética, as plantas transgênicas apresentaram uma maior taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> em relação às selvagens, em condições limitantes de luz, bem como uma maior eficiência quântica do transporte de elétrons do PSII ( $\phi_{PSII}$ ), e um aumento em cerca de duas vezes da síntese de carboidratos. A análise de metabólitos mostrou um aumento da capacidade das plantas transgênicas em gerar ATP e reduzir PGA em condições de baixa intensidade luminosa. Em alta intensidade luminosa as plantas transgênicas mostraram uma menor capacidade fotossintética, sendo que a principal limitação destas plantas nestas condições parece ser a capacidade de síntese de produto final em uma velocidade capaz de reciclar P<sub>i</sub>, compatível com o aumento de transporte de elétrons. Os resultados da análise das proteínas de reserva mostraram diferenças no padrão de bandas principalmente na fração albumina e globulina e também glutelinas, das plantas transgênicas em relação às selvagens. Quanto ao conteúdo de amido, este foi 72% maior nas sementes de plantas transgênicas, sugerindo que o aumento do conteúdo das proteínas Lhcb1\*2 nestas plantas induziu mudanças no conteúdo de amido e padrão de proteínas de reserva das sementes.

# EFFECTS OF THE INCREASE OF CHLOROPHYLL a/b BINDING PROTEIN IN THE PHOTOSYNTHETIC METABOLISM OF TRANSGENIC TOBACCO PLANTS (*Nicotiana tabacum* L., cv SR1 PETITE HAVANA).

Author: Maria Juliana Usberti Decico Real

Advisor: Prof. Dr. Carlos Alberto Labate

## Summary

The light harvesting complex (LHC) is the main chlorophyll a/b binding protein complex of the thylakoid membrane in plants and green algae. LHCII acts as an antenna system to photosystem I and photosystem II and plays a key role in harvesting light for photosynthesis. Transgenic tobacco plants with higher content of LHCII is an alternative to increase the efficiency of light absorption in shaded environment. The aim of this project was to investigate whether transgenic plants of tobacco which have two-three fold higher content of *cab* mRNA and CAB protein showed alterations in the photosynthetic metabolism, leaf anatomy and morphology, seed storage protein and starch content in relation to wild type, when exposed to different light intensities.

The measurements of the rate of CO<sub>2</sub> assimilation and chlorophyll *a* fluorescence of plants grown in low (50 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) and medium light (500 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) were made in an open gas-exchange system, using an infra-red gas analyser and a pulse amplitude modulation fluorometer. The leaf chamber was specially designed to allow leaf discs to be punched out and quickly frozen. The frozen leaf samples were used for the extraction of Calvin-Benson Cycle metabolites, carbohydrates and enzymes like Sucrose-Phosphate Synthase (SPS) and of nitrogen assimilation: Syntase Glutamine (GS) and Reductase Nitrate (NR).

The anatomic and morphological analysis showed that transgenic plants had broad leaves with relative larger intercellular spaces, more chloroplasts per cell and higher biomass. The studies of photosynthetic capacity showed that transgenic plants had an increased photosynthetic rate in limiting light conditions, and increased efficiency of quantum efficiency of photosystem II electron transport ( $\phi$ PSII), and a two fold increase in carbohydrate synthesis. The metabolic analyses revealed an increased capacity of the transgenic plants to regenerate ATP and reduce PGA in low light. In high light the transgenic plants had a lower photosynthetic rate, and the main limitation was the capacity of end product synthesis to recycle inorganic phosphate fast enough to match the increased capacity of electron transport. Electrophoretic analysis of seed storage proteins and starch showed differences in isozyme pattern specially in the albumin and globulin fraction of the transgenic plants in relation to wild type, besides a 72% increase in starch content in transgenic tobacco seeds. So, the elevation of CAB protein levels resulted in several important related morphological, biochemical and physiological alterations.

## 1. INTRODUÇÃO

Desde o início dos trabalhos de melhoramento genético, procura-se plantas que se adaptem às condições adversas de cultivo, entre elas a tolerância à baixa luminosidade, característica importante para culturas usadas em cultivo consorciado, bem como para algumas ornamentais e hortícolas. Um dos mecanismos possíveis para o aumento de produtividade destas plantas, seria um aumento na capacidade de absorção de luz em condições limitantes e consequente síntese de açúcares, como amido e sacarose, que pode ser conseguido pelo aumento da área foliar, ou pelo aumento da concentração dos sistemas coletores de luz nos cloroplastos.

Os componentes dos sistemas fotossintéticos, associados às membranas dos cloroplastos, podem ser divididos em quatro grupos: 1) os complexos coletores de luz (“light harvesting complex” - LHC), formados pela associação de proteínas e diversos pigmentos, como clorofila, responsáveis pela absorção e transferência de energia luminosa aos centros de reação fotossintética; 2) centros de reação, formados por um conjunto de polipeptídeos e clorofila que criam um ambiente especializado para que ocorra a quebra da molécula de água e consequente liberação de elétrons; 3) transportadores de elétrons, formados por diferentes associações de apoproteínas que promovem o transporte vetorial de elétrons nas membranas do tilacóide, resultando na formação do agente redutor NADPH e de um potencial eletroquímico necessário à síntese de ATP; 4)

conjunto de polipeptídeos que formam a enzima ATPase, responsável pela síntese de ATP durante o transporte de elétrons. Destes quatro componentes descritos, o LHC é o principal complexo de proteínas que ligam a clorofila *a/b* (CAB: “chlorophyll *a/b* binding proteins”) da membrana dos tilacóides, de plantas superiores e algas.

Este sistema de coleta e transferência de energia luminosa envolve uma série de genes, cujo modelo de herança e herdabilidade são ainda pouco conhecidos, o que torna difícil a obtenção de plantas com maior conteúdo destes componentes pelos métodos convencionais de seleção e melhoramento. A obtenção de plantas transgênicas que apresentem uma maior quantidade específica de um determinado componente, como o LHC II (os complexos coletores de luz do fotossistema II), apresenta-se como uma alternativa para aumentar a eficiência de absorção de luz em condições limitantes.

Ko et al. (1992), obtiveram plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) com nível do complexo protéico coletor de luz LHC II duas a três vezes maior que o nível endógeno. Foi verificado que tanto os transformantes primários, como as progênies apresentavam diferenças no crescimento quando comparadas ao controle. As plantas transgênicas eram mais vigorosas que as selvagens (controle) em regime de baixa luminosidade, apresentavam também folhas maiores e atingiam altura final duas vezes maior. Como resultado destas diferenças de crescimento, as plantas transgênicas apresentavam um florescimento tardio em relação à selvagem. Estas plantas apresentaram também mais clorofila (mg) por peso fresco em relação às plantas selvagens. A partir destes resultados verificou-se que estas plantas representariam um excelente sistema modelo para se estudar os efeitos do aumento da capacidade de absorção de luz sobre o metabolismo fotossintético e suas implicações na produtividade final das plantas.

O objetivo do presente trabalho foi a caracterização das plantas transgênicas de tabaco quanto ao potencial fotossintético, através da comparação de diversos parâmetros fisiológicos e metabólicos entre plantas transgênicas e selvagens, quando expostas a diferentes intensidades luminosas. Este estudo iniciou-se com a análise do desempenho fotossintético, em condições de CO<sub>2</sub> atmosférico e também alta concentração de CO<sub>2</sub>, evolução de O<sub>2</sub> e fluorescência da clorofila *a*, das plantas transgênicas e selvagens quando crescidas em baixa (50 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) e média (500 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) irradiância. Em seguida foram analisados os metabólitos relacionados ao ciclo de Calvin-Benson, bem como à síntese de açúcares: sacarose e amido, produtos finais da fotossíntese. Foram também analisadas a atividade de algumas enzimas importantes para o metabolismo fotossintético e de assimilação do nitrogênio, cujo processo de regulação está ligado à fotossíntese: Sacarose Fosfato Sintase (SPS), Glutamina Sintetase e Nitrato Redutase e para verificar se as plantas transgênicas apresentavam outras alterações, foram estudados o conteúdo de amido e de proteínas de reserva das sementes .

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. O FOTOSISTEMA DE PLANTAS SUPERIORES

A conversão da energia solar para energia química durante a fotossíntese é um evento de membrana, e os componentes envolvidos na captação da luz, transporte de elétrons e reações enzimáticas, necessárias para produção de compostos ricos em energia (ATP e NADPH), estão todos associados às membranas dos tilacóides nos cloroplastos. Estas membranas dos tilacóides apresentam um alto grau de organização, formando uma rede contínua de membranas únicas não sobrepostas, pareadas com membranas empilhadas dos grana (Anderson & Styring, 1991). A maioria das proteínas do tilacóide estão arranjadas em quatro complexos supramoleculares: fotossistema I, fotossistema II, citocromo *b/f*, e ATP sintase, sendo que estes complexos apresentam uma assimetria definida ao longo da membrana para realizar adequadamente o transporte de elétrons e prótons através da membrana.

Segundo Cogdell (1983), somente nas últimas décadas começaram a surgir modelos da estrutura dos fotossistemas. O melhor modelo parece ser o formado por uma região central “core”, onde ocorrem as reações fotoquímicas, envolvida por um complexo pigmento-proteína, formando antenas específicas. Cada fotossistema tem seu próprio complexo de antena que absorve luz em diferentes comprimentos de onda e ambos, PSI e PSII, são essenciais para a fotossíntese. A maioria dos pigmentos que absorve luz, na fotossíntese, serve

somente para coletá-la, sendo que os excitons são transferidos para os centros de reação. Este centro de reação é eletronicamente excitado pela transferência de energia do sistema de antena e cataliza as primeiras reações fotoquímicas. Como resultado, a energia solar é transformada em energia química.

A eficiência da fotossíntese é diminuída com luz de comprimentos de onda maior que 680nm mesmo que algumas moléculas de clorofila da membrana dos tilacóides absorvam luz em 700nm. De acordo com o “efeito Emerson”, uma combinação de luz de 600 e 700nm consegue aumentar a taxa de fotossíntese mais que a soma das taxas dos dois comprimentos separados. Com isso concluiu-se que em plantas, a fotossíntese envolve a interação de dois centros de absorção de luz separados: o fotossistema I (PSI) e o fotossistema II (PSII), onde o PSI recebe luz de comprimento de onda de 700nm ou menos e o PSII apenas de comprimento menor que 680nm (Cogdell, 1983)

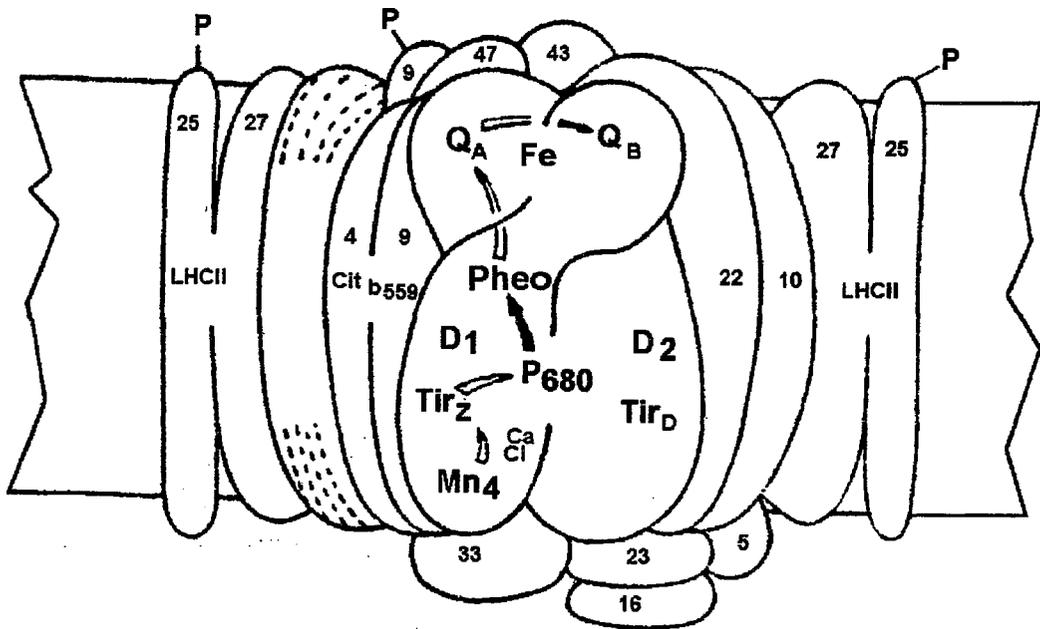
Os dois fotossistemas são estruturalmente distintos, cada um é um complexo de muitas moléculas de clorofila, carotenóides, citocromos e outras proteínas para transporte de elétrons, que possuem orientação específica nas membranas dos tilacóides. O PSII está localizado preferencialmente nas membranas empilhadas dos grana e o PSI nas membranas não condensadas dos tilacóides. Esta separação espacial dos dois complexos é um ponto crítico, devido a transferência de elétrons do PSII ao PSI durante a fotossíntese, onde o complexo proteico citocromo *b/f*, encontrado tanto na região condensada como não condensada das membranas dos tilacóides, é usado para a transferência de elétrons entre os dois fotossistemas. Cada fotossistema contém centenas de moléculas de clorofila no entanto, somente duas moléculas especializadas de clorofila  $\alpha$ , dos centros de reação, são capazes de dirigir através da luz, a transferência de elétrons em cada complexo (Ghanotakis & Yocum, 1990; Anderson & Styring, 1991).

No fotossistema I o complexo proteína-clorofila *a* é denominado P700 e é formado por dois polipeptídeos maiores, cujo peso molecular varia nos diferentes organismos fotossintéticos. Por exemplo, em ervilha é de 68kD e 66kD, 64kD e 49kD para *Clamidomonas reinhardi*, e 52kD e 46kD para *Anabena flos-aquae* (Codgel, 1983). Sabe-se que esses dois polipeptídeos formam o “core” do fotossistema I mas, o complexo contém outros inúmeros polipeptídeos adicionais.

O fotossistema II é atualmente um dos complexos mais bem caracterizados de proteína de membrana (Ghanotakis & Yocum, 1990; Anderson & Styring, 1991) e é responsável não apenas pela captação de luz e separação de cargas, mas também cria força redutora pela sua capacidade de oxidar a água. É responsável por muitos dos mecanismos de adaptação e proteção do aparato fotossintético em resposta às variações das condições ambientais, cujas respostas envolvem rearranjo das membranas dos tilacóides.

A estrutura do fotossistema II é formada por um complexo multiproteico, de no mínimo 20 polipeptídeos, incluindo sub-unidades estruturais, catalíticas e regulatórias, bem como muitas proteínas ligadas à clorofila, sendo produto de dois genomas, pois contém sub-unidades codificadas pelo cloroplasto e pelo núcleo. O centro de reação do PSII, denominado P680, é formado de um heterodímero de duas proteínas integrais de membrana, denominadas D1 e D2. A subunidade D1 é produto do gene *psbA* do cloroplasto, é rapidamente sintetizada na luz e possui um peso molecular de 32kD. A subunidade D2 é produto do gene cloroplastidial *psbD*, possui peso molecular de 32kD e como a proteína D1, é altamente conservada entre as espécies. O heterodímero D1/D2 contém todos os componentes redox necessários para as reações fotoquímicas primárias como os “clusters” de manganês, catalizando a fotooxidação da água e estão ligados às quinonas  $Q_A$  e  $Q_B$ , que funcionam na reação de estabilização de cargas, no lado

reductor do PSII (Ghanotakis & Yocum, 1990; Anderson & Styring, 1991; Christopher & Mullet, 1994). Um modelo esquemático do PSII na membrana do tilacóide pode ser visto na Figura 1.



**Figura 1.** Modelo esquemático do PSII na membrana do tilacóide. A figura apresenta as subunidades proteicas com seus nomes ou pesos moleculares (em kD). A parte central representa o heterodímero D1/D2. (esquema adaptado de Anderson & Styring, 1991).

Além do heterodímero D1/D2, outras proteínas fazem parte da estrutura do PSII, como o citocromo *b559*, as proteínas intrínsecas de 47 e 43kD e as extrínsecas de 33, 23 e 16kD. Apesar do citocromo *b559* ter sido uma das primeiras proteínas identificadas no PSII, sua função ainda não está bem definida e não está envolvido na via principal do transporte de elétrons. Ele é composto de dois polipeptídeos de 9 e 4 kD codificados pelos genes cloroplastidial *psbE* e *psbF*, respectivamente. As proteínas extrínsecas de 33, 23 e 16kD são codificadas por genes nucleares, estão localizadas na superfície da membrana interna do tilacóide, e estão envolvidas nas reações de evolução de oxigênio, não estão ligadas ao manganês ou outro composto redox, sendo bastante hidrofílicas (Ghanotakis & Yocum, 1990; Anderson & Styring, 1991; Christopher & Mullet, 1994).

Também foram identificados polipeptídeos de 22 e 10kD, cuja função ainda não está bem estabelecida. Há evidências de que a proteína de 10kD seja responsável pela ligação da proteína 23kD à superfície da membrana interna do tilacóide. Estudos recentes (Funk et al., 1994) sugerem que a proteína 22kD pode ligar clorofila *a* e *b* e pode ser então uma proteína que liga pigmento associada ao PSII, mas isto ainda precisa ser melhor esclarecido.

As proteínas intrínsecas de 47 e 43KD são conhecidas como CP47 e CP43, são codificadas por genes cloroplastidiais, *psbB* e *psbC* e ligam de 20 a 25 moléculas de clorofila *a* cada um ao “core” do PSII, participando então na captação de luz e transferência de energia ao centro de reação. Também, ligam  $\beta$ -caroteno e contém luteína cuja presença foi confirmada pela análise de preparações do “core” do PSII a partir de gradiente de sacarose (Anderson & Styring, 199; Bassi et al., 1993; Christopher & Mullet, 1994)

## **2.2 SISTEMA COLETOR DE LUZ**

O sistema coletor de luz do complexo clorofila *a/b* - proteína, designado LHCII, é o maior componente da membrana do tilacóide, sendo responsável por metade de sua clorofila e massa proteica (Andersson & Styring, 1991; Peter & Thornber, 1991; Green et al., 1991). É o principal componente da antena coletora de luz do PSII e, além dessa função, também regula a transferência de energia de excitação aos centros de reação do fotossistema II, dependendo da fosforilação da apoproteína LHC. Este complexo provavelmente também interfere nas interações das membranas dos tilacóides que levam à formação de pilhas de vesículas sobrepostas de membranas, ou seja, os grana dos cloroplastos (Kuhlbrandt, 1984)

O LHCII foi descoberto na década de 60 e aparecia como uma banda verde em eletroforese suave de gel de acrilamida com SDS (SDS-PAGE) e foi a base experimental para a descoberta das associações proteínas-clorofilas (Andersson & Styring, 1991). Foram inicialmente denominados de CPII e considerados como uma entidade funcional do PSII. No entanto, com a descoberta de que não possuíam atividade de transporte de elétrons e que plantas sem CPII mantinham atividade fotossintética normal, este complexo foi reconhecido como sendo somente coletor de luz e recebeu o nome de LHCII. Atualmente é o componente mais estudado do fotossistema II.

### **2.2.1 Composição bioquímica e organização do LHCII**

Em plantas superiores e algas verdes já foram identificados pelo menos três complexos distintos menores de pigmento-proteína, denominados Cp29, Cp26 e Cp24 e um sub-complexo LHCII, que formam o LCHII completo.

Este sub-complexo, inicialmente denominado CP II, é o componente mais abundante e mais estudado, sendo codificado por uma família de multigenes nucleares. Ele contém metade das clorofilas presentes nos tilacóides: 13 a 15 moléculas de clorofila associadas à cada cadeia polipeptídica, podendo ser isolado como um complexo oligomérico pigmento-proteína, provavelmente um trimérico, apresentando uma relação clorofila *a/b* de 1,0 a 1,33 (Peter & Thorbner, 1991) e uma razão clorofila/carotenóide de 5-6. Portanto, sua composição mais provável de pigmentos é: 8 moléculas de clorofila *a*, 6 de clorofila *b*, 2 de luteínas e 1 de neoxantina. Segundo Bassi et al. (1993), o sub-complexo não contém  $\beta$ -caroteno, mas contém baixos níveis de violaxantina.

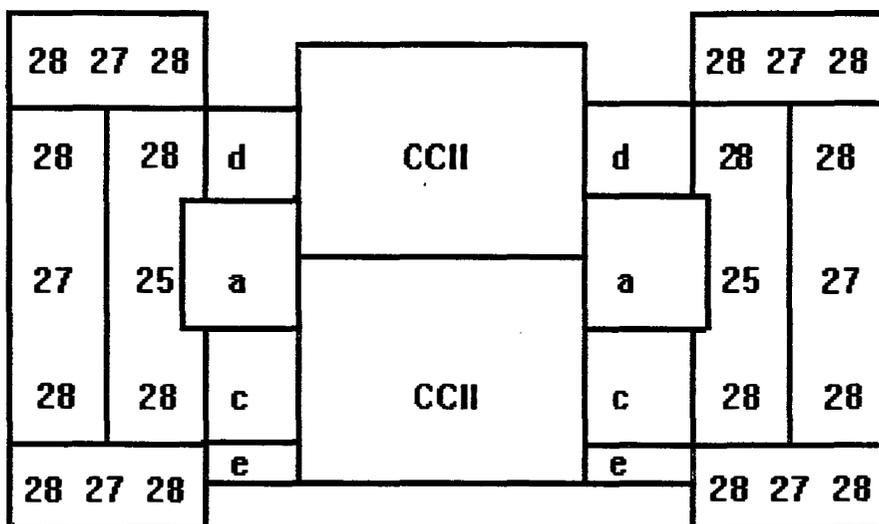
Quanto às sub-unidades proteicas, o sub-complexo apresenta no mínimo três subunidades de peso molecular de 28000, 27000 e 25000, com uma estequiometria de  $8 \pm 2:3 \pm 1:1$ , de acordo com Peter & Thorbner (1991). As subunidades contém sequências comuns e divergentes e algumas podem ser reversivelmente fosforiladas.

Os outros componentes do LHC II, ou seja, os complexos menores apresentam diferentes relações de clorofila *a/b* e diferentes apoproteínas, como também maior conteúdo de carotenóides relativo ao total de clorofila (Peter & Thorbner, 1991; Bassi et al., 1993). Cp29 apresenta uma maior relação clorofila *a/b*: 2,5 a 3,5 e subunidades proteicas de peso molecular maior, entre 29000 e 31000 e 2 a 3 carotenóides; Cp24 apresenta relação clorofila *a/b*: 0,8 a 1,0 e subunidades proteicas menores: 21000 e 1 a 2 carotenóides. Nenhum deles pode ser fosforilado. Há um terceiro complexo Cp26, que é semelhante em tamanho ao subcomplexo principal, mas apresenta distinta composição de apoproteínas e de pigmentos: 6 moléculas de clorofila *a*, 3 de clorofila *b*, e 3 de carotenóides por molécula. Ainda é desconhecido se estes componentes estão organizados em um ou vários complexos e o modo pelo qual estão associados ao centro de reação

para formar o fotossistema II completo. Sabe-se somente que o Cp29 está diretamente ligado ao centro de reação.

Para determinar como as subunidades do LHCII estão arranjasdas uma em relação à outra e em relação ao centro de reação do PSII, foram isolados e caracterizados os sub-complexos do PSII, os sub-complexos multiméricos do LHCII e o complexo proteína-pigmento do LHCII de cevada sem clorofila *b* (Peter & Thorbner,1991). A análise dos sub-complexos PSII mostrou que as subunidades do LHCII estão associadas apenas com a forma dimérica do centro de reação, cuja força de associação, em ordem decrescente é: Cp29 > Cp26 > sub-unidade 28000 > sub-unidade 27000 > sub-unidade 25000 > Cp24. A estequiometria das subunidades do LHCII e do Centro de Reação II neste sub-complexo PSII está de acordo com a noção de que cada unidade do Centro de Reação está ligada a subunidades do LHCII. Segundo os autores, a obtenção de um complexo multimérico de peso molecular 110000D composto de Cp29, Cp24 e da forma trimérica do sub-complexo LHCII formado das subunidades 28000D (duas) e 25000D (uma), que está fortemente ligados ao Centro de Reação, sugere que este complexo de 110000 tem a função de ligar o sub-complexo principal LHCII ao centro de reação.

O modelo proposto pelos autores então é o seguinte: os complexos menores, Cp 29 (LHCIIa), Cp26 (LHCIIc) e Cp24 (LHCII d), estão muito perto do centro de reação e ligam diferentes sub-complexos LCHII, compostos de uma sub-unidade de 25000 e duas de 28000. O sub-complexo LHCII que contém apenas as sub-unidades 27000 e 28000 estão localizados mais distantes do centro de reação e são as sub-unidades mais fortemente fosforiladas. A sub-unidade Cp29 é a mais fortemente ligada ao centro de reação, sendo a mais fracamente fosforilada. Este modelo é esquematizado na Figura 2.



**Figura 2.** Modelo esquemático do LHCII. O esquema apresenta a organização relativa dos complexos pigmento-proteína e as associações com o Centro de Reação (CCII). As subunidades Cp29, Cp26 e Cp24 estão representadas respectivamente pelas letras **a**, **c** e **d**, enquanto os sub-complexos LHCII são indicados como trímeros, com os pesos moleculares de suas sub-unidades (kD) (esquema adaptado de Peter & Torbner, 1991)

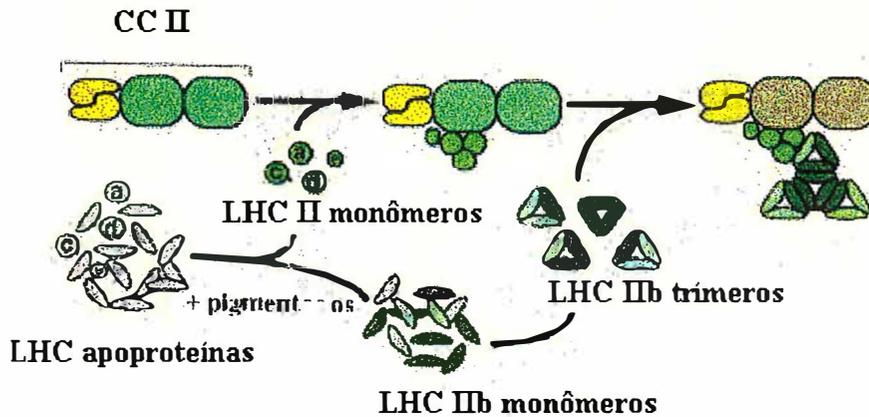
A montagem do LHCII também necessita de aproximadamente 7 moléculas de clorofila *a*, 6 de clorofila *b*, 2 de luteína, violaxantina e neoxantina (Kühlbrandt et al., 1994). O mecanismo que coordena

esta síntese e acumulação é bastante complexo. Sabe-se no entanto que nem clorofila nem xantofilas seriam necessárias para a síntese de LHCII, mas os pigmentos ligantes, principalmente a clorofila *b*, seriam responsáveis pela estabilização das apoproteínas e montagem do complexo (Plumley & Schmidt, 1995). Análises de *Chlamydomonas* mutantes nuclear incapazes de sintetizar clorofilas ou xantofilas, revelaram que: as proteínas LHCII tem um papel importante na síntese dos pigmentos, sendo que a síntese e acumulação de neoxantina estão ligadas aos passos finais de integração das proteínas LHCII no tilacóide e mutantes deficientes na síntese de clorofila *b*, apresentaram inserção incorreta destas proteínas no tilacóide, indicando que a biogênese do LHCII inclui eventos interdependentes de síntese e montagem dos pigmentos, que ocorre durante a integração das proteínas nas membranas do tilacóide.

As análises da estrutura tri-dimensional do complexo LHCII de ervilha (Kühlbrandt, 1984) por microscopia eletrônica de cristais de duas dimensões e análise de imagens também sugere que o complexo LCHII é uma proteína transmembranosa altamente assimétrica formada por três monômeros idênticos ou quase idênticos. Um efeito da assimetria é a grande diferença entre as áreas expostas de ambos os lados, sendo que a área exposta do lado superior é cerca de três a quatro vezes maior que a inferior, sugerindo que a parte superior da molécula tem uma função na interação com a membrana. Várias outras espécies foram estudadas e foi observado que o complexo LHCII apresentava propriedades e arranjo cristalino similares ao descrito para ervilha, sugerindo que este modelo pode ser válido para a principal proteína da antena de todas as plantas verdes. Estudos mais detalhados da estrutura tri-dimensional do complexo coletor de luz em plantas, determinada por cristalografia eletrônica (Kühlbrandt & Weng, 1991; Kühlbrandt et al., 1994), mostrou que cada monômero contém três hélices transmembranadas denominadas de A, B e C e 15

moléculas de clorofila. Elas são mantidas unidas por pares de íons formados por resíduos de cargas que também ligam as clorofilas e esta estrutura é bastante conservada no reino vegetal. As hélices A e B são invariáveis quanto ao conteúdo de clorofila *b* da antena e estas duas hélices juntamente com 6 moléculas de clorofila *a* e 2 de xantofilas representam o “core” do complexo. Nesta região central, a clorofila *a* está muito perto da clorofila *b*, para permitir a transferência rápida de energia e os dois carotenóides tem função de fotoproteção. A hélice C e a volta na superfície da membrana apresenta maior variabilidade dentro da família das proteínas CAB (Kühlbrandt et al., 1994). Este modelo atômico é o mais atual e foi determinado com uma resolução de 3,4 Å.

Como dito anteriormente, os polipeptídeos que formam o LHCII são codificados por famílias de multigenes nucleares, os genes *cab* (“chlorophyll a/b binding proteins”) ou *Lhc*, como são denominados atualmente (Jansson et al., 1992) e portanto a biogênese deste complexo envolve diferentes compartimentos celulares (Cashmore, 1984; Kuttkat et al., 1995). A apoproteína LHC é codificada no núcleo e transcrita por ribossomos do citoplasma em uma forma precursora. Esta proteína precursora é transportada através da membrana externa e interna do cloroplasto e o peptídeo transitório ligado ao terminal amino deste precursor, facilita este transporte. Durante ou após a translocação, este precursor é clivado proteoliticamente para originar o polipeptídeo maduro que é inserido na membrana do tilacóide, onde vai se associar com as clorofilas *a* e *b* e xantofilas. Finalmente, os complexos monoméricos proteína-pigmento formam trímeros e são reunidos no fotossistema II. O mesmo procedimento ocorre para o fotossistema I. Muitos destes passos podem ser estudados em sistemas *in vitro*, facilitando a análise dos eventos moleculares envolvidos. Um diagrama da biogênese do LHCII pode ser visto na Figura 3.



**Figura 3.** Diagrama esquemático da possível sequência para montagem do LHCII com o Centro de Reação. Os componentes menores estão representados pelos círculos **a**, **c**, **d** e **e** e os componentes maiores LHC IIb estão representados como discos (esquema adaptado de Dreyfuss & Thorbner, 1994)

Recentemente Li et al. (1995) apresentaram evidências que a inserção da proteína na membrana do tilacóide é dependente de um análogo cloroplastidial da partícula de 54kD de reconhecimento de sinal de mamíferos e pode estar mecanicamente relacionada aos processos de translocações mediados por partículas de reconhecimento de sinal de outros organismos. A etapa que permanece como maior enigma é o mecanismo pelo qual os pigmentos são ligados às proteínas, provavelmente após sua inserção na membrana e antes de formar trímeros. Kuttkat et al. (1995), estudando as características de resistência a proteases e de migração em gel de subunidades monoméricas e de trímeros do LHCII, sugerem que pelo menos uma parte das proteínas LHC, inseridas em tilacóides isolados, é complexada com pigmentos e então organizada na forma trimérica do LHCII.

### **2.2.2 Expressão e regulação de genes das proteínas que ligam as clorofilas a/b (“chlorophyll a/b binding proteins”) do LHCII.**

Conforme discutido anteriormente, os sistemas coletores de luz (LHC) são compostos de clorofila *a* e *b* e de proteínas que ligam as clorofilas, além de outros pigmentos. Estas proteínas são sintetizadas no citoplasma e, em plantas superiores, bem como algas verdes e musgos (Long et al., 1989) são codificadas por famílias de multigenes nucleares. Membros desta família já foram isolados e sequenciados para várias espécies como ervilha, petúnia, trigo, tomate, *Lemna gibba*, tabaco, *Nicotiana plumbaginifolia*, soja, entre outras (Coruzzi et al., 1983; Cashmore, 1984; Pichersky et al., 1985; Jansson et al., 1992). Com a proliferação do sequenciamento foi possível confirmar pelo menos 10 diferentes tipos de proteínas CAB para angiospermas e gimnospermas. A partir da sequência primária das proteínas, foi possível correlacionar, em diferentes sistemas de géis, cada gene a uma proteína específica na antena. Quatro tipos distintos de proteínas CAB foram identificadas para o LHCI e seus genes foram designados *Lhca1* a *Lhca4*. Para o LHCII, foram encontrados três tipos de proteínas para o sub-complexo maior e seus genes são denominados: *Lhcb1*, *Lhcb2* e *Lhcb3*, correspondendo aos polipeptídeos Tipo I, Tipo II e Tipo III do LHCII. Os genes do tipo I não contém introns e têm um alto grau de homologia; enquanto os do tipo II e III contém introns e codificam proteínas com maiores divergências. Os genes *Lhcb4*, *Lhcb5* e *Lhcb6* codificam os componentes menores do fotossistema II: Cp29, Cp26 e Cp24 e, esta ordem, reflete a mobilidade relativa destas proteínas em diferentes sistemas de géis (Jansson, 1992).

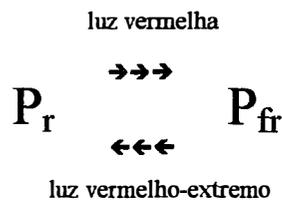
A caracterização destes genes foi feita principalmente ao nível de sequenciamento e transcrição e em menor grau em relação à organização do genoma e evolução. Desde que sequências de nucleotídeos destes genes

indicam homologia, pode-se esperar que os genes relacionados se originaram através de duplicações. No entanto ainda não está bem estabelecido em que momento da evolução das plantas superiores essas duplicações ocorreram e nem como esses genes *cab* duplicados foram organizados e mantidos no genoma. Pichesrky et al. (1985) e Green et al. (1991), propõem que aqueles genes que apresentam grande homologia em sequências não codificantes representam duplicações gênicas recentes ou eventos de correção gênica, como o caso das famílias de genes de petunia e ervilha.

A regulação dos genes *cab* do fotossistema II tem sido muito estudada em plantas superiores e sabe-se que é feita pela luz tanto na transcrição como pós-transcrição. A luz é um fator primordial para o crescimento normal das plantas não só por fornecer energia para a fotossíntese mas, também por fornecer sinais que regulam o desenvolvimento das plantas. A transição de plântulas estioladas para planta totalmente verde é um evento drástico no desenvolvimento durante o ciclo de vida das plantas e, durante este processo, muitos genes são afetados de diferentes maneiras. A luz interage com programas de desenvolvimento endógeno modulando a resposta destes genes através da ativação de dois ou mais fotoreceptores (Nagy et al., 1988; Thompsom & White, 1991; Carré & Kay, 1995).

As plantas contém vários receptores de luz que respondem a diferentes intensidades de luz, qualidade espectral e estado de polarização e, juntos, estes receptores podem absorver fótons em um amplo espectro de comprimento de onda, desde o vermelho-extremo ao ultravioleta. O maior e também melhor caracterizado receptor, que absorve na faixa do vermelho e vermelho-extremo é o fitocromo. A molécula do fitocromo é uma cromoproteína solúvel composta de um cromóforo linear tetrapirrólico, ligado covalentemente a polipeptídeos de 120-127kD, dependendo da espécie. Estas cromoproteínas foram

inicialmente isoladas com base no seu espectro de absorção reversível e existem em duas formas espectrofotométricas: a que absorve vermelho ( $P_r$ ) e a que absorve vermelho-distante ( $P_{fr}$ ) e estas duas formas são interconvertidas reversivelmente por irradiação. Plantas crescidas no escuro contém a forma  $P_r$ , geralmente relacionada como a forma inativa. A absorção de luz vermelha converte a forma  $P_r$  para  $P_{fr}$ , levando a mudanças morfológicas, bioquímicas e fisiológicas. Comprimento de onda no vermelho-distante converte a maioria da forma  $P_{fr}$  de volta para  $P_r$ , então esta luz cancela os efeitos da luz vermelha (Kuhlmeier et al., 1987; Nagy et al., 1988; Thompsom & White, 1991; Terzaghi & Cashmore, 1995).



Apesar do fitocromo ser conhecido principalmente como um receptor de luz vermelha, vermelha-distante, suas duas formas  $P_r$  e  $P_{fr}$  também podem absorver na região azul do espectro fotoreceptores (Thompsom & White, 1991).

Além do fitocromo outros pigmentos que absorvem luz vermelha são as clorofilas *a* e *b* e seus precursores, os protoclorofilídeos, que como o fitocromo também são tetrapirrólicos e possuem absorção máxima na região azul, como também na vermelha. O critério para distinguir entre ação de fitocromo ou protoclorofilídeo é a resposta reversível do fitocromo ao vermelho-distante. A fotoconversão do protoclorofilídeo leva à síntese de clorofila e formação de cloroplastos verdes contendo fotossistema I e II. Então o protoclorofilídeo pode ser considerado um receptor de luz, pois sua

fotoconversão, além de alterar drasticamente o metabolismo da planta, também é necessária para a formação do aparato fotossintético. Outros receptores de luz são azul/ultra-violeta-A (UV-A), chamado de criptocromo e um ultra-violeta-B (UV-B) (Kuhlmeier et al., 1987; Thompson & White, 1991; Terzaghi & Cashmore, 1995).

Apesar do conhecimento da estrutura e composição do fitocromo, o mecanismo pelo qual os sinais de fotoconversão mudam a expressão de um gene, ainda é pouco conhecido (Nagy et al., 1988). Parece pouco provável que o fotoreceptor module diretamente a transcrição do DNA ou a estabilidade do mRNA, pois não há evidências da existência de um sítio de ligação específico para o fitocromo no DNA, sugerindo então que os caminhos para a transdução de sinais contém passos iniciais comuns e subsequente amplificação destes, levando a diferentes respostas. Os fotoreceptores interagem entre si de uma maneira complexa, e a fotoconversão de dois ou mais é necessária para a obtenção do nível máximo da expressão gênica.

A resposta dos genes ao fitocromo pode ser classificada de acordo com a quantidade de luz vermelha, denominada de fluência, necessária para induzir a resposta. Então os genes podem ser classificados em fluência baixa (low fluence: LF), ou fluência muito baixa (very low fluence: VLF). Os genes classificados como LF apresentam o efeito da luz vermelha revertido pelo vermelho-extremo e, alguns exemplos, são os genes para a subunidade menor da RUBISCO (*rbcS*) e ferredoxina. Para os genes classificados VLF o efeito da luz vermelha não é revertida pela luz vermelho-extremo, mas são induzidas por ela sozinha. Isto se deve ao fato que tanto  $P_r$  como  $P_{fr}$  absorvem luz de comprimento de onda variando de 280 a 800nm, então na luz vermelho-extremo a pequena porcentagem de moléculas  $P_r$  que é convertida a  $P_{fr}$  já é suficiente para induzir a resposta (Kuhlemeier et al., 1987; Nagy et al., 1988; Thompson & White, 1991).

Os genes *cab* apresentam este tipo de resposta. Independente da fluência, a resposta ao fitocromo em alguns genes pode depender do estágio de desenvolvimento das plantas e também pode estar influenciada por um ritmo diurno, chamado de ritmo circadiano, como será discutido a seguir.

Conforme discutido anteriormente, já está bem estabelecido que a regulação dos genes *cab* é mediada pela luz e que a expressão ocorre tanto em baixa como em muito baixa fluência (LF e VLF). Para determinar quais fotorreceptores estariam envolvidos no controle desta expressão e se os genes *cab* dos dois fotossistemas, PSI e PSII, seriam controlados da mesma forma, Wehmeyer et al. (1990), analisaram plântulas estioladas de tomate e tabaco submetidas a diferentes tratamentos de luz. A análise da expressão do mRNA do CAB/PSII através da medida da resposta à taxa de fluência e o efeito de pré-irradiações com diferentes tipos de luzes, seguido de pulso vermelho e vermelho-distante, mostrou que a acumulação do mRNA do CAB/PSII é controlada por fitocromo, fotorreceptor azul/UV-A e provavelmente UV-B em ambas as espécies. A fotorregulação do CAB/PSI é mais fraca tanto para tomate como tabaco, mas também indica a ação de fitocromo, fotorreceptores azul/UV-A e UV-B. Não foi observada nenhuma diferença maior em relação à cinética de acumulação destes dois mRNA.

Além da regulação pelos fotorreceptores, os genes *cab* estão sujeitos a um controle endógeno durante os diferentes estágios de desenvolvimento da planta. Durante os primeiros dias do crescimento de plântulas os genes *cab* tornam-se competentes a estímulos do fitocromo e, durante este tempo, mRNA dos genes *cab* podem ser detectados no escuro, pelo menos em espécies de mostarda. Similarmente os níveis de mRNA de *cab* aumentam em cotilédones de soja antes da emergência do solo para depois diminuir nos cotilédones em senescência. O nível de hormônio muda durante o

desenvolvimento da planta e já foi observado que as concentrações de citocinina e ácido abscísico afetam a expressão deste gene, onde a citocinina pode aumentar a quantidade de mRNA *cab*, enquanto o ácido abscísico pode diminuir. Para estudar a ação de fotorreceptores e de reguladores endógenos, Brusslan & Tobin (1992), isolaram três genes *cab* de *Arabidopsis* e analisaram a competência em responder a fitocromo em condições de escuro. Os autores observaram um aumento transitório destes genes em plântulas crescidas no escuro e este aumento coincidia com a emergência dos cotilédones da capa da semente. Este padrão de expressão ocorreu independentemente da exposição à luz, fornecimento de giberelinas ou sacarose, indicando uma regulação interna. Esta regulação pode ser diferenciada da regulação do fitocromo, principalmente pela separação temporal: a capacidade de responder ao estímulo medido pelo fitocromo ocorre antes da regulação do desenvolvimento e continua após este nível ter diminuído, sugerindo que estes dois tipos de regulação são independentes. Brusslan & Tobin (1992), também mostraram que o promotor do gene, (um fragmento de 1,34kb), pode ser o responsável por esta regulação no desenvolvimento.

Controle semelhante já havia sido observado em milho, no qual um elevado nível de transcritos do gene *cab* foi detectado em plantas estioladas de milho com 8 dias (Sullivan et al., 1989).

Para entender se a resposta à luz é determinada por fatores endógenos que regulam o desenvolvimento das plântulas, ou se agem independentes das influências do desenvolvimento, Kretsch et al. (1995), analisaram dois promotores de genes codificados pelo núcleo e regulados pela luz, de mostarda, que foram introduzidos em tabaco, na frente do gene *GUS*. Um gene foi o *PsbP\*1*, que codifica a proteína de 23kD do complexo de evolução de oxigênio e outro o *Lhcb1\*1* que codifica para a proteína CAB tipo I. Como as plântulas de mostarda e tabaco apresentam diferenças morfológicas e fisiológicas

durante a germinação e posterior desenvolvimento, a introdução dos promotores de mostarda em tabaco pode esclarecer, se estas sequências introduzidas que controlam a expressão de genes seriam suficientes para responder a estímulos endógenos e exógenos, em uma planta receptora diferente. Os resultados do tempo para o início da acumulação, bem como da cinética de acumulação dos transcritos, durante o desenvolvimento das plântulas, mostraram que o promotor de mostarda, introduzido no tabaco, seguiu a cinética endógena dos genes: em cotilédone de mostarda, sob luz contínua, a acumulação de transcritos para *PsbP* e *Lhcb* inicia-se com 36 e 42h após a semeadura, respectivamente; em contraste, o promotor da mostarda, mostrou uma cinética mais atrasada, característica das plântulas de tabaco, com um aumento entre 66 e 72h, após a semeadura. Em tabaco, tanto para os genes endógenos, como para os quiméricos introduzidos, a luz é capaz de antecipar o padrão temporal da expressão em cerca de 24h. Este efeito nunca foi observado em mostarda, onde o acúmulo de transcritos dos genes *PsbP* e *Lhcb*, tem sempre o mesmo início, independente do tratamento de luz. Desta forma, foi estabelecido que o padrão temporal da expressão dos genes introduzidos era completamente dependente de fatores endógenos de regulação do desenvolvimento de plântulas e que o promotor introduzido foi suficiente para fornecer o padrão correto de expressão no sistema heterólogo, mas não determinou este padrão.

Além da regulação pelos fotorreceptores e por fatores endógenos do desenvolvimento, os genes *cab* também exibem um ritmo circadiano, ou seja, sofrem alterações independente de indução do ambiente em um período de 24h, que é manifestado na transcrição e pós-transcrição. As primeiras evidências do ritmo circadiano foram verificadas em tomate cultivados sem estímulo ambiental. No escuro contínuo, o nível de equilíbrio do mRNA continuava a oscilar por quatro dias, acompanhado por uma diminuição gradual

na amplitude. Também quando as plantas eram expostas a regimes alternados de luz/escuro, este padrão de oscilação permanecia até a adaptação ao novo ambiente (Piechulla & Gruissem, 1987; Piechulla, 1988; 1989). Entretanto, o tempo para amplitude máxima e mínima e o nível de expressão máxima eram alterados de acordo com as situações de luz.

Para investigar se o ritmo circadiano é influenciado pelo estágio de desenvolvimento e se esta oscilação típica ocorria em outras monocotiledôneas e dicotiledôneas, Meyer et al. (1989) caracterizaram a expressão circadiana do gene *cab* em folhas de tomates e outras espécies mono e dicotiledôneas. Em relação ao estágio de desenvolvimento, foi observado que o padrão de oscilação permanecia o mesmo, independente do estágio das folhas e somente a amplitude de oscilação do nível de mRNA variou com o desenvolvimento, sendo maior em folhas jovens. As outras espécies estudadas: soja, ervilha, milho, trigo e cevada, nas quais foi medido o nível de mRNA durante o ciclo de um dia, mostraram níveis elevados de mRNA *cab* ao meio-dia, exceto ervilha, indicando que o mecanismo de ativação está presente em mono e dicotiledôneas.

Para verificar se todos os membros da mesma família do gene *cab* apresentam ritmo circadiano, Kellmann et al. (1993) estudaram os níveis individuais de mRNA dos nove membros da família *Lhca/b* (gene *cab*) de tomate. Análises detalhadas da acumulação do mRNA em folhas sob condições de luz/escuro, escuro contínuo e luz contínua, revelaram que todos os genes apresentavam ritmo circadiano e foram observadas somente pequenas diferenças no padrão de expressão, sugerindo que mecanismos moleculares e de transmissão de sinais idênticos ou muito similares controlam a expressão de todos os genes da mesma família.

Apesar do ritmo circadiano estar bem estabelecido para muitas espécies da divisão Angiosperma, esta oscilação não está presente para as Gimnospermas subdivisão Coniferofitina, em que a maquinaria para a expressão circadiana parece ter sido perdida durante a evolução. Ao contrário de Angiospermas, as Coniferofitinas são capazes de sintetizar clorofila independentemente da luz e estas são fundamentais para a organização do complexo LHC, a expressão dos genes *cab*, regulada pelo ritmo circadiano poderia se excessiva. O mesmo argumento é usado para espécies de Briófitas que também sintetizam clorofila no escuro e não apresentam ritmo circadiano para o gene *cab*. A partir destes resultados, Oberschmidt et al. (1995), propuseram que em espécies de plantas que possuem a síntese de clorofila dependente da luz, é necessário o controle circadiano dos gene *cab* para otimizar a formação do complexo LHC. Plantas capazes de sintetizar clorofila no escuro, não precisam do controle circadiano para expressão dos genes *cab*.

O paradigma geral adotado para o papel da luz na regulação da transcrição é que os fotorreceptores geram sinais, que são traduzidos via intermediários para ativar os fatores de transcrição ligados às suas sequências dentro de regiões regulatórias dos genes regulados pela luz. Estes fatores coordenam a formação do conjunto do aparato de transcrição, e ela se inicia. Revisões têm sido feitas sobre as sequências responsáveis pela resposta à luz nos promotores destes genes, principalmente o *cab*, entre elas as de: Kuhlmeier et al., (1987); Nagy et al., (1988); Benfey & Chua, (1989); Thompsom & White (1991); Anderson et al., (1994) e Terzaghi & Cashmore, (1995), e foram identificados vários elementos que agem em *cis*, que são reconhecidos por sequências específicas de fatores proteicos que agem em *trans*, indicando uma interação complexa através de vários mecanismos.

As sequências regulatórias que agem em *cis*, têm sido identificadas em estudos de mutagênese e deleção e algumas generalizações podem ser feitas: elementos similares são encontrados em diferentes promotores; apesar dos promotores serem organizados a partir de um número limitado de elementos, a maneira pela qual são organizados, pode variar consideravelmente, mesmo dentro da mesma família de genes; nenhum elemento foi encontrado em todos os promotores dos genes regulados pela luz; nenhum elemento sozinho é capaz de conferir resposta à luz em um promotor não regulado pela luz, ou seja, há sempre dois ou mais elementos que interagem; a regulação pela luz pode envolver tanto a “ligação” como o “desligamento” de genes e algumas sequências podem reprimir ao invés de ativar a transcrição. Alguns elementos foram repetidamente encontrados em genes regulados pela luz, entre eles: “G-box”, o sítio GT-1; “I-boxes” e motivos correlacionados; TGACG e elementos ricos em A/T, e as evidências indicam que a combinação específica de um número de elementos pode definir um promotor regulado pela luz.

As proteínas que se ligam ao DNA são identificadas como fatores que se ligam aos elementos regulatórios dentro dos promotores regulados pela luz. As mais conhecidas são as da família GT e também GBF (“G-Box-Binding Factors”). Também já foram identificadas proteínas que se ligam ao motivo TGACG, ao I-Box, e às regiões ricas em A/T e mais de um fator proteico pode ser responsável pela ativação de um único elemento que age em *cis*. Para o gene *cab*, já foram identificados pelo menos cinco fatores proteicos, incluindo GBF, fator que se liga ao GATA, GA-1 que se ligam à sequência de 1,5kb a frente do gene *cab-e* de tabaco e alguns fatores que se ligam em vários sítios dentro do promotor (Anderson et al., 1994). Anderson et al. (1994) identificaram duas proteínas nucleares CUF-1 e CGF-1, que se ligam dentro dos motivos conservados da sequência a frente do gene *cab2* de *Arabidopsis* e observaram que

um domínio que age em *cis* de -111 a -33 do promotor do gene *cab2* é suficiente para a expressão regulada pelo fitocromo e por ritmo circadiano. Carré & Kay (1995), identificaram mais cinco fatores proteicos: CUF-2, CUF-3, Tic, Tac e Toe, que se ligam dentro desta região, e também são responsáveis pela regulação através de fitocromo e ritmo circadiano do gene *cab2* de *Arabidopsis*. Fernandez & Staneloni (1996), analisaram a região promotora do gene *Lhcb1* de batata e observaram que a região 5' de -1300 a +10, relativa do início do sítio de transcrição, foi suficiente para conferir a resposta do gene ao fitocromo, bem como a expressão órgão-específica, para os genes *Lhcb1* de folhas e raízes de batata.

Além da regulação pela luz da transcrição e pós-transcrição do gene *cab*, as proteínas CAB também sofrem esta regulação na pós-tradução e os maiores passos de pós-tradução na biosíntese destas proteínas são: importação do cloroplasto; processamento após importação; inserção na membrana do tilacóide; formação de complexos com os pigmentos; processamento proteolítico e montagem correta no fotossistema. Vários destes passos são regulados direta ou indiretamente pela luz, através do fitocromo, dos protoclorofilídeos e dos fotorreceptores azul/UV-A. O primeiro passo que necessita indiretamente de luz é a importação da proteína pelo cloroplasto, pois este processo necessita de ATP. Após entrar no cloroplasto o polipeptídeo precisa ser transportado até as membranas dos tilacóides e isto depende da atividade do estroma, que é induzida durante o desenvolvimento dependente de luz do plastídeo e a inserção do polipeptídeo precursor do LHCII no tilacóide é precedida de um processamento proteolítico. A inserção dos polipeptídeos CAB nos tilacóides também é acompanhada pela ligação com pigmentos, cuja síntese e acumulação são reguladas pela luz. A clorofila não só é importante para a estabilidade, organização correta e integração das proteínas CAB no fotossistema, como

também para o acúmulo de outras proteínas envolvidas na estrutura do fotossistema II como a CP47 e a D1 (Klein et al., 1988; Mullet et al., 1990). Então, os cofatores necessários para a organização do LHCII são clorofila *a*, clorofila *b* e também xantofilas, neoxantinas, violaxantinas e luteínas, sendo que acumulação de clorofila *b*, que é fortemente dependente da luz, tem um papel fundamental para determinar qual polipeptídeo CAB será acumulado e qual será degradado. Portanto através destes diferentes passos fica evidente o papel da luz na regulação pós-tradução das proteínas CAB.

### **2.3 FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a***

A grande maioria dos pigmentos fotossintéticos em plantas não atua diretamente na separação de cargas das reações fotossintéticas luminosas, mas funciona como antenas que absorvem fótons e transferem, através de outros pigmentos na antena, a energia absorvida para os centros de reação dos fotossistemas onde ocorrem as primeiras reações fotoquímicas, conforme discutido nos itens anteriores. Em condições de pouca luz, a maioria dos fótons ou quanta absorvidos é usado nas reações fotoquímicas e apenas uma pequena parte é transformada em calor ou emitida com fluorescência da clorofila *a* e, neste caso, diz-se que todos os centros de reação estão abertos (oxidados). Em condições de excesso de luz, diminui a eficiência de transferência de energia e grande parte da energia capturada é dissipada, para própria proteção dos fotossistemas, na forma de calor ou emissão de fluorescência da clorofila *a* e considera-se que os centros de reações estão fechados (ou reduzidos) (Krause, 1988; Rees & Horton, 1990; Krause & Weis, 1991).

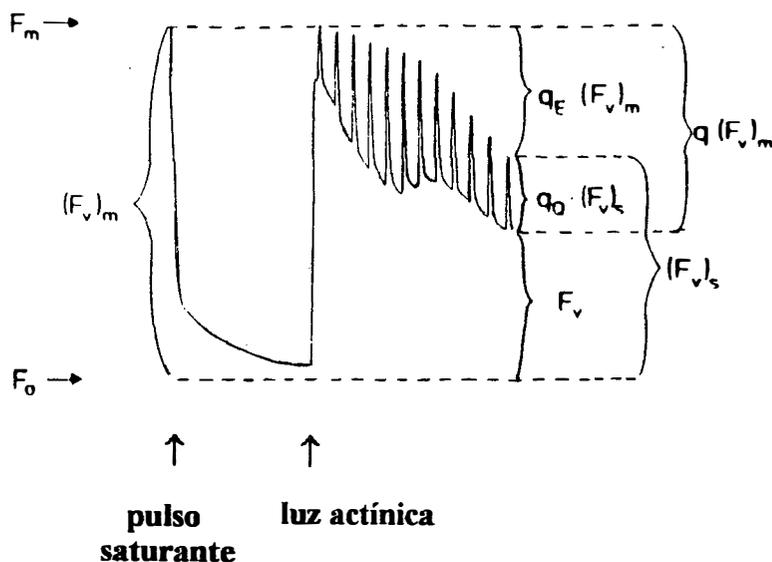
Nas primeiras reações fotoquímicas, um elétron é transferido do pigmento  $P_{680}$ , no estado simples de excitação ( $P_{680}^*$ ) para a feofitina  $a$  e a partir daí, é transferido ao acceptor primário de elétrons, quinona A ( $Q_A$ ). A separação de cargas cria o  $P_{680}^+$ , que é um agente fortemente oxidante e recebe um elétron de um segundo doador  $Z$ , que foi identificado como o resíduo de tirosina da proteína D1. Este doador oxidado,  $Z^+$ , é reduzido por um elétron do sistema de oxidação da água. Em uma reação mais lenta, o elétron é transmitido a  $Q_B$ , que após receber dois elétrons liga dois prótons e se funde ao “pool” de plastoquinona/plastohidroquinona. Então, a produção de fluorescência é mínima ( $F_0$ ) quando todos os centros de reações estão abertos, ou seja quando  $Q_A$  está oxidada e, quando  $Q_A$  está completamente reduzida, ocorre a máxima produção de fluorescência ( $F_M$ ). No estado adaptado ao escuro do aparelho fotossintético,  $Q_A$  está normalmente oxidada, e se for fornecida luz contínua, haverá um aumento da fluorescência, a partir de  $F_0$ , relacionada à redução da  $Q_A$ . Quando a intensidade de luz actínica é elevada fazendo com que a taxa de redução da  $Q_A$  seja maior que a reoxidação, atinge-se a fluorescência máxima (Krause & Weis, 1991).

Um sinal típico da indução da fluorescência em luz contínua é conhecido como Efeito Kautsky, em que após um pico ou um máximo de fluorescência, acontece um declínio, denominado “quenching”. Normalmente a extensão do “quenching” é expressa por coeficientes que variam de 0 a 1, indicando a proporção diminuída com iluminação da fluorescência máxima (Krause & Weis, 1991). Vários mecanismos contribuem para esta diminuição da fluorescência e a compreensão dos componentes do mesmo fornece informações importantes do estado funcional do aparato fotossintético.

Um tipo de “quenching”, denominado fotoquímico,  $q_p$ , ocorre devido a competição com as reações fotoquímicas, e depende da presença da  $Q_A$

no estado oxidado. O  $q_P$  traduz então a proporção de energia de excitação transferida da antena para o centro de reação do PSII, ou seja reflete o estado de oxidação da  $Q_A$  (Schreiber et al., 1986) . A reoxidação da  $Q_A^-$  causa o “quenching” fotoquímico (Krause & Weis, 1991). Outro tipo de “quenching” é conhecido como “quenching” não fotoquímico,  $q_N$ , pois a diminuição da fluorescência acontece por mecanismos não diretamente relacionados ao estado de redução da  $Q_A$  e podem ser causados por vários fatores.

A Figura 4 apresenta a definição dos coeficientes de “quenching” e das terminologias dos parâmetros característicos de fluorescência, são usados para os cálculos dos coeficientes, onde  $F_0$ : refere-se a intensidade de fluorescência de amostras adaptadas ao escuro;  $F_M$ : intensidade máxima de fluorescência obtida em amostras adaptadas ao escuro, com a aplicação de um pulso saturante de luz;  $(F_v)_m$ : fluorescência máxima variável de uma amostra adaptada ao escuro;  $F_v$ : fluorescência variável em qualquer tempo durante a indução;  $(F_v)_s$ : fluorescência variável saturada, que corresponde à fluorescência máxima variável em qualquer tempo durante a indução ;  $q_Q$ , refere-se ao “quenching” fotoquímico; e  $q_E$ , ao “quenching” não-fotoquímico (Schreiber et al., 1986).



**Figura 4.** Definição dos coeficientes de “quenching” e das terminologias dos parâmetros característicos de fluorescência  $Q_A$  (extraído de Schreiber et al., 1986).

Como dito anteriormente o “quenching” não fotoquímico pode ser causado por vários fatores. Um fator importante é a acidificação do lúmen do tilacóide, que ocorre durante a translocação de prótons através da membrana e é conhecido como “quenching dependente de energia” ( $q_E$ ); “quenching” relacionado à transição do “estado 1 para o estado 2”, regulado pela fosforilação do LHCII ( $q_T$ ); “quenching fotoinibitório” relacionado à fotoinibição da fotossíntese ( $q_I$ ); “quenching” de  $F_o$  considera a diminuição da fluorescência de  $F_o$ , devido às mudanças na transferência de energia no sistema antena coletora de luz; e o ciclo das xantofilas (Hodges et al., 1989; Krause & Weis, 1991 e Buschmann, 1995).

Inúmeros processos contribuem para o  $q_N$ , mas a maior proporção se origina de uma dissipação na forma de calor, sendo referido como  $q_E$  ou  $q_I$ . O  $q_E$  é dependente da energização da membrana do tilacóide, mais especificamente, do  $\Delta pH$  formado no tilacóide com a iluminação, e exceto sob

condições extremas de estresse é o processo dominante do “quenching” não fotoquímico. Por outro lado o  $q_I$  permanece após a dissipação deste  $\Delta pH$  e pode ser atribuído a danos ou inativação do PSII (Krause, 1988; Horton et al., 1994).

Há duas hipóteses a respeito do mecanismo de  $q_E$ , relacionado principalmente ao local onde ocorre a dissipação de energia, no centro de reação ou na antena. A hipótese relacionada ao centro de reação propõe que o efeito da diminuição do pH causa a liberação da ligação do  $Ca^{2+}$  e isto inibe o lado doador e também aumenta o potencial redox do lado aceptor, promovendo recombinação de cargas entre o  $P_{680}^+$  e a  $Q_A^-$ . A energia liberada pela PSII é dissipada como calor. Há poucas dúvidas que este mecanismo possa ocorrer no PSII, mas permanece a questão se este é realmente o mecanismo do  $q_E$ , ou se é apenas outra forma de inativação ou dano do PSII sob condições de estresse.

A outra hipótese, relativa a antena, está baseada principalmente na associação do LHCII a carotenóides conhecidos como xantofilas, em particular a violaxantina. A violaxantina é importante com relação ao  $q_E$ , pois condições que induzem o  $q_E$  também causam sua de-epoxidação, formando a zeaxantina e há fortes correlações entre a formação da zeaxantina e a extensão do “quenching” (Horton et al., 1991). Sob excesso de luz, violaxantina é convertida a zeaxantina através da via intermediária da anteraxantina e esta reação é revertida em condições de baixa intensidade luminosa. Esta sequência reversível é denominada de ciclo da xantofila e os carotenóides que participam são apenas os presentes na membrana fotossintética e sofrem mudanças rápidas induzidas pela luz (Król et al., 1995; Demmig-Adams & Adams, 1996). Apesar de já ter sido caracterizado como o ciclo da xantofila é regulado pela luz, o papel funcional ainda não está bem definido.

Atualmente, há duas hipóteses para o papel da zeaxantina: pode aceitar diretamente e diminuir o estado excitado da clorofila; ou pode ser um fator importante na estrutura do LHCII. No primeiro caso o ciclo da xantofila seria um processo para a criação do “quenching”, onde o  $\Delta pH$  seria necessário para causar mudanças na organização do LHCII necessárias para manter a zeaxantina e a clorofila perto para a transferência de energia. A outra hipótese considera que o ciclo da xantofila exerce controle sobre a estrutura da membrana do tilacóide, em particular sobre a organização do LHCII através de mudanças nas propriedades detergentes da ligação das xantofilas ao LHCII (Horton et al., 1994; Demmig-Adams & Adams, 1996). Análises recentes nas propriedades fotofísicas dos carotenóides têm levado a um novo modelo do papel da xantofila, onde o ciclo constitui um mecanismo de mudança molecular da violaxantina (9 pontes duplas conjugadas de carbono-carbono) para anteraxantina e zeaxantina (com 10 e 11 duplas pontes conjugadas, respectivamente), que pode potencializar o recebimento de energia da clorofila e então dissipar como calor (Demmig-Adams & Adams, 1996).

Apesar das dúvidas relacionadas ao papel do ciclo das xantofilas no  $q_N$ , a análise da fluorescência da clorofila é um método bastante útil para medir a performance fotossintética das plantas, principalmente por ser um método bastante rápido de medir a eficiência quântica do transporte de elétrons do PSII, fornecendo informações sobre as respostas das plantas a fatores ambientais. Isto foi possível com o surgimento de métodos capazes de separar o “quenching” fotoquímico do não fotoquímico, como o método de modulação fluorimétrica de pulsos proposto por Schreiber et al. (1986). Genty et al. (1989), propuseram que a eficiência do PSII poderia ser avaliada através da análise da intensidade da fluorescência da clorofila. Segundo os autores a eficiência quântica do transporte de elétrons do PSII ( $\phi PSII$ ) é determinada pela eficiência com que um quantum

absorvido pode alcançar um centro de reação, e a proporção de centros de reações que são capazes de transferir um elétron, ou seja, centros de reação abertos. A eficiência de captura da energia de excitação do centro de reação aberto pode ser medida pela relação  $F'_v/F'_M$ , onde  $F'_v$  representa a fluorescência variável em qualquer estado adaptado a luz, e  $F'_M$  representa a intensidade da fluorescência com todos os centros de reação do PSII fechados em qualquer estado adaptado a luz, e esta relação pode medir o fenômeno de fotoinibição, que é manifestada pela redução da eficiência do PSII na captura de energia de excitação pelos centros de reação (Björkman, 1987; Kooten & Snel, 1990). Por outro lado a concentração de centros de reação do PSII abertos pode ser medido pelo  $q_p$ , então o  $\phi_{PSII}$  é proporcional ao produto entre  $q_p$  e  $F'_v/F'_M$  (Genty et al., 1989). Os autores também verificaram que qualquer mudança não fotoquímica envolvida na diminuição da energia de excitação dos centros de reação aberto do PSII, também afetaria a eficiência quântica do transporte de elétrons.

Atualmente, está bem estabelecido que a eficiência quântica da fotossíntese diminui com o aumento da intensidade luminosa devido ao aumento da limitação da transferência de elétrons e da capacidade de assimilação de carbono, resultando no fechamento do centro de reação. Também já foi demonstrado que mesmo o centro de reação aberto é pouco eficiente em alta luminosidade e o responsável por este decréscimo é um aumento na dissipação não radioativa, detectado pelo “quenching” não fotoquímico (Genty et al., 1989).

## 2.4 METABOLISMO DO CARBONO E FOTOSSÍNTESE

### 2.4.1 Ciclo de Calvin-Benson

O início da fixação do CO<sub>2</sub> pela fotossíntese consiste de uma série de 13 reações, catalisadas por 11 enzimas, conhecidas como Ciclo de Calvin-Benson, onde o CO<sub>2</sub> é fixado e, a cada três voltas do ciclo, é formada uma molécula de triose fosfato a partir de três moléculas de CO<sub>2</sub>. A triose fosfato pode então ser usada para regenerar ribulose 1,5-bifosfato, que é o receptor do CO<sub>2</sub>, ou na síntese de amido e sacarose. Estas reações são realizadas a partir da energia liberada pela hidrólise de ATP e pela oxidação de NADPH, que são conhecidos como força assimilatória (Dietz & Huber, 1986) e podem ocorrer no escuro até que o fornecimento de ATP e NADPH termine, entretanto, sabe-se que a luz fornece agentes regulatórios que as tornam mais eficientes (Leegood, 1990).

O Ciclo de Calvin-Benson pode ser dividido em três fases e a primeira fase consiste na carboxilação catalisada pela enzima ribulose 1,5-bifosfato carboxilase oxigenase (RUBISCO). Esta enzima está localizada no cloroplasto, sendo formada por oito sub-unidades menores, codificadas por uma pequena família de genes nucleares, *rbcS*, e oito sub-unidades maiores, codificada por um gene cloroplastidial, *rbcL* e catalisa o primeiro passo da competição entre a redução fotossintética do carbono e o ciclo de fotorrespiração. A ação oxigenase da RUBISCO dificulta a fotossíntese em plantas C<sub>3</sub>, devido ao fenômeno de fotorrespiração, consumindo carbono reduzido e energia, conforme será discutido posteriormente. A RUBISCO é uma enzima com K<sub>m</sub> elevado (K<sub>mCO<sub>2</sub></sub> = 25 μM, nas condições atmosféricas) e baixa afinidade por CO<sub>2</sub>, e por isso plantas C<sub>3</sub> usam metade das proteínas solúveis a esta enzima. A ação carboxilase da enzima

adiciona o  $\text{CO}_2$  a um açúcar de 5 carbonos, a ribulose 1,5-bifosfato (RuBP) e em seguida forma duas moléculas de 3-fosfoglicerato (Leegood, 1990; Portis, 1992).

A taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$  ocorre na folha e depende: da quantidade e da atividade da RUBISCO presente; da concentração de seus substratos, RuBP e  $\text{CO}_2$ ; da concentração de  $\text{O}_2$ , que é o inibidor competitivo, e da temperatura da folha. O nível de  $\text{CO}_2$  no estroma é regulado pelo fosfato inorgânico,  $\text{P}_i$ , e pela sua taxa de difusão do cloroplasto e a disponibilidade de RuBP depende da intensidade de luz, que determina a capacidade da cadeia de transporte de elétrons gerar ATP e NADPH. Diferenças na taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$  entre folhas ocorrem devido a diferença na idade das folhas, nutrição da planta ou condições de luz durante o crescimento, que podem estar relacionadas à atividade da RUBISCO presente nas folhas.

A segunda fase do Ciclo de Calvin-Benson é a fase redutora, onde o ácido 3-fosfoglicerato (3-PGA) é convertido a triose fosfato (TP), catalisado pela fosfoglicerato quinase e pela gliceraldeído fosfato desidrogenase dependente de  $\text{NADP}^+$  (NADP-GAPDH). A terceira fase é de regeneração da RuBP que é catalisada por uma série de enzimas: Triose-Fosfato Isomerase, Aldolase, Frutose 1,6-Bisfosfatase, Sedoheptolose 1,7-Bisfosfatase, Transketolase, Ribose 5-Fosfato Isomerase, Ribulose 5-Fosfato 3-Epimarase, Ribulose 5-Fosfato Kinase (Leegood, 1990). O Ciclo de Calvin-Benson permanece na interface entre o transporte de elétrons e a síntese de produtos sendo portanto sensível a mudanças nas condições ambientais, que causem alterações nas relações entre suprimento e demanda dos produtos do transporte de elétrons. Portanto a atividade das enzimas é controlada de várias formas, sendo que a ativação pela luz e modulação por metabólitos permitem um ajuste rápido da atividade e a síntese de proteínas permite uma regulação a longo prazo da quantidade das enzimas do ciclo.

Durante a última década houve grande progresso no entendimento da regulação da RUBISCO e a idéia inicial da ativação “ligada” pela carbamilação causada por mudanças do pH do estroma e pelo  $Mg^{2+}$  induzidas pela luz, foi superada pelo conceito atual, no qual a atividade da RUBISCO é regulada por uma variação completa da intensidade de luz e de maneira geral, é reduzida pela ligação de um açúcar fosfato, principalmente RuBP e restaurada pela ação da RUBISCO ativase. Esta enzima além de facilitar a ação da RUBISCO, modula sua atividade em resposta a fatores ambientais como irradiação, sendo importante para manter os metabólitos fotossintéticos em um nível ótimo para a fotossíntese em condições ambientais variáveis. Portanto, o conhecimento da regulação da RUBISCO é importante para entender a regulação coordenada entre a utilização de RuBP na carboxilação, absorção de luz e uso de energia para regeneração de RuBP, que são passos fundamentais para a fotossíntese (Salvucci, 1989; Portis, 1990; 1992; Hudson et al., 1992).

O uso de plantas transgênicas antisense com decréscimo progressivo na quantidade da RUBISCO, tem facilitado o estudo da interação do conteúdo da enzima, taxas fotossintéticas e crescimento de plantas. Um exemplo, é o estudo realizado com tabaco transgênico *rbcS* antisense, onde o gene antisense introduzido diminui a síntese da sub-unidade menor da enzima, causando uma redução na sub-unidade maior e na enzima como um todo, originando plantas com diferentes conteúdo de RUBISCO.

Plantas transgênicas de tabaco contendo diferentes quantidades de RUBISCO foram cultivadas em intensidade de luz moderada ( $300\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) e foi medida a taxa fotossintética. Os resultados mostraram que não houve uma redução significativa da fotossíntese quando a RUBISCO diminuiu até 40% do conteúdo das plantas selvagens, esta diminuição foi compensada por um aumento na ativação da RUBISCO, que passou de 60 para

100%. Este aumento da ativação pode ser explicado da seguinte maneira: o decréscimo no nível da RUBISCO alteraria o balanço entre o fornecimento e uso de 3-PGA e a diminuição deste aumentaria a relação ATP/ADP. Como a ativação da enzima necessitaria da ação de outra enzima, a RUBISCO ativase, cujo processo é estimulado pelo ATP, o aumento da relação ATP/ADP poderia ser o responsável direto pelo aumento da ativação da RUBISCO. Um decréscimo maior da quantidade da enzima inibiu fortemente a assimilação de CO<sub>2</sub> e foi acompanhado pela diminuição da atividade de outras enzimas como a frutose 1,6-bisfosfatase (Quick et al., 1991). Quando estas plantas foram cultivadas em alta intensidade luminosa ( $1000\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), a taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> foi reduzida em 63% nas plantas transgênicas, independente da pressão parcial intercelular de CO<sub>2</sub> (Hudson et al., 1992). Foi proposto então que a quantidade da RUBISCO em plantas é cerca de 40% acima do necessário para impedir a limitação da fotossíntese, o que representa um investimento da planta em cerca 15% do total das proteínas da folha, e este “excesso” estaria desativado pela decarbamilação, com uma menor contribuição do decréscimo do carbono inorgânico, C<sub>i</sub>, ou da relação RuBP/PGA (Quick et al., 1991; Stitt & Sonnewald, 1995).

Estas plantas transgênicas foram então usadas para avaliar a contribuição deste “excesso” de RUBISCO na capacidade de adaptação das plantas às mudanças nas condições de irradiação, concentração de CO<sub>2</sub> e pressão de vapor, em um curto espaço de tempo. Para isso foi medido o coeficiente de controle de fluxo da RUBISCO, C<sub>R</sub>, que é um parâmetro usado para medir quanto uma determinada enzima interfere em um determinado processo e quanto maior a influência da enzima, maior o C<sub>R</sub>. Os resultados mostraram que tanto nas plantas selvagens como nas transgênicas, o C<sub>R</sub> aumenta com o aumento da irradiação, diminuição de CO<sub>2</sub>, ou aumento da umidade. Em condições ambientais de CO<sub>2</sub> e

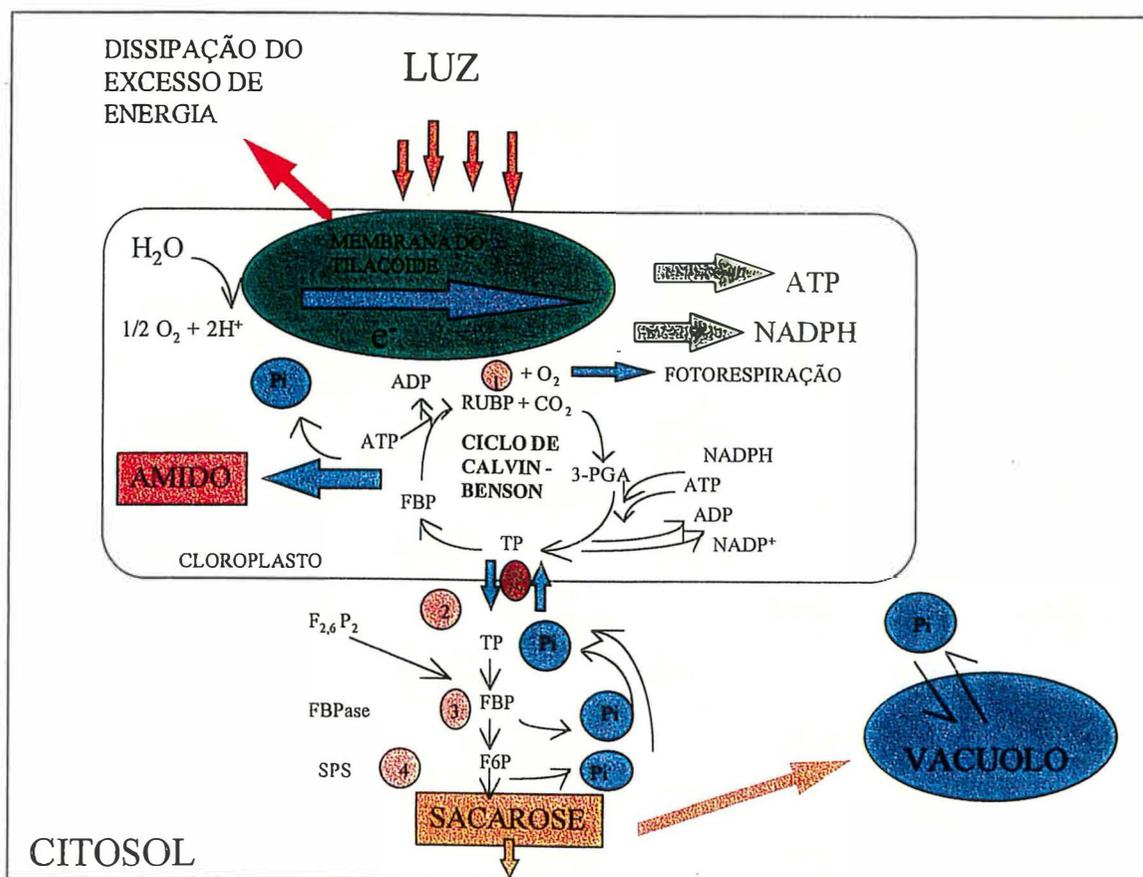
65% de umidade relativa, a RUBISCO exerce um controle marginal na fotossíntese, em baixa intensidade de luz e um controle maior ( $C_R = 0,7$ ) em elevada intensidade luminosa. O controle do fluxo foi diferente somente em plantas transgênicas com quantidade muito baixa da enzima. Em condições de alto  $CO_2$ , a RUBISCO apresenta um controle muito baixo, independente da intensidade luminosa e o controle da fotossíntese é realizado por outros componentes do metabolismo, incluindo transporte de elétrons e síntese de produto final (Stitt et al., 1991; Stitt & Sonnewald, 1995).

A estratégia de construção de plantas transgênicas com decréscimo progressivo na quantidade de uma certa enzima, para estudar sua regulação e influência no processo, também tem sido usada para as demais enzimas do Ciclo de Calvin, como por exemplo: NADP-GAPDH; aldolase plastidial; frutose 1,6-bifosfato plastidial (pFBPase) e fosforibuloquinase (PRK). Estudos mostram que a fotossíntese em condições ambientais não é afetada com uma diminuição de duas vezes da NADP-GAPDH, ou um decréscimo de 10 a 20 vezes PRK e apresenta pouca inibição com uma redução cerca de três vezes da FBPase plastidial. Estes resultados mostram que os passos enzimáticos irreversíveis da regeneração da RuBP, não exercem um controle maior na taxa de fotossíntese e apesar das enzimas pFBPase e PRK serem precisamente reguladas, esta regulação destina-se a manter o Ciclo de Calvin mais que controlar a fotossíntese (Paul et al., 1995; Stitt & Sonnewald, 1995).

#### **2.4.2 Síntese de amido e sacarose**

Durante a fotossíntese, a maioria do carbono fixado é exportado para o citosol como triose-fosfato (triose-P) e convertido a sacarose, liberando fosfato inorgânico ( $P_i$ ). Este  $P_i$  retorna ao cloroplasto em uma troca por

mais triose-P que deve ser precisa. A taxa de síntese de sacarose deve estar ajustada de maneira que quantidade suficiente de  $P_i$  seja liberada para manter sua concentração no estroma e permitir que as reações ocorram eficientemente no estroma e tilacóide, caso contrário a fotossíntese pode ser inibida. A fotossíntese será também inibida se houver uma retirada muito rápida de triose-P, pois isto leva a uma diminuição nos metabólitos do Ciclo de Calvin-Benson (Stitt, 1987; Stitt et al., 1988). A regulação da síntese de sacarose também pode interferir na alteração do fracionamento dos fotossintatos permitindo que a síntese de amido seja maior. O esquema abaixo relaciona o Ciclo de Calvin-Benson e a síntese de amido e sacarose ( Figura 5).



**Figura 5.** Esquema simplificado do Ciclo de Calvin-Benson e da síntese de amido e sacarose

O passo inicial da síntese de sacarose envolve a conversão de triose-P para hexose-fosfato e é regulado por uma interação entre a frutose 2,6-bisfosfato ( $\text{Fru}_{2,6}\text{P}_2$ ), vários metabólitos, como 3-PGA, e a enzima citosólica frutose 1,6-bisfosfatase ( $\text{Fru}_{1,6}\text{-bisPase}$ ). Então a primeira reação irreversível que leva à síntese de sacarose envolve a hidrólise de frutose 1,6-bisfosfato pela  $\text{Fru}_{1,6}\text{bisPase}$ , que é inibida por  $\text{Fru}_{2,6}\text{P}_2$ . A frutose 6-fosfato formada é convertida a glucose 6-fosfato, glucose 1-fosfato, e UDP-glucose, através de uma série de reações reversíveis. Os passos finais envolvem a transferência de uma unidade glicosil da UDP-glucose para frutose 6-fosfato, catalisada pela sacarose fosfato sintase (SPS), gerando a sacarose 6-fosfato, e a hidrólise deste metabólito produz sacarose (Copeland, 1990).

Durante o fotoperíodo, com o aumento da fotossíntese ocorre uma diminuição progressiva na  $\text{Fru}_{2,6}\text{P}_2$ , que ativa a enzima  $\text{Fru}_{1,6}\text{-bisPase}$ , permitindo que triose-P seja removida do cloroplasto e esta regulação permite que a remoção de triose-P esteja ajustada à taxa de fotossíntese e à demanda de sacarose. O declínio da  $\text{Fru}_{2,6}\text{P}_2$  pode ser atribuído a inibição da enzima frutose 6-fosfato-2-quinase ( $\text{Fru}_{6\text{P},2}\text{-Kinase}$ ) através da elevação dos níveis de triose-fosfato e 3-PGA. A ativação da enzima  $\text{Fru}_{1,6}\text{bisPase}$  pela queda de  $\text{Fru}_{2,6}\text{P}_2$  é amplificada por mudanças em outros metabólitos como AMP, Pi e  $\text{Fru}_{1,6}\text{P}_2$ ; por exemplo: quando aumenta o nível de triose-fosfato, aumenta a  $\text{Fru}_{1,6}\text{P}_2$ , pois estes metabólitos estão ligados por reações que estão em equilíbrio.

Um modelo proposto para a regulação da enzima  $\text{Fru}_{1,6}\text{bisPase}$  é que ela permanece inativa no citosol até que a triose-fosfato atinja uma concentração crítica, e uma vez que isto acontece a enzima é fortemente ativada por mais mudanças da triose fosfato que leva a um aumento recíproco do substrato e queda na concentração de  $\text{Fru}_{2,6}\text{P}_2$ . Este processo é uma maneira de assegurar que a síntese de sacarose só ocorra enquanto a reciclagem

de  $P_i$  esteja ativada e os metabólitos estejam disponíveis, e que seja “desligada” se houver qualquer queda no nível de metabólitos que prejudique o Ciclo de Calvin-Benson (Stitt, 1987; Stitt & Quick, 1989).

Durante o acúmulo de sacarose ocorre um aumento da Fru2,6P<sub>2</sub> de cerca de duas a três vezes e este aumento leva a uma restrição na síntese de sacarose, pois inibe a atividade da enzima Fru1,6bisPase, elevando o nível de triose-fosfato no citosol e mais fotossintatos são retidos no cloroplasto e convertidos em amido. O mecanismo que causa o aumento da Fru2,6P<sub>2</sub> pode envolver outros fatores como, o aumento da relação Fru6P,2-Kinase/Fru2,6Pase e também a participação de outra enzima, a sacarose-fosfato sintase (SPS). Então este controle preciso da enzima Fru1,6bisPase só é eficiente pois existe um mecanismo análogo nas reações subsequentes onde a hexose fosfato é convertida a sacarose (Stitt, 1987; Stitt & Quick, 1989).

A enzima SPS catalisa a penúltima reação da síntese de açúcar e apresenta um papel central na formação da sacarose. Pode ser regulada de diferentes maneiras: um mecanismo envolve o controle alostérico, onde a glucose 6-fosfato é o ativador e o  $P_i$  é o inibidor e este mecanismo permite a ligação entre a atividade da SPS e a taxa de fotossíntese e também entre o fluxo catalisado pela Fru1,6bisPase, pois o aumento na taxa de produção de hexose fosfato estimula a SPS via um aumento na relação Glucose 6-fosfato/ $P_i$ . Mas este controle alostérico não é o único mecanismo de regulação e já foi mostrado que a taxa de síntese de açúcar pode ser alterada sem modificações na concentração de hexose fosfato. Em muitas espécies a atividade da SPS pode flutuar durante o dia, e o mecanismo para isto pode variar. Em soja, por exemplo, há um ritmo endógeno para a atividade da enzima, e em outras espécies, como milho e cevada, a atividade da enzima muda rapidamente com a transição luz/escuro (Stitt et al., 1988; Huber et al., 1989). O mecanismo de ativação pela luz da SPS em folhas de

espinafre, não envolve mudanças da atividade máxima, mas alterações nas propriedades cinéticas, onde ocorre mudanças de afinidade da enzima com o substrato e de sensibilidade ao inibidor. Foi proposto então que a enzima poderia existir em duas formas distintas “in vivo” e a distribuição destas formas poderia ser rapidamente alterada (Stitt et al., 1988). Recentemente, foi proposto que o mecanismo que regula esta modificação covalente seria a fosforilação da proteína, onde no escuro, a SPS está fosforilada e inativa e sob iluminação a fosfo-SPS é desfosforilada e ativada (Huber & Huber, 1992).

Baseado na ocorrência ou não da ativação pela luz e na característica desta ativação, as plantas podem ser classificadas em três grupos: grupo I contém espécies onde a ativação pela luz, através da desfosforilação, envolve um aumento da  $V_{max}$  da atividade da enzima, e também afeta a sensibilidade a inibidores; grupo II, estão as espécies onde a ativação da luz não envolve mudança na  $V_{max}$ , mas altera as propriedades regulatórias da enzima, ou seja a sensibilidade ao substrato e inibidores, como o caso de espinafre; e grupo III apresenta espécies, como soja e tabaco, no qual a enzima não é aparentemente ativada pela luz, sendo que a luz aumenta a taxa do fluxo de carbono para sacarose, ao aumentar o nível de substrato para a ação da SPS, mas não regula a atividade da enzima. As espécies que são ativadas pela luz, grupo I e II, tendem a acumular açúcar solúvel como produto final da fotossíntese, e as do grupo III acumulam primariamente amido (Huber et al., 1989; Huber & Huber 1992).

Uma hipótese para este acúmulo de açúcares solúveis nas espécies do grupo I e II é a manutenção constante do “pool” de metabólitos, mesmo no escuro, e o aumento da síntese de sacarose na luz seria resultado do aumento da ativação da enzima. As espécies do grupo III, contém invertase ácida solúvel nos vacúolos das células das folhas que inibiriam o acúmulo da sacarose durante o período luminoso e estas plantas seriam mais sensíveis a uma inibição

da fotossíntese por retroinibição em resposta ao acúmulo de metabólitos. Então uma reciclagem excessiva da sacarose e outros açúcares no citoplasma poderia resultar em uma inibição da Ciclo de Calvin e fotossíntese, para estas plantas (Huber, 1989; Huber et al., 1989; Huber & Huber, 1992).

As plantas manipuladas geneticamente permitem um estudo mais direto do papel de enzimas como Fru1,6bisPase e SPS na síntese de sacarose, bem como de outros passos envolvidos neste metabolismo. Um passo importante é a troca reversível de Pi e triose-fosfato entre citosol e cloroplasto, catalisada pelos translocadores de triose fosfato (TPT). Foram obtidas plantas de batata transgênica antisense, com redução de 20 a 30% na expressão deste translocador e que apresentaram uma inibição da síntese de sacarose de 27 a 50%, durante o fotoperíodo, e cerca de duas a três vezes mais amido no final do período luminoso (Riesmeier et.al., 1993). Estas alterações da relação amido/açúcares solúveis também foi verificada em plantas de tabaco, com expressão alterada destes translocadores (Stitt & Sonnewald, 1995).

Plantas de tomate que superexpressam a enzima SPS de milho apresentaram um aumento de duas a três vezes de sacarose e da relação sacarose/amido e uma redução de 60 a 70% na expressão desta enzima em batata resultou em uma inibição de 50% da síntese de sacarose. O coeficiente de controle de fluxo da SPS para síntese de sacarose é cerca de 0,3 a 0,45 em batata, indicando que a enzima contribue para o controle da síntese de sacarose, mas não é o único sítio de controle (Stitt & Sonnewald, 1995).

A síntese de amido é regulada pela enzima ADPglucose pirofosforilase (AGPase), que é fortemente ativada por 3PGA e inibida por  $P_i$ , e a regulação baseia-se em mudanças na propriedade cinética, e tem pouca influência da quantidade da enzima. Outros intermediários glicolíticos como: fosfoenolpiruvato, frutose 1,6-bisfosfato e frutose 6-fosfato também ativam a enzima,

quando em altas concentrações. Devido a alta sensibilidade da enzima AGPase a 3-PGA e  $P_i$ , foi proposto e depois concluído que estes dois compostos tem um importante papel na regulação da biossíntese de amido (Preiss & Levi, 1980). Foi observado em cloroplastos isolados que uma queda no fornecimento de  $P_i$  leva a um decréscimo da relação ATP/ADP e uma restrição na redução de 3-PGA. Isto resulta em um aumento da relação 3-PGA/ $P_i$ , que ativa a enzima AGPase, aumentando a síntese de amido. A perda da ativação por 3-PGA em mutantes de *Clamylomonas reinhardtii*, resultou na diminuição da síntese de amido, e a superexpressão de uma enzima constantemente ativada, mesmo na ausência de ativadores, levou a um grande acúmulo de amido em plântulas de tomate. A regulação desta enzima “in vivo” tem duas funções: a ativação pelo aumento da relação 3PGA/ $P_i$  estimula a síntese de amido em resposta a um aumento de metabólitos e, a inibição pela queda da relação 3PGA/ $P_i$  protege contra um dreno excessivo de triose-P para amido, no cloroplasto (Stitt & Sonnewald, 1995).

Como dito anteriormente, a Fru2,6P<sub>2</sub> tem um papel importante na partição do carbono entre amido e sacarose e o aumento de sua concentração durante o fotoperíodo, leva a uma restrição da síntese de sacarose e um aumento da síntese de amido. Plantas transgênicas de tabaco que superexpressam a enzima frutose 6-fosfato 2-quinase do fígado de rato foram obtidas para aumentar o nível de Fru2,6P<sub>2</sub> e investigar o papel deste metabólito durante a fotossíntese. Medidas da fotossíntese demonstraram que níveis elevados de Fru2,6P<sub>2</sub> afetaram a partição de carbono durante o período luminoso: a sacarose se acumulou mais rapidamente em folhas de plantas selvagens que transgênicas e isto foi proporcional ao aumento da Fru2,6P<sub>2</sub> na folha. Em contraste, o amido se acumulou mais rapidamente na primeira hora do período luminoso em plantas transgênicas, que em selvagens, mas não houve uma correlação direta entre o nível de Fru2,6P<sub>2</sub> e a taxa de síntese de amido. Estes

resultados então mostraram que a Fru2,6P<sub>2</sub> inibe o fluxo de CO<sub>2</sub> para sacarose e estimula para amido, tendo portanto um papel dominante na regulação da partição do carbono ( Scott et al., 1995).

### **2.4.3 Regulação da fotossíntese por amido e sacarose**

A influência da acumulação de carboidratos na taxa de fotossíntese sempre teve um grande interesse, pois uma demanda inadequada pode diminuir a assimilação de CO<sub>2</sub>. A curto prazo sabe-se que o acúmulo de sacarose leva a uma desativação de enzima SPS e aumento de Fru 2,6-P<sub>2</sub>, resultando em uma diminuição da sacarose, menor reciclagem de P<sub>i</sub> no cloroplasto e mais metabólitos armazenados como amido no cloroplasto (Stitt, 1987; Stitt & Quick, 1989). Esta regulação a curto prazo da partição durante o fotoperíodo ocorre sem que a fotossíntese seja inibida, mas uma inibição mais severa da síntese de sacarose pode levar a uma limitação da fotossíntese por P<sub>i</sub>.

Com o objetivo de estudar o papel do acúmulo de carboidratos na taxa de fotossíntese a longo prazo, Stitt et al. (1990), usaram tabaco transgênico expressando invertase de levedura na parede celular, para inibir a exportação de sacarose e aumentar o acúmulo de carboidrato nas folhas. As plantas apresentaram em determinadas áreas das folhas elevada expressão da invertase e conseqüente acúmulo de açúcares solúveis e amido e queda da fotossíntese. Segundo os autores, esta diminuição na fotossíntese foi causada por uma diminuição no Ciclo de Calvin, mostrado por uma diminuição nos níveis de RuBP e 3-PGA, afetando outros processos envolvidos na fotossíntese, como diminuição da demanda por ATP e NADPH. A redução do Ciclo de Calvin-Benson também alterou a demanda por produto final. Os autores concluíram que o acúmulo de carboidratos leva a uma alteração da fotossíntese a longo prazo e

estas mudanças não envolvem somente a regulação por metabólitos e  $P_i$ , mas também, alterações nas atividades de muitas enzimas fotossintéticas.

Goldschmidt & Huber (1992), também estudaram a inibição da fotossíntese a longo prazo pelo acúmulo de carboidratos, em várias espécies de plantas que apresentavam diferentes características de acúmulo de carboidrato nas folhas. Os resultados mostraram uma inibição da fotossíntese em várias espécies, mas não em todas, e as mais fortemente inibidas apresentaram uma característica em comum: não acumulavam elevados níveis de sacarose. Os autores concluíram que a perda da capacidade fotossintética máxima devido ao produto final varia muito entre as espécies e é mais pronunciado em espécies que acumulam amido, mas o amido *per se* não está envolvido. Ao contrário, a perda pode envolver a reciclagem de sacarose e hexoses no citosol que resultará em uma queda do Ciclo de Calvin-Benson.

## **2.5 FOTOSSÍNTESE E ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO**

Um importante processo que também ocorre nas folhas é a redução do nitrato a amônia e incorporação ao esqueleto carbônico para formação de amino-ácidos. Esta assimilação de nitrogênio é dependente de luz pois necessita de ATP e de esqueleto carbônico ( $\alpha$ -cetoglutarato) gerados a partir da fotossíntese e, por sua vez, a capacidade fotossintética das folhas está positivamente correlacionada com o conteúdo de nitrogênio, pois grande parte deste nitrogênio é usado na síntese de componentes do aparelho fotossintético, sendo portanto processos coordenados um ao outro e à taxa de fotossíntese. Esta regulação evita competição indesejável e acúmulo de intermediários tóxicos,

permitindo a otimização de recursos e prevenindo oscilações no fluxo de metabólitos (Cheng et al., 1991; Cheng et al., 1992; Champigny & Foyer, 1992; Huber & Huber, 1992; Vincentz et al., 1993; Foyer et al., 1993; Foyer et al., 1994).

Nitrato é a forma predominante de nitrogênio disponível no solo e a nitrato redutase (NR) é a primeira enzima da assimilação do nitrogênio, que reduz o nitrato a nitrito, que é reduzido a amônia pela nitrito redutase e então incorporado a glutamina e glutamato pela glutamina sintase e glutamato sintase. A maioria das plantas possui a enzima ligada ao NADH com um pH ótimo de 7,5 e já foram encontrados outros dois tipos, uma NR que usa NADH ou NADPH como doador de elétrons, como no caso de arroz, milho e soja, e um tipo NADH-NR constitutivo, com pH ótimo de 6,5 (Wray & Fido, 1990). O primeiro tipo é a forma melhor caracterizada da enzima e a que será discutida a seguir.

A nitrato redutase está localizada no cruzamento das duas vias consumidoras de energia: assimilação de nitrato e fixação de carbono, então a modulação sincronizada desta enzima e das enzimas da síntese de sacarose serve para regular a curto prazo a partição do carbono fixado entre a síntese de sacarose e amino-ácidos. Sabe-se que a regulação da nitrato redutase em folhas de plantas superiores é complexa e envolve no mínimo dois componentes: a regulação molecular do nível da proteína/enzima nitrato redutase e a regulação da atividade da enzima pela fosforilação/defosforilação reversível da proteína (Champigny & Foyer, 1992; Huber & Huber, 1995; Ferrario et al., 1995)

Quanto à regulação genética, sabe-se que a luz regula a expressão dos genes para a NR, onde o nível de transcritos diminui no escuro e aumenta na luz e é necessário um sinal do cloroplasto para este controle. No escuro, o fornecimento exógeno de glucose, frutose ou sacarose pode manter ou induzir a atividade da NR, e esta indução sugere que a regulação da luz é, no mínimo em parte, mediada pela síntese de carboidratos produzidos durante a

fotossíntese, e o controle é provavelmente na transcrição (Cheng et al., 1992; Vincentz et al., 1993, Quillere et al., 1994). Glutamato e glutamina inibem a expressão da NR e a adição de glucose pode superar um pouco esta inibição, indicando que a ativação por açúcares e a inibição por compostos nitrogenados da enzima é uma resposta a mudanças na relação entre compostos de carbono e nitrogênio dentro da célula, sendo um mecanismo de otimizar o balanço de nitrogênio para carboidrato (Vincentz et al., 1993).

A base para o efeito da fosforilação da proteína na atividade da NR parece envolver mudanças na sensibilidade ao  $Mg^{+2}$ , onde a forma defosforilada não é afetada pelo  $Mg^{+2}$ , enquanto a forma fosforilada é fortemente inibida por este cofator. Há evidências de que a NR pode ser fosforilada em vários sítios “in vivo” e o estado defosforilado é encontrado em folhas iluminadas, enquanto folhas adaptadas ao escuro contém primariamente a forma fosforilada da enzima. Mudanças na quantidade da enzima podem também modificar a sua atividade, mas há casos onde a quantidade permanece constante, e a atividade se altera, na ausência de  $Mg^{+2}$ , indicando que outros mecanismos além da fosforilação podem estar envolvidos, como por exemplo NAD(P)H, que pode ativar parcialmente NR purificada “in vitro”, bem como Pi, 5'-AMP e FAD que além de serem ativadores efetivos, podem também reduzir a inibição por  $Mg^{+2}$  (Lillo & Ruoff, 1992; Huber & Huber, 1995). Portanto com base nestes resultados foi proposto que há dois mecanismos distintos para regulação da atividade da NR: a fosforilação/desfosforilação reversível da proteína, e a ativação mediada por metabólito envolvendo um sítio alostérico (Huber & Huber, 1995; Kaiser & Brendle-Behnisch, 1995).

Após a redução do nitrato a amônia, esta deve ser incorporada rapidamente e eficientemente pelas plantas e isto é realizado pela glutamina sintetase (GS), tendo a função, nas raízes, de assimilar amônia

diretamente do solo e, nas folhas, é também responsável pela reassimilação e detoxificação da grande quantidade de amônia perdida durante a fotorrespiração. A fotorrespiração envolve uma íntima integração entre o metabolismo do carbono e nitrogênio nas folhas pois os amino-ácidos são intermediários nos caminhos fotorrespiratórios e a amônia é liberada. A reassimilação da amônia é crucial para a economia de nitrogênio das plantas pois o fluxo respiratório é muito grande em comparação com as taxas primárias de assimilação do nitrato, e a perda da capacidade primária de reassimilar amônia, rapidamente interfere no processo de fotossíntese (Lea et al., 1990; Häusler et al., 1994a, b).

Nas folhas, a GS está presente em duas isoformas, citosólica e a cloroplastidial e a razão destas duas isoformas pode variar entre as espécies, como por exemplo, sabe-se que membros da família Leguminosae contém ambas as enzimas ativas nas folhas, enquanto membros da família Solanaceae (*Nicotiana tabacum*) contém apenas atividade da forma cloroplastidial em folhas maduras (Hirel & Gadal, 1980; Hirel et al., 1982; McNally et al., 1983; Tingey & Coruzzi, 1987; Lea et al., 1990)

Recentemente, com o advento de técnicas de transformação de plantas tem sido possível o estudo da regulação de diferentes enzimas, bem como seu papel no processo da fotossíntese. Um exemplo é o estudo do impacto sobre o metabolismo de carbono e nitrogênio, causado por mudanças na atividade da NR. Plantas transgênicas de *Nicotiana plumbaginifolia* com elevada atividade da NR, não apresentaram diferenças em relação à taxa de fotossíntese e respiração e com relação a atividade de SPS e PEP carboxilase. Apresentaram níveis similares de proteína, clorofila, amido e sacarose e, portanto, um aumento de cinco vezes na sua atividade foi insuficiente para um grande impacto na fotossíntese, produção de biomassa, nas condições de crescimento que as plantas estavam submetidas (Foyer et al., 1994).

Grandes alterações foram verificadas em plantas transgênicas com níveis reduzidos de atividade de NR, nos quais a capacidade de assimilar nitrogênio restringiu o crescimento e a taxa de fotossíntese. A atividade da enzima SPS foi semelhante à planta controle, mas a de PEP carboxilase aumentou significativamente e houve um acúmulo de carboidratos nas folhas. Os autores concluíram que há uma certa flexibilidade dentro das vias de assimilação de carbono e nitrogênio, sendo que um excesso da atividade da NR não leva a grandes alterações, provavelmente porque no seu estado natural esteja presente em um nível superior ao necessário para sua atividade máxima, e qualquer aumento na atividade tem pequenas consequências na partição do carbono entre síntese de sacarose e síntese de amino-ácidos (Foyer et al., 1994).

## **2.6 CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS DE RESERVA DE SEMENTES**

As proteínas da semente podem ser divididas em duas categorias: as proteínas de reserva, que incluem a maior parte das proteínas, e as proteínas “housekeeping” que são essenciais para a manutenção do metabolismo normal das células. A fração proteína de reserva contém poucos tipos diferentes de proteínas e pode ser definida como qualquer proteína que se acumula em grande quantidade durante o desenvolvimento da semente. São sintetizadas apenas nos órgãos de reprodução, propagação e dispersão, e sua função é fornecer uma reserva de nitrogênio, enxofre e carbono, às plântulas em início de desenvolvimento (Higgins, 1984; Kuhlemeier et al., 1987; Clercq et al., 1990; Shewry, 1995). Podem ser reconhecidas pela presença em depósitos discretos e pela quantidade e, na maioria dos casos, não possuem qualquer atividade

biológica, apesar de serem relacionadas como proteínas metabolicamente ativas (Shewry, 1995).

As proteínas de reserva são formadas de uma mistura de polipeptídeos, que podem ser divididos em grupos, diferindo nas propriedades químicas, mecanismos de síntese, processamento e deposição. Para angiospermas, há quatro grupos principais em termos de distribuição e utilização, e são: globulina 7S e 11S, albumina 2S e prolamina, onde as prolaminas estão presentes apenas em sementes de cereais e outras gramíneas, e os outros três grupos apresentam uma distribuição maior (Shewry, 1995).

Em leguminosas e na maioria das dicotiledôneas, a principal proteína de reserva é a globulina, inicialmente denominadas de legumina, que são solúveis em sais. São conhecidos dois grandes tipos de globulinas, denominadas de leguminas e vicilinas que apresentam coeficiente de sedimentação de 11 e 7, respectivamente. As globulinas do tipo leguminas 11S são as mais amplamente distribuídas sendo o principal componente de sementes de dicotiledôneas, e também de algumas monocotiledôneas, como arroz, aveia e palmeiras. Em tabaco a proteína 11,7S é o principal componente da proteína de reserva e é rica em ácido glutamínico e arginina e o conteúdo de metionina e cisteína é de 2 e 0,7% respectivamente. Apesar do conteúdo de lisina ser baixo, a composição de amino-ácidos é parecida às demais sementes de leguminosas (Sano & Kawashima, 1983; Luthe, 1992).

As proteínas de reserva são inicialmente sintetizadas no citosol e retículo endoplasmático rugoso, com um peptídeo sinal que direciona diretamente o polipeptídeo nascente para dentro do lúmen do retículo endoplasmático, considerado o local de empacotamento da proteína e, também, da formação da ligação de enxofre. Em seguida são transportadas via aparelho e vesículas derivadas do complexo de Golgi para o vacúolo, onde são fragmentadas

e dão origem ao corpos proteicos, onde então as globulinas 11S adquirem sua estrutura final hexamérica (Shewry, 1995).

Os genes das proteínas de reserva são genes específicos do embrião, que são altamente regulados e que codificam uma variedade de proteínas que se acumulam durante a embriogênese e são armazenadas nas sementes secas. Primeiramente, a expressão destes genes é regulada temporariamente durante a embriogênese, sendo principalmente ativos nas fases iniciais, mas também podem ser expressos em níveis menores durante outras fases do desenvolvimento da planta (Goldberg et al., 1989). Já foi observado que genes para legumina em *Vicia faba* podem ser expressos no estágio globular do embrião, como também em células do suspensor e do endosperma indicando que as proteínas podem ser acumuladas em todo tecido do embrião, em estágio precisos do desenvolvimento, para permitir um fornecimento contínuo de carbono e nitrogênio durante as fases de crescimento e diferenciação (Wobus et al., 1995).

A regulação da expressão destes genes poder ser na transcrição e pós-transcrição durante o desenvolvimento e também pode haver um controle por metabólitos da expressão. Turner et al. (1990) estudando síntese de globulinas em uma variedade de ervilha contendo uma inserção do tipo transposon, que silenciava o gene para a enzima da ramificação de amido e, então, contendo elevada concentração de sacarose, encontraram níveis reduzidos de leguminas nestas sementes. Em *Vicia faba* foi mostrado que cotilédones incubados *ex planta* por 2 a 4 dias em meio com diferentes concentrações de açúcares solúveis, apresentaram diferentes níveis de mRNA de proteínas de reserva, em que o nível de mRNA para Legumina B foi dramaticamente reduzido com elevadas concentrações de hexoses. Os autores concluíram que as hexoses induzem um decréscimo no nível do mRNA devido a uma regulação na transcrição (Wobus et al., 1995).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Cultivo das plantas transgênicas e selvagens

Sementes de tabaco (*Nicotiana tabacum*), variedade Petite Havana SR1, de plantas transgênicas e selvagens, foram gentilmente doadas pelo Prof. Kenton Ko, Department of Biology, Queen's University, Kingston, Canadá. As sementes de tabaco transgênicas foram originadas de plantas transformadas com linhagens LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*, via protocolo de discos foliares, contendo vetores binários, com o inserto ligado ao gene de resistência a canamicina.

O gene construído foi uma fusão de sequências de DNA codificando a porção madura da proteína CAB do gene *LhcIIb* Tipo I de ervilha e do peptídeo trânsito da sub-unidade menor da RUBISCO (*rbcS*) e foi usada uma sequência de 30 bases da região 5' não traduzida do DNA à frente da região codificadora do peptídeo trânsito como um "intensificador" da tradução. A expressão do gene também foi dirigida pelo promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor, e os sinais de terminação da transcrição foram originados do gene *LhcIIb* Tipo I de ervilha (Figura 6).



**Figura 6.** Representação esquemática do gene inserido.

A integridade do transgene foi monitorada em todos os estágios por análises de endonucleases de restrição e por técnicas de hibridização de DNA e as plântulas transformadas foram selecionadas pela capacidade de enraizar e de crescer em meio contendo canamicina. Os transformantes selecionados foram transferidos para solo, autofecundados e obtidas sementes T1. Destas plantas T1 foram selecionadas as linhas com elevados conteúdos de mRNA do *LchbII* de ervilha, por densitometria laser. Foi medido também o aumento da proteína CAB das linhas selecionadas em relação às plantas selvagens, através de marcação simultânea de “blots” com anticorpo contra a proteína 33kDa do complexo de evolução de oxigênio do PSII (Oee1), usado como marcador interno do nível do PSII e CAB. A razão entre CAB e OEE1 foi usada para determinar o aumento relativo de CAB ao PSII. Os resultados mostraram um aumento de duas a três vezes relativo ao OEE1, indicando haver mais proteínas CAB por PSII (Ko et al, 1992).

As sementes de tabaco transgênico e selvagem foram inicialmente germinadas em substrato orgânico em sementeiras. Após um mês, as plântulas com cerca de 7-8cm foram transplantadas para vaso com uma mistura em proporções iguais de solo e substrato orgânico, onde permaneceram até o final dos experimentos e, periodicamente, foi acrescentada solução nutritiva de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950). Estas plantas foram cultivadas em câmara de crescimento controlada (Convion PGW 36), com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 14h de luz. A intensidade luminosa foi modificada de acordo com os objetivos do trabalho: para estudo de plantas crescidas em baixa intensidade luminosa, a intensidade foi de  $50\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  e para estudo de plantas crescidas em intensidade luminosa média, a intensidade usada foi de  $500\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

### **3.2 Estudo Anatômico e Ultra-Estrutural das Folhas de Tabaco**

Foi realizado um estudo preliminar da anatomia e de ultra-estrutura das folhas de plantas transgênicas e selvagens, no Departamento de Botânica do Instituto de Biosciências - USP, com a colaboração da Prof. Dr. Maria Emília Estelita. Para isto, foi usada a sétima folha completamente desenvolvida de plantas cultivadas em baixa luminosidade ( $50 - 80 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). As amostras foram retiradas da parte intermediária da lâmina foliar.

Para o estudo anatômico os pedaços de folhas foram fixados em FAA 50 (Johansen, 1940) e observados em microscopia óptica. Para microscopia eletrônica, os fragmentos de folhas foram fixados em tampão fosfato (pH 7,5) contendo glutaraldeído 2,5% e pós-fixado em 1% de tetróxido de ósmio por duas horas. Após desidratação progressiva em de etanol, os fragmentos foram embebidos em resina Spurr (Spurr, 1969), seccionados e tratados com acetato de uranila (Watson, 1958) e citrato de chumbo (Reynolds, 1963). As micrografias eletrônicas foram obtidas em um microscópio Zeiss M900 (Alemanha).

### **3.3 Caracterização das plantas transgênicas e selvagens quanto ao potencial fotossintético**

As plantas transgênicas e selvagens foram caracterizadas quanto ao potencial fotossintético para avaliar se o aumento do nível de proteínas CAB, principal componente da antena coletora de luz do PSII, resultou em aumento da atividade fotossintética nas plantas transgênicas em condições de baixa e média luminosidade. Para isso foram medidos os seguintes parâmetros: análise de trocas gasosas; eficiência do transporte de elétrons do PSII, através de medidas de fluorescência da clorofila *a*; determinação de metabólitos do Ciclo de

Calvin-Benson; conteúdo de carboidratos; determinação da atividade de enzimas relacionadas à assimilação de nitrogênio e síntese de sacarose.

### 3.3.1 Análise de trocas gasosas

A determinação da taxa de evolução de  $O_2$  para plantas de tabaco transgênica e selvagem foi realizada pelo método polarográfico empregando um eletrodo tipo Clark (LD-2 Hansatech, Inglaterra), usando discos foliares de  $10\text{cm}^2$  em condições saturantes de  $CO_2$  (5%), à temperatura de  $25^\circ\text{C}$ . O  $CO_2$  a 5% foi fornecido por  $200\mu\text{l}$  da mistura de  $KHCO_3/K_2CO_3$  2M por um feltro na base da folha do eletrodo de disco. A iluminação foi fornecida por um projetor Novomat 515 AF ( Braun, Alemanha) e a intensidades de luz usadas para construção de uma curva de resposta de luz para evolução fotossintética de oxigênio foram de: 25; 40; 65; 100; 200; 300; 450; 570; 720; 800 e  $1000\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , obtidas com o uso de filtros neutros de várias densidades.

A determinação da taxa fotossintética das plantas transgênicas e selvagens foi feita usando um analisador de gás infra-vermelho (IRGA - Infra-red Gas Analyser) Binos 100 (Rosemount, Alemanha) que mediu a taxa de absorção de  $CO_2$  pela folha. O analisador foi acoplado a uma câmara de alumínio formada de dois blocos com duas aberturas, onde a parte superior continha um anel de acrílico transparente, por onde foi fornecida luz actínica às folhas localizadas entre os blocos de alumínio e a abertura inferior foi coberta com "Parafilm". A luz actínica foi fornecida por dois braços de fibra óptica de uma fonte de luz fria KL 1500 (Schott, Alemanha), diretamente no topo da câmara em um ângulo de  $45^\circ$  e a intensidade de luz foi de  $100\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , para análises em baixa intensidade de luz e de  $1000\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . A temperatura da

câmara foi mantida em 25°C através de um circulador de água pelas cavidades da câmara. O deficit de vapor de água do ar da entrada da câmara foi ajustado a 18mbar através da passagem do ar circulante por um banho de água fria mantido a 15°C e as medidas de fotossíntese foram feitas em concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico e também em altas concentração de CO<sub>2</sub>, 850ppm, para eliminar o efeito de fotorrespiração (Figura 6). Este sistema foi acoplado a um aparelho de congelamento rápido das folhas, que permitiu o bloqueio instantâneo do metabolismo, à temperatura de -190°C. Os discos de folha (de 8cm<sup>2</sup>) congelados permaneceram armazenados em N<sub>2</sub> líquido, até serem usados para extração de metabólitos (Figura 7).

A determinação da taxa de fotossíntese foi obtida, para as duas concentrações de CO<sub>2</sub>, comparando a concentração de CO<sub>2</sub> na mistura gasosa anterior à entrada na câmara e, após a passagem pela folha e a taxa de assimilação foi determinada pela seguinte fórmula ( von Caemmerer & Farquhar, 1981; Long & Hällgren, 1985)

$$A=(f/S) \times \Delta CO_2 \times [(1-e_e/P)/(1-e_0/P)] \quad \text{onde:}$$

A: taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> por unidade foliar ( $\mu\text{molCO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )

S: área foliar ( 0,0008553m<sup>2</sup>)

$$f=F \times (1/22,4) \times [273,15/(273,15 + T)] \times (P/101,3) \times (1/60) \text{ (mol} \cdot \text{s}^{-1}) \quad \text{onde:}$$

F: vazão de ar ( l/min)

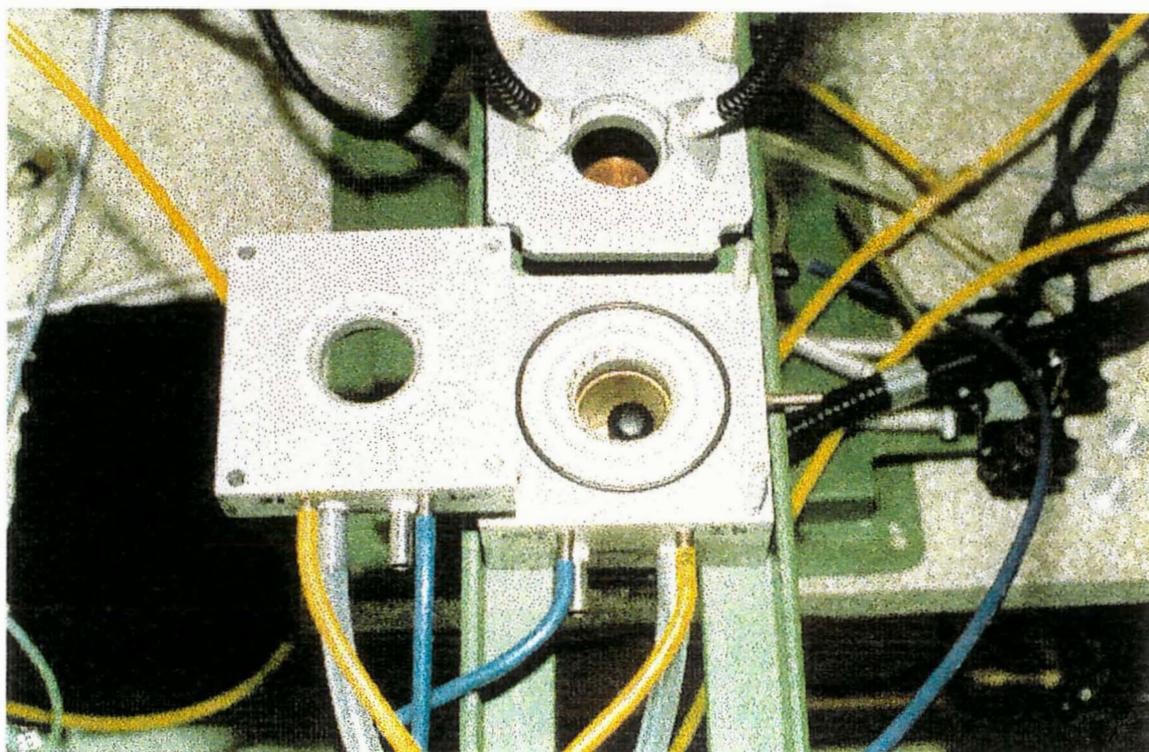
T: temperatura da câmara

$\Delta\text{CO}_2$ : diferencial de CO<sub>2</sub> (ppm)

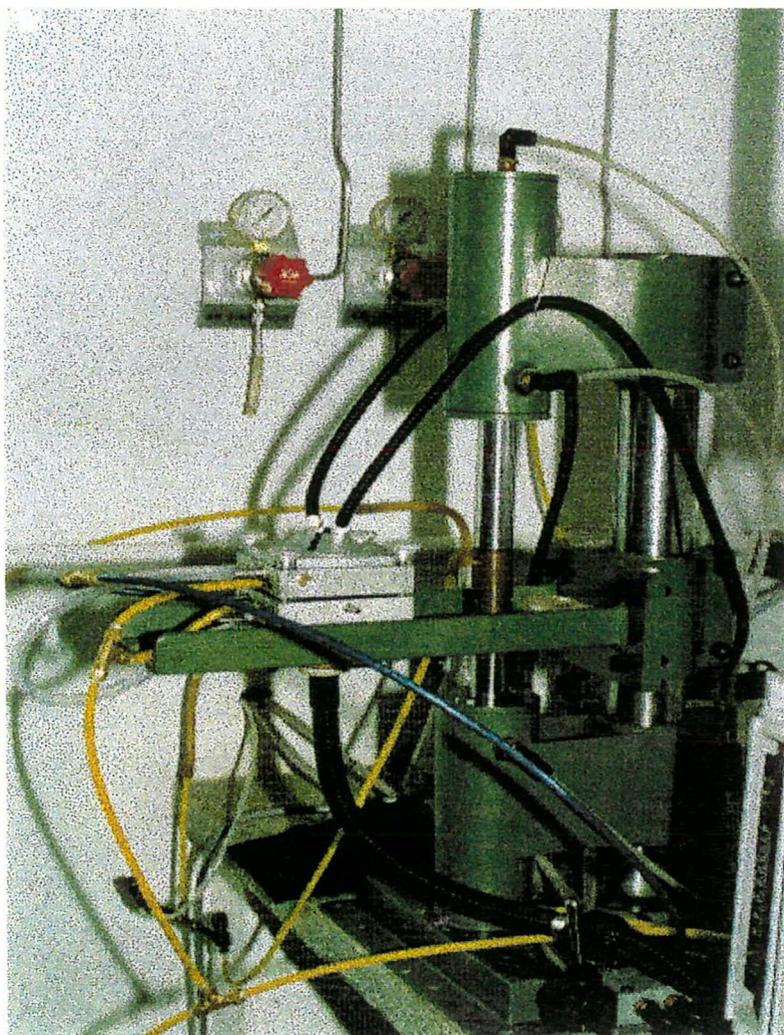
e<sub>e</sub>: pressão parcial de vapor de água antes da câmara (Kpa)

e<sub>0</sub>: pressão parcial de vapor de água após a câmara (Kpa)

P: pressão atmosférica (Kpa)



**Figura 7.** Câmara de análise da fotossíntese acoplada ao sistema de congelamento rápido das folhas.



**Figura 8.** Sistema de congelamento rápido associado ao analisador de gás infravermelho (IRGA) e fluorômetro, usados para medida de assimilação de CO<sub>2</sub> e fluorescência da clorofila *a*.

### 3.3.2 Análise de fluorescência da clorofila *a*

A análise de fluorescência de clorofila *a* de plantas transgênicas e selvagens foi realizada na câmara de análise de fotossíntese, onde foi acoplado um fluorômetro (PAM 101 Heinz Walz, Alemanha) equipado com uma unidade de controle de disparo de pulsos saturantes (PAM103). A análise foi feita nas mesmas condições descritas para medida da taxa fotossintética, variando apenas as intensidades de luz actínica, seguindo a metodologia descrita por Schreiber et al. (1986) e Genty et al. (1989), usando as terminologias e cálculos propostos por van Kooten & Snel (1990). Foi avaliado a emissão de fluorescência de clorofila da superfície superior das folhas (Figura 9).

Para isso as plantas foram deixadas no escuro por um período de 30 a 60 minutos para a completa oxidação do sistema de transporte de elétrons e,  $F_0$  foi medido em uma luz muito fraca ( $1\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) fornecido por uma fibra óptica localizada na janela inferior da câmara, aproximadamente a 5mm da superfície da folha, que também coletou os sinais de fluorescência (Figura 7). Para determinação da fluorescência máxima, ( $F_M$ ), foi aplicado um pulso de luz saturante ( $7500\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) em uma frequência de 30s, durante 1s. O nível de equilíbrio da produção da fluorescência foi monitorado durante a iluminação com luz actínica para as seguintes intensidades de luz: 20; 40; 80; 150; 290; 450; 600; 870; 1000 e  $1400\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Foram determinados os seguintes parâmetros para todos os pontos de intensidade luminosa:  $q_P$ , “quenching” fotoquímico;  $q_N$  “quenching” não fotoquímico; e  $\phi_{PSII}$  que refere-se a eficiência quântica do transporte de elétrons pelo PSII, para a construção de curva de resposta de luz ao parâmetros de fluorescência, onde:

$$q_P: (F'_M - F_s) / (F'_M - F_0)$$

$$q_N: 1 - [(F'_M - F'_0) / (F_M - F_0)]$$

$$F'_V / F'_M: (F'_M - F'_0) / F'_M$$

$$\phi_{PSII}: q_P \times F'_V / F'_M = q_P \times (F'_M - F'_0) / F'_M$$

**onde:**

$F_0$ : fluorescência mínima obtida em folhas adaptadas ao escuro

$F'_0$ : fluorescência mínima obtida em folhas após a iluminação actínica

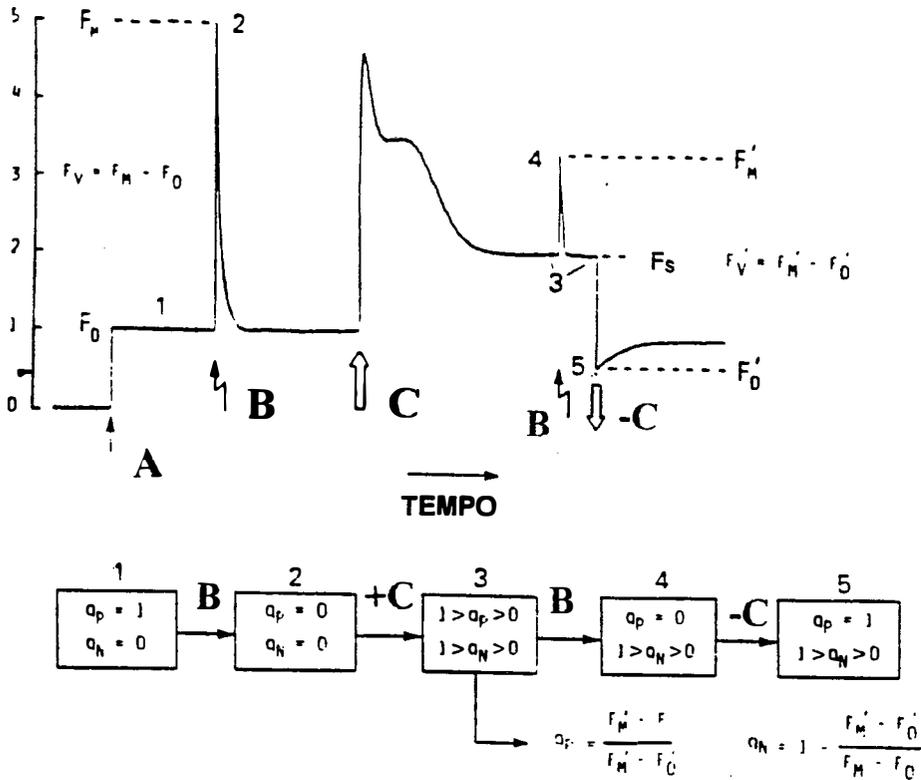
$F_M$ : fluorescência máxima obtida em folhas adaptadas ao escuro

$F'_M$ : fluorescência máxima obtida em folhas adaptadas à luz

$F_s$ : fluorescência no “steady state” (equilíbrio)

$F_V$ : fluorescência variável máxima obtida em folhas adaptadas ao escuro

$F'_V$ : fluorescência variável máxima obtida em folhas adaptads à luz



**Figura 9:** Princípios da análise de “quenching” da fluorescência da clorofila a pelo método dos pulsos saturantes. **A:** luz modulada para obtenção de  $F_0$ ; **B:** pulso de luz saturante (aproximadamente  $7500\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) para a obtenção de  $F_M$ ; **C:** luz actínica contínua ligada simultaneamente com o pulso de luz saturante (a cada 30s). Dependendo das condições de luz, cinco estados diferentes são distinguidos, correspondendo a pontos característicos da produção de fluorescência e coeficientes de “quenching”. **Indicadores de intensidade de fluorescência:**  $F_0$ : fluorescência mínima adaptado ao escuro;  $F_M$ : Fluorescência máxima adaptado às condições de escuro;  $F_V$ : Fluorescência variável máxima;  $F'_M$ : fluorescência máxima em qualquer estado adaptado a luz;  $F_S$ : fluorescência no estado fixo;  $F'_V$ : fluorescência variável máxima em qualquer estado adaptado a luz;  $F'_0$ : fluorescência mínima em qualquer estado adaptado a luz. **Parâmetros de fluorescência:**  $q_P$ : “quenching” fotoquímico e  $q_N$ : “quenching” não fotoquímico.

### 3.3.3 Preparo do extrato foliar para determinação de metabólitos

Após as determinações das taxas de fotossíntese pela análise de absorção de CO<sub>2</sub>, os discos foliares foram usados para determinação de metabólitos do Ciclo de Calvin-Benson e carboidratos. O metabolismo da folha foi interrompido pelo sistema de congelamento rápido acoplado a câmara de análise de trocas gasosas (Figuras 7 e 8) à temperatura de -190°C. Este sistema consiste em um pistão pneumático, localizados na parte inferior da câmara de análise, acionado por ar comprimido, onde é encaixado, segundos antes do acionamento da válvula, um cilindro de cobre, que permanece imerso em N<sub>2</sub> líquido (-190°C). Em frações de segundo, o cilindro de cobre rompe a membrana de “Parafilm” que sela a extremidade inferior da câmara, congelando a folha, que é então armazenada em envelopes de papel alumínio em N<sub>2</sub> líquido, até que seja realizada a extração dos metabólitos.

A extração foi realizada em 10% (v/v) de ácido perclórico, conforme descrito por Labate & Leegood (1989): o disco foliar congelado foi colocado em um almofariz pré-resfriado e macerado até completa pulverização em N<sub>2</sub> líquido com 1ml de HClO<sub>4</sub> 10% (v/v). Em seguida o extrato foi transferido para tubo de centrífuga do tipo “Eppendorf”, em gelo. O almofariz foi lavado com 0,5ml de HClO<sub>4</sub> 1% (v/v) e acrescentado ao extrato. O tubo foi centrifugado a aproximadamente 14000rpm por dois minutos. Após marcado o volume do tubo, tomado como volume do extrato, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e o “pellet” verde foi usado para determinação de feofitina, conforme descrito a seguir. O sobrenadante foi neutralizado a pH 6,5-7,0 com K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5M e em seguida foram acrescentados 200µl de uma suspensão de carvão ativado (200mg/ml) e então centrifugado por mais dois minutos a 14000rpm. O sobrenadante foi usado para análise de metabólitos e o “pellet” foi descartado.

### 3.3.4 Determinação de feofitina

Em condições de extração ácida, a clorofila é convertida a feofitina, que foi determinada de acordo com o método de Vernon (1960): o “pellet” verde resultante da extração de HClO<sub>4</sub>, foi transferido para tubo de vidro com 10ml de acetona 80% (v/v), que foi agitado e deixado durante uma noite à temperatura ambiente, para completa extração dos pigmentos. Em seguida foi centrifugado a 14000rpm por cinco minutos e a absorbância foi medida contra um branco de acetona 80% em 666 e 655nm e o conteúdo de feofitina foi calculado usando a seguinte fórmula:

$$\text{mg de feofitina.ml}^{-1} = [(26,03 \times A_{655}) + (6,75 \times A_{666})] \times (V/1000)$$

onde:

$A_{655}$ : absorbância a 655nm

$A_{666}$ : Absorbância a 666nm

V: volume de acetona 80% (ml)

A clorofila a partir de folhas frescas foi extraída em 10ml de 80% (v/v) de acetona e centrifugada no escuro por cinco minutos a 300g, segundo metodologia de Arnon (1949). A absorbância foi medida contra um branco de acetona 80% (v/v) em 652nm e a concentração de clorofila calculada pela seguinte expressão:

$$\mu\text{g.ml}^{-1} \text{ de clorofila} = \frac{A_{652} \times 1000}{34,5}$$

### 3.3.5 Determinação do conteúdo de metabólitos do Ciclo de Calvin-Benson

Todos os metabólitos foram medidos de acordo com metodologia de Lowry & Passonneau (1972), em um espectrofotômetro Hitachi U-3300 (Tokyo, Japão) através de reações enzimáticas acopladas que utilizam NADH ou NADPH. As determinações baseiam-se nas mudanças de absorvância, no comprimento de onda de 340nm, que ocorre quando o NADH ou NADPH passam do estado reduzido para oxidado, ou vice e versa. De acordo com cada metabólito a quantidade de extrato variou de 50 a 100µl, em um volume total de ensaio de 1ml, onde a absorvância foi lida ao final de cada reação. As enzimas utilizadas foram da Boehringer Mannheim (Alemanha).

#### 3.3.5.1 Determinação do conteúdo de Ácido 3-fosfoglicérico

O ensaio para determinação do conteúdo de PGA continha 50mM de imidazole-HCl, 1mM de MgCl<sub>2</sub>, 20mM de NaCl, e 2mM de β-mercapoetanol, ajustados a pH 7,1. Acrescentou-se a esta reação 50mM de NADH, 1mM de ATP, 11 unidades de PGK (fosfoglicerato kinase) e 11 unidades de GAP-dh (gliceraldeído 3-desidrogenase).



### 3.3.5.2 Determinação do conteúdo de Triose-fosfato e Frutose 1,6-bisfosfato

O ensaio para determinação de TP+FBP continha 50mM de Imidazole-HCl, 1mM de NaHAsO<sub>4</sub>, 1mM de EDTA (ácido tetra acético etilenodiamino) e 2mM de β-mercapoetanol, ajustados a pH 7,5, acrescidos de 1mM NAD<sup>+</sup>. Foram adicionadas 2,4 unidades de triose-fosfato isomerase e 1,8 unidades de gliceraldeído-fosfato desidrogenase para determinação de DHAP (dihidroxiacetona-fosfato) e então 0,09 unidades de aldolase para determinação de FBP.

**FBP → DHAP + gliceraldeído-3-P (aldolase)**

**DHAP → gliceraldeído-3-P (triose-P isomerase)**

**gliceraldeído-3-P + NAD<sup>+</sup> → <sup>arsenate</sup>PGA + NADH (gliceraldeído-3-P desidrogenase)**

É importante notar que a determinação de FBP inclui a de DHAP que deriva da sedoheptulose 1,7bisfosfato, devido ao duplo papel da aldolase.

**sedoheptulose 1,7bisP → DHAP + eritrose-4-P (aldolase)**

### 3.3.5.3 Determinação do conteúdo de Hexoses Fosfato

O ensaio para determinação de hexoses fosfato continha 100mM de Tris-HCl (2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol), (pH8,1) e 0,5mM de NADP<sup>+</sup>. Foram adicionadas 0,06 unidades de glucose 6-fosfato desidrogenase, seguido de 0,35 unidade de fosfogluose isomerase e 0,2 unidades de fosfoglucomutase.

**glucose-1-P → glucose-6-P ( fosfoglucomutase)**

**frutose-6-P → glucose-6-P ( fosfoglucoose isomerase)**

**glucose-6-P + NADP<sup>+</sup> → 6 P-gluconato + NADPH ( glucose-6-P desidrogenase)**

### **3.3.5.4 Determinação do conteúdo de ATP e ADP**

O ensaio para determinação de ATP continha 50mM de Tris-HCl (pH8,1) e 0,5mM de NADP<sup>+</sup>. Foram adicionadas 0,28 unidade de hexoquinase e 0,1 unidade de glucose 6-fosfato-desidrogenase.

**glucose + ATP → glucose-6-P + ADP (hexoquinase)**

**glucose-6-P + NADP<sup>+</sup> → 6-P-gluconato + NADPH (glucose-6-P-desidrogenase)**

**6-P-gluconato + NADP<sup>+</sup> → 6-P-gluconato desidrogenase + NADPH**

O ensaio para determinação de ADP continha 50mM de tampão fosfato (pH7,0) e 1,15 mM de NADH. Foram adicionadas 0,15 unidade de piruvato kinase e 0,2 unidade de lactato desidrase

**fosfoenolpiruvato + ADP → piruvato + ATP (piruvato kinase)**

**piruvato + NADH → lactato + NAD<sup>+</sup> ( lactato desidrase)**

### **3.3.6 Determinação do conteúdo de Sacarose**

O ensaio para determinação do conteúdo de sacarose continha 100mM de Hepes (N-2-hidroxietilpiperazine-N ácido 2-etanosulfônico) (pH 7,0), 5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5mM de ditioneitol (DTT), 0,02% (p/v) de albumina do soro bovino (BSA), 0,4mM de NADP<sup>+</sup> e 1mM de ATP. Foram adicionadas 0,5 unidade de glucose-6-fosfato desidrogenase (G6P-dh), seguida de 0,5 unidade de

fosfoglucose isomerase, 3 unidades de hexoquinase e 100 unidades de  $\beta$ -frutosidase.

**sacarose  $\rightarrow$  glucose + frutose ( $\beta$ -frutosidase)**

**glucose + ATP  $\rightarrow$  glucose-6-fosfato (hexoquinase)**

**frutose + ATP  $\rightarrow$  frutose-6-fosfato (hexoquinase)**

**frutose-6-fosfato  $\rightarrow$  glucose-6-fosfato ( fosfoglucose isomerase)**

**glucose-6-fosfato + NADP<sup>+</sup>  $\rightarrow$  6-fosfogluconato (G6P-dh)**

### 3.3.7 Determinação do Conteúdo de Amido

Para extração de amido, este foi hidrolisado a glicose e foi usado o “pellet” resultante da extração de feofitina, que foi lavado três vezes com 0,5ml de MES ( ácido 2-[N-Morfolino]etano-sulfônico) 0,5M (pH 4,5). Em seguida este “pellet” foi ressuspenso em 0,5ml de MES 0,5M (pH 4,5), onde foram acrescentadas 14 unidades de amiloglucosidade e 0,4 unidade de  $\alpha$ -amilase, e deixado à temperatura ambiente por uma noite. Em seguida a suspensão foi centrifugada, o “pellet” foi descartado e o sobrenadante foi usado para determinação de glicose, seguindo a metodologia de Jones et al. (1977).

O ensaio para esta determinação continha 100mM de HEPES ( pH 7,0), 5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5mM de DTT, 0,02% (p/v) de BSA, 40mM de NADP<sup>+</sup> e 0,1mM de ATP. Foi acrescentado 3 unidades de hexoquinase e 0,5 unidade de glucose-6-fosfato desidrogenase (G6P-dh).

**amido  $\rightarrow$  glucose ( amiloglucosidade +  $\alpha$ -amilase)**

**glucose + ATP  $\rightarrow$  glucose-6-P + ADP (hexoquinase)**

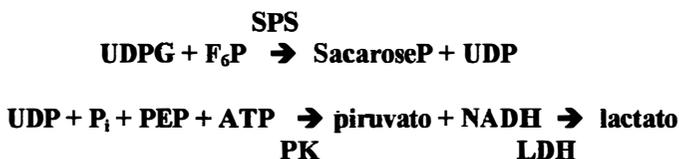
**glucose-6-P + NADP<sup>+</sup>  $\rightarrow$  6-P-gluconato + NADPH (G6P-dh)**

### 3.4 Medida da atividade da enzima Sacarose Fosfato Sintase

Para determinação da atividade máxima da enzima SPS, foi usada a metodologia descrita por Huber et al. (1989), onde discos foliares de 10cm<sup>2</sup> coletados duas horas após o início do período luminoso, foram macerados em N<sub>2</sub> líquido com 1ml do tampão de extração composto por 50mM de Mops-NaOH (ácido 3-(morfolino) propanosulfônico), (pH 7,5), 15mM de MgCl<sub>2</sub>, 1mM de EDTA, 2,5mM de DTT e 0,1% (v/v) de Triton X100. O extrato foi centrifugado em microcentrífuga por 5 minutos e foi retirada amostra para determinação de clorofila. O ensaio foi realizado em condições limitantes de substrato e condições para V<sub>max</sub> via formação de UDP (uridina 5-difosfato).

Para condição limitante de F<sub>6</sub>P (frutose 6-fosfato), 500µl de extrato foi incubado por 15 minutos a 25°C em 10mM de UDPG (uridina 5-difosfato glucose), 3mM de F<sub>6</sub>P, 12 mM de G<sub>6</sub>P (glucose 6-fosfato), 10mM de P<sub>i</sub>, 50mM de Mops-NaOH, 15mM de MgCl<sub>2</sub> e 2,5mM de DTT, em um volume de 1ml. Para condição limitante de UDPG, o procedimento foi o mesmo exceto que a concentração de UDPG foi reduzida para 3mM e as de F<sub>6</sub>P e G<sub>6</sub>P aumentadas para 10 e 40mM respectivamente. Em condições de V<sub>max</sub>, o tampão de ensaio foi composto de 10mM de UDPG, 10mM de F<sub>6</sub>P, 40mM de G<sub>6</sub>P, 50mM de Mops-NaOH, 15mM de MgCl<sub>2</sub> e 2,5mM de DTT, e não foi adicionado P<sub>i</sub>. Em todos os casos a reação foi interrompida pela adição de 1ml de 30% de KOH, e o F<sub>6</sub>P que não reagiu foi destruído, colocando os tubos em água fervente por 10 minutos.

Foi retirada uma alíquota para determinação de UDP, que foi determinado espectrofotometricamente em 50mM de Hepes (pH 7,0), 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,3mM de NADH, 0,8mM de PEP(fosfoenolpiruvato). A reação foi iniciada com 4 unidades da enzima piruvato kinase e 14 unidades de lactato desidrogenase.



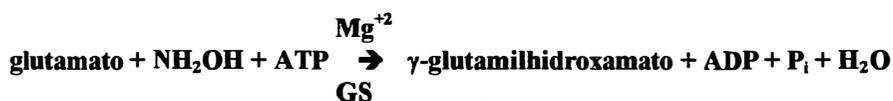
### 3.5 Determinação da atividade das enzimas da assimilação do nitrogênio

Como discutido no capítulo Revisão desta tese, a assimilação de nitrogênio e a fotossíntese são processos coordenados e as enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase têm funções cruciais neste processo de assimilação de nitrogênio. Estas enzimas foram portanto estudadas nas plantas transgênicas e selvagens de tabaco para análise de possíveis modificações na atividade em resposta a diferentes taxas fotossintéticas destas plantas.

#### 3.5.1 Medida da atividade da Glutamina Sintetase

Para a enzima GS os procedimentos de extração e ensaio para a medida da atividade máxima foram os descritos por Lea et al. (1990), onde discos foliares de 10cm<sup>2</sup> foram macerados em N<sub>2</sub> líquido com 1ml de tampão de extração composto de 100mM de Tris-HCl (pH 7,8), 1mM de EDTA, 1mM de DTT, 10mM de MgSO<sub>4</sub>, 100mM de KCl, 0,1% (v/v) de 2 β-mercaptoetanol, 0,5% (v/v) de Triton X-100 e 20% (v/v) de glicerol, sendo então centrifugado em microcentrífuga a 4°C por dois minutos. Após retirada amostras para análise de proteína e clorofila, a atividade da enzima foi determinada usando hidroxilamina

(NH<sub>2</sub>OH) como substrato e a formação de  $\gamma$ -glutamilhidroxamato foi quantificado com cloreto férrico acidificado.



O tampão para ensaio continha um volume total de 0,5ml, 100mM de Tris-HCl (pH 7,8), 50mM de glutamato, 5mM de hidroxilamina hidrolórica, 50mM de MgSO<sub>4</sub> e 20mM de ATP. A reação foi iniciada com 100 $\mu$ l do extrato e incubada a 30°C por 20 minutos e interrompidacom a adição de 0,35ml de reagente cloreto férrico (0,67M cloreto férrico, 0,37M de HCl e 20% (w/v) de ácido tricloroacético). A proteína precipitada foi removida por centrifugação em microcentrífuga por 5 minutos e foi medida a absorbância do sobrenadante em 540nm. Foi construída uma curva de calibração usando  $\gamma$ -glutamilhidroxamato como padrão. A taxa de formação do produto dependente da enzima foi linear por mais de 30minutos e proporcional à quantidade de extrato.

### 3.5.2 Medida da atividade da Nitrato Redutase

Para a enzima NR foram dois os procedimentos de extração. Inicialmente foi seguida a metodologia de Wray & Filner (1970), onde discos foliares de 10cm<sup>2</sup> foram macerados em N<sub>2</sub> líquido com 1ml de tampão de extração composto de 100mM de Tris-HCl (pH 7,5) e 1mM de cisteína, sendo então centrifugado e macerado em microcentrífuga a 4°C por dois minutos. Após retiradas amostras para análise de proteína e clorofila, a atividade da enzima foi determinada usando nitrato de potássio como substrato e a formação de nitrito foi quantificada através da formação de um sal diazônio, durante a reação em meio

ácido do nitrito com a sulfanilamida e o posterior aparecimento de um complexo colorido resultante da reação do diazônio com o N-(1-naftil) etilenodiamino.

O tampão de ensaio continha, em um volume total de 1ml, 50mM de tampão fosfato (pH 7,5), 10mM de  $\text{KNO}_3$ , 0,1mM de NADH. A reação foi iniciada com 200 $\mu\text{l}$  de extrato e incubada a 25°C por 20 minutos e terminada pela adição de 1ml do reagente 1% (w/v) sulfanilamida em HCl 3N e 1ml de 0,02% (w/v) N-(1-naftil) etilenodiamino dihidroclorido. Após 15 minutos, a proteína precipitada foi removida por centrifugação em microcentrífuga por cinco minutos e foi medido a absorbância do sobrenadante em 540nm. A leitura foi convertida para quantidade de nitrito através de uma curva padrão pré-estabelecida (0-100nmol de nitrito).

A outra metodologia usada, mediu além da atividade da enzima, a sensibilidade ao  $\text{Mg}^{+2}$ , como uma maneira de estudar o estado de fosforilação da enzima. Para isso, discos foliares de 10cm<sup>2</sup>, coletados duas horas depois do início do fotoperíodo, foram macerados em  $\text{N}_2$  líquido com 0,5ml de tampão de extração composto de 0,1M de Hepes (pH 7,5), 2mM de DTT, 1mM de fenilmetilsulfonil florido (PMSF) e 10mM de  $\text{MgCl}_2$ , somente para ensaio com  $\text{Mg}^{+2}$ . Após centrifugação por cinco minutos em microcentrífuga à 4°C, foram separadas amostras para determinação de proteína e clorofila e a atividade foi medida usando nitrato de potássio como substrato, em meio com  $\text{Mg}^{+2}$  e sem  $\text{Mg}^{+2}$ .

O tampão de ensaio com  $\text{Mg}^{+2}$  era composto de 0,5ml de tampão de extração mais 0,5mM de NADH e 5mM de  $\text{KNO}_3$  e a reação foi iniciada com 100 $\mu\text{l}$  do extrato e incubada por 5 minutos a 25°C. A reação foi interrompida pela adição de 1ml do reagente 1% (w/v) sulfanilamida em HCl 3N e 1ml de 0,02% (w/v) N-(1-naftil) etilenodiamino dihidroclorido. Após 15 minutos, a proteína precipitada foi removida por centrifugação em microcentrífuga

por cinco minutos e foi medida a absorvância do sobrenadante em 540nm. A leitura foi convertida para quantidade de nitrito através de uma curva padrão pré-estabelecida (0-100nmol de nitrito).

Para ensaio sem  $Mg^{+2}$ , o tampão continha 0,5ml da tampão de extração mais 0,5mM de NADH e 5mM de  $KNO_3$ . O tubo permaneceu incubado por 10 minutos a 25°C com 15mM de EDTA. A reação foi iniciada com 100µl de extrato e incubada por 5 minutos a 25°C. Os procedimentos para interromper a reação e para leitura da quantidade de nitrito foram os mesmos que os anteriores.

As metodologias para determinação de proteína e clorofila foram as mesmas para as enzimas GS e NR, onde para proteína foi seguida a metodologia de Bradford (1976), usando albumina de soro bovina como padrão e a clorofila foi determinada segundo Arnon (1943), conforme descrito em 3.2.4.

### **3.6 Determinação do conteúdo de amido e caracterização de proteínas de reserva das sementes**

O objetivo desta parte do projeto foi investigar se as plantas transgênicas apresentavam alterações em relação às plantas controle, independentes da capacidade fotossintética. Foi investigado o conteúdo de amido e de proteínas de reserva das sementes

### **3.6.1 Determinação do conteúdo de amido das sementes**

Para determinação do conteúdo de amido das sementes, 100 sementes de plantas selvagens e 100 sementes de plantas transgênicas foram usadas para extração em N<sub>2</sub> líquido, que seguiu o mesmo procedimento descrito em 3.3.7. Em seguida o “pellet” foi lavado com 0,5ml de tampão MES 0,5M (pH 4,5) e foram acrescentadas 14 unidades de amiloglucosidade e 0,4 unidade de  $\alpha$ -amilase, e deixado à temperatura ambiente por uma noite, para completa digestão. A suspensão foi então centrifugada, o “pellet” foi descartado e o sobrenadante foi usado para determinação de glicose, seguindo a metodologia de Jones et al. (1977), conforme descrito no item 3.2.7.

### **3.6.2 Determinação da composição e conteúdo das proteínas de reserva**

#### **3.6.2.1 Extração das proteínas de reserva das sementes**

Para a determinação da composição e conteúdo das proteínas de reserva da semente, as proteínas foram extraídas sequencialmente segundo a metodologia descrita por Gorstein et al. (1991) com algumas modificações. Inicialmente foi obtida a farinha a partir de 300mg de sementes das plantas selvagens e transgênicas, através de maceração em N<sub>2</sub> líquido.

Para a extração da fração I, 250mg da farinha foram homogeneizadas com 1,0ml de NaCl 0,5M ppor 1hora a 4°C. Após este período as amostras foram centrifugadas a 15000rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. A extração repetida com 0,5ml do solvente e os sobrenadantes foram combinados e o volume completado para 1,5ml. Esta fração I corresponde a albumina + globulina, e a separação das mesmas foi realizada por

diálise contra água, por 24 horas, a 4°C, onde o precipitado constituiu a fração globulina e o sobrenadante a fração albumina. o resíduo da fração I foi lavado com água destilada por duas vezes.

A fração II, formada pelas prolaminas I, foi extraída ressuspensando o resíduo em 1,0ml etanol 70% por 1 hora à temperatura ambiente, com agitações ocasionais. Após este período os extratos foram centrifugados a 15000rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. A extração repetida mais uma vez e os sobrenadantes foram combinados, e o volume completado para 2,0ml.

A fração III, formada pelas prolaminas II, foi extraída ressuspensando o resíduo com 1,0ml de etanol 70% + 4% de  $\beta$ -mercapoetanol por 30 minutos à temperatura ambiente, com agitações ocasionais. Após este período os extratos foram centrifugados a 15000rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. A extração repetida mais uma vez e os sobrenadantes foram combinados, e o volume completado para 2,0ml.

A fração IV, formada pelas glutelinas I e II, foi extraída ressuspensando o resíduo em 1,0ml de tampão borato 12,5mM (pH 10) + 3% de  $\beta$ -mercapoetanol + 0,5% de dodecil sulfato de sódio (SDS) por 30 minutos a temperatura ambiente, com agitações ocasionais, sendo então centrifugada por 10 minutos a 15000rpm. O sobrenadante foi separado, e o resíduo foi ressuspensado no mesmo tampão.

### **3.6.2.2 Eletroforese das proteínas de reserva em gel de poliacrilamida (PAGE)**

Após a extração, amostras de proteínas das diferentes frações foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS em sistema

descontínuo-desnaturante (Laemmli, 1970). Para isso, as frações de proteínas foram misturadas com tampão de amostra, composto por 6,5mM Tris-HCl (pH 6,8), 20% de glicerol, 2% de SDS, 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol, e 0,5% (w/v) de azul de brofenol e, em seguida, fervidas em banho-maria a 100°C por 5 minutos. As amostras foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), usando padrão de albumina do soro bovino, e foram aplicadas a concentrações constantes e iguais a 15mg de proteínas/ml, ou seja 25 $\mu$ g/canaleta.

O sistema foi constituído por dois géis: o gel de resolução contendo 12% de poliacrilamida e o gel de empacotamento (“stacking gel”) contendo 6% de poliacrilamida. A eletroforese foi conduzida em placa vertical, a 150V (50mA) por duas horas e meia.

Após a corrida, os géis foram corados com solução de coomassie azul brilhante R-250 a 0,2%, diluída em 20% de metanol, 4% de ácido acético e 76% de água destilada por 2 horas e descorados em solução de 20% de metanol, 8% de ácido acético e 72% de água destilada por uma noite. Para melhor definição do padrão de bandas, outros géis foram corados com coloração de nitrato de prata, segundo metodologia descrita por Gomes (1995).

Os pesos moleculares das proteínas resolvidas pela eletroforese foram calculados através do uso de um padrão de peso molecular, corrido nas mesmas condições, formado de: fosforilase B (PM 94000 D), albumina do soro bovina (PM 66000 D), albumina do ovo (PM 45000 D), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (PM 36000 D), anidrase carbônica (PM 29000 D), tripnogênio (PM 24000 D), inibidor tripsina (PM 20100 D), e lactoalbumina (PM 14200 D). A concentração das proteínas padrão foi de 0,5mg/ml em tampão da amostra, preparadas do mesmo modo que as proteínas do experimento.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

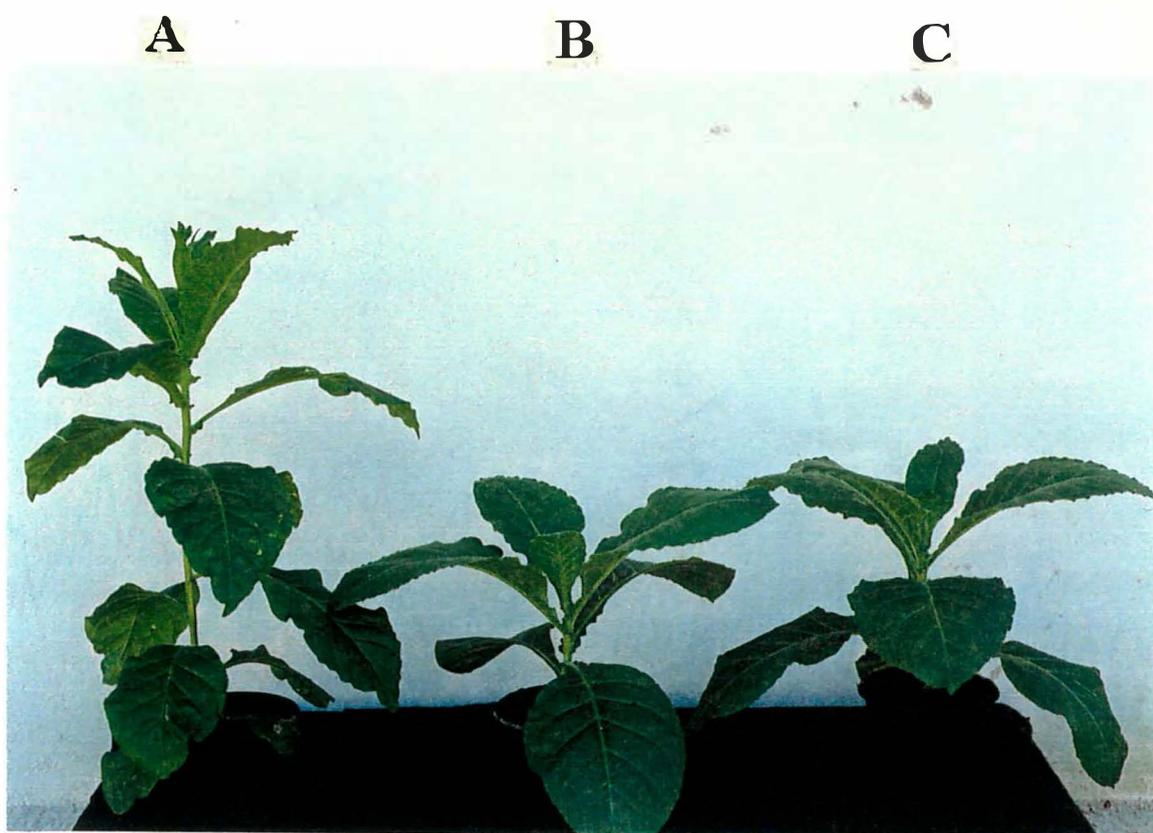
### **4.1 ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO E DE MORFOLOGIA DAS PLANTAS TRANSGÊNICAS E SELVAGENS**

Todas as plantas transgênicas, tanto as transformantes primárias (Ko, 1993, comunicação pessoal) como as linhagens autofecundadas, apresentaram diferenças de crescimento e de morfologia quando comparadas às plantas selvagens, independente das condições de crescimento, casa de vegetação ou câmara de crescimento controlada. As plantas transgênicas apresentaram maior vigor de crescimento, folhas mais largas com lâmina mais lisa e bainha contínua, e um atraso na época de florescimento, cerca de 30 dias em relação às plantas selvagens, quando cultivadas ao mesmo tempo em condições de baixa luminosidade ( $50-80\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) (Figura 10).

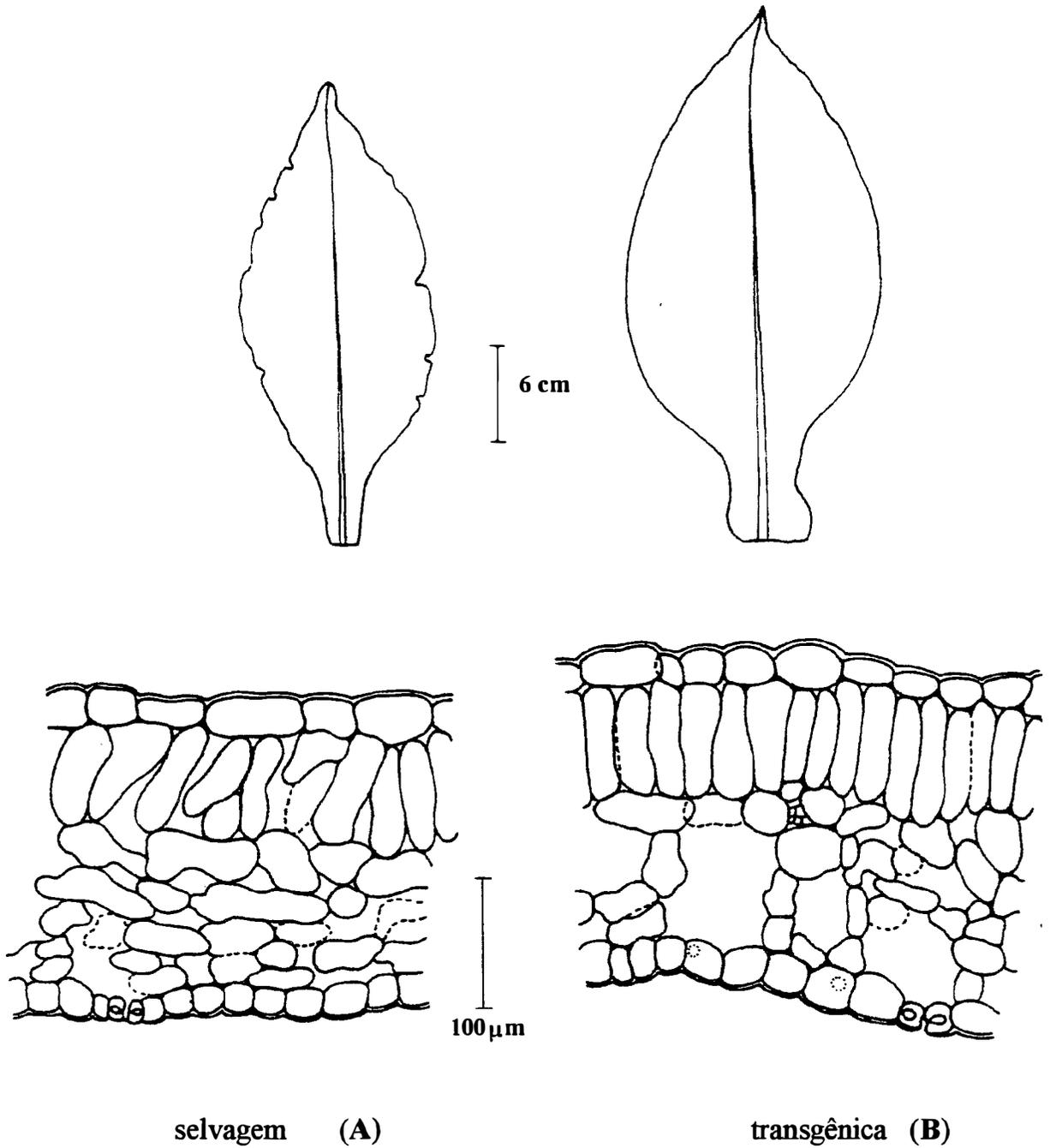
As análises comparativas de morfologia e anatomia da sétima folha de plantas transgênicas e selvagens, mostraram que as folhas das plantas transgênicas apresentam área maior e a base do pecíolo mais expandida. As folhas também são mais espessas com espaços intercelulares maiores, e aparentemente apresentam parênquima paliçádico mais organizado que as folhas de plantas selvagens (Figura 11).

As micrografias eletrônicas (Figura 12) mostraram que as plantas transgênicas possuem um número maior de cloroplastos por célula, dados confirmados pela análise do número de cloroplastos em cortes foliares (Mônica

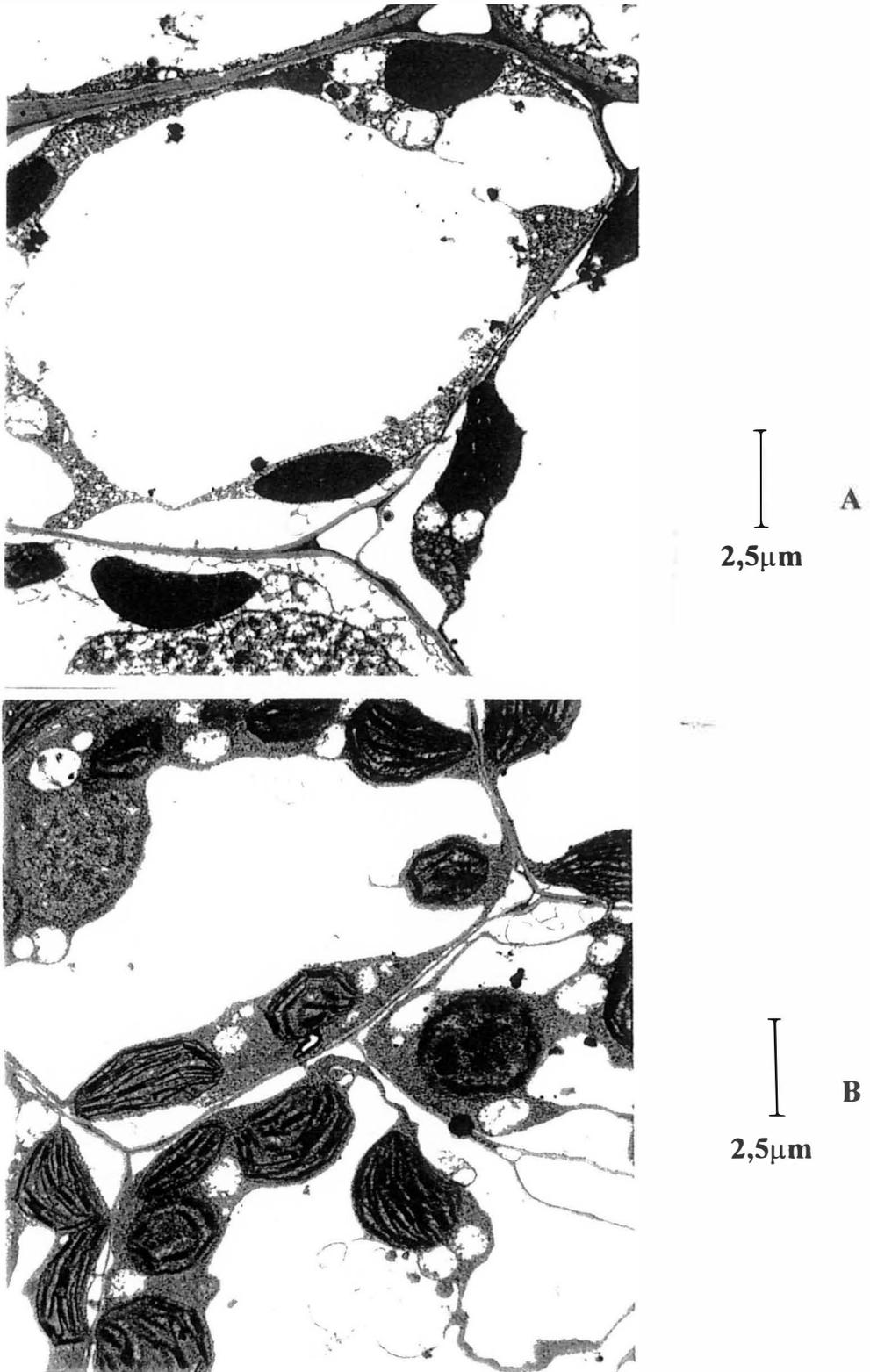
Labate, 1996, comunicação pessoal). As análises de secções finas dos cloroplastos (Figura 13) não mostraram nenhuma diferença quanto à organização do envelope, sistema de tilacóides e morfologia do estroma. Também não foram observadas alterações na morfologia e número de mitocôndrias, vacúolos e núcleo.



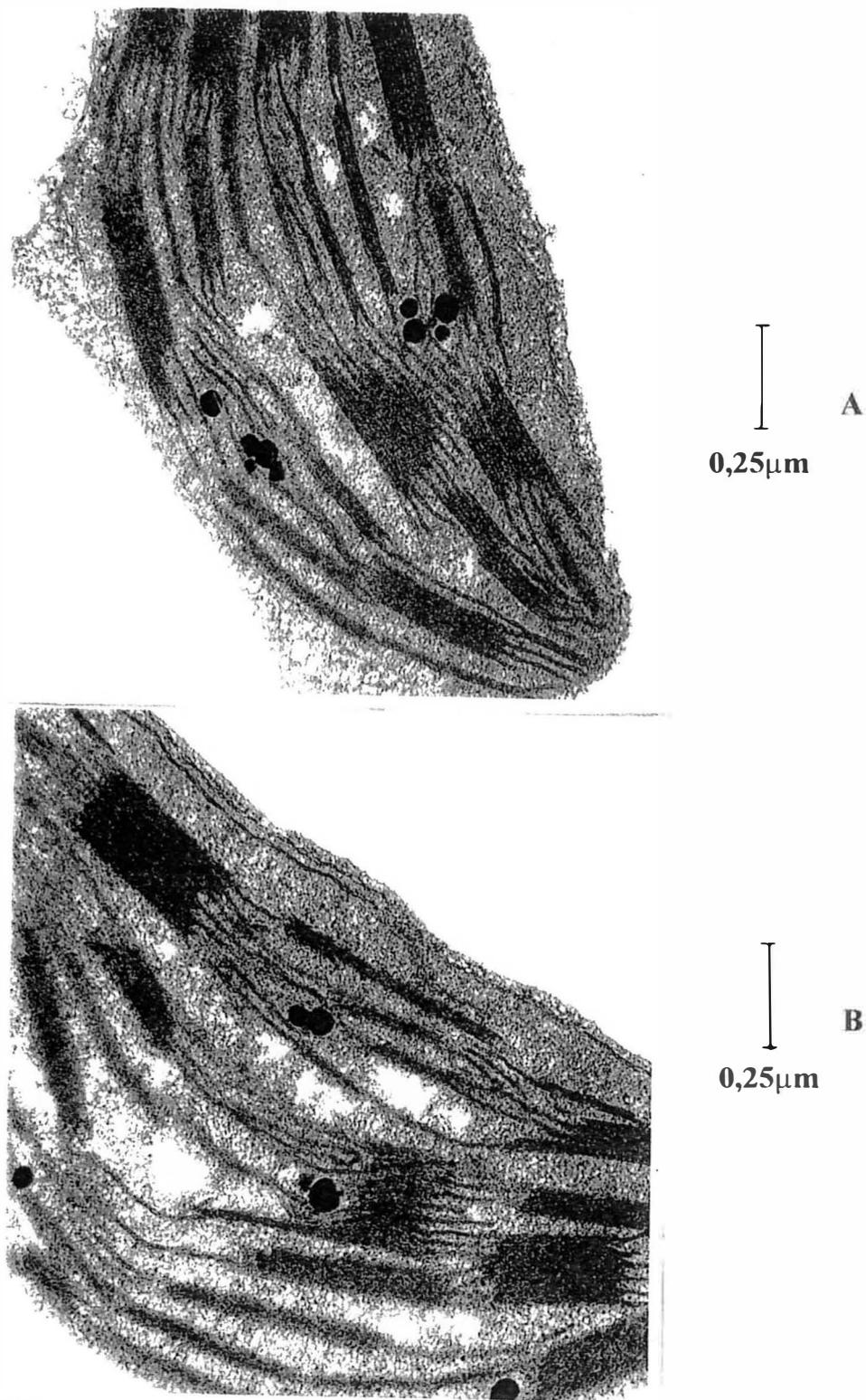
**Figura 10.** Diferenças fenotípicas apresentadas por plantas selvagem, **A** e transgênicas, **B** (CAB-1) e **C** (CAB-2) da mesma idade, cultivadas em câmara de crescimento controlada, a  $50\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .



**Figura 11.** Cortes de secções transversais da sétima folha de planta selvagem (A) e transgênica (B).



**Figura 12.** Micrografia eletrônica do tecido do mesófilo de folhas de planta selvagem (A) e transgênica (B).



**Figura 13.** Micrografia eletrônica de cloroplastos de plantas selvagem (A) e transgênica (B).

Ainda não se sabe quais mecanismos nas plantas transgênicas seriam responsáveis por estas alterações anatômicas no tamanho das folhas das plantas transgênicas. Já está bem estabelecido que o número de cloroplastos, conteúdo de clorofila e acumulação fotossintética de proteínas são fenômenos relacionados positivamente com tamanho da célula. Meehan et al. (1996), analisaram mutante variegado (*immutans*) de *Arabidopsis thaliana*, contendo setores verdes e brancos nas folhas, devido a ação de um gene nuclear recessivo. Estes autores verificaram que os setores verdes continham cloroplastos fenotipicamente normais e, os brancos, os plastídeos não continham pigmentos e estruturas lamelares. Análises moleculares revelaram que o mRNA do gene *lhcb* se acumulava em níveis insignificantes nestes setores brancos, se comparados aos verdes. A análise de populações homogêneas de protoplastos verdes e brancos de plantas transgênicas *immutans*, que expressavam o promotor do gene *lhcb* ligado ao gene reporter GUS, revelou que há uma relação positiva e linear entre a transcrição do gene *lhcb*, conteúdo de clorofila e tamanho de célula. Isto enfatiza a noção de que a expressão do gene *lhcb* e a biossíntese de clorofila são eventos correlacionados e, esta correlação, pode estar ligada a fatores relacionados ao tamanho celular.

Outras alterações observadas, como o aumento dos espaços intercelulares e a aparente organização do parênquima paliádico nas folhas das plantas transgênicas são fatores que podem contribuir para a maior capacidade fotossintética desta planta em condições de baixa luminosidade. A condutância do CO<sub>2</sub> em folhas mede a facilidade com que o CO<sub>2</sub> pode difundir das cavidades sub-estomatais para os sítios de carboxilação dentro dos cloroplastos. Evans et al. (1994), testaram a hipótese sobre a relação entre a condutância do CO<sub>2</sub> e a área da superfície dos cloroplastos expostos aos espaços intercelulares. Para isso compararam dois genótipos de tabaco, um selvagem outro transgênico,

transformado com o gene antisense direcionado ao mRNA da subunidade menor da RUBISCO, que possuía uma menor taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> mas o mesmo conteúdo de clorofila. Para alterar a anatomia foliar, as plantas foram cultivadas em dois ambientes diferentes: câmara de crescimento com alta luminosidade (fotoperíodo de 12h com 1000  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), e casa de vegetação com metade da intensidade luminosa da câmara de crescimento. Os resultados mostraram que as plantas cultivadas na câmara de crescimento possuíam folhas mais espessas, e maior área superficial do mesófilo foliar exposta aos espaços intercelulares, devido ao desenvolvimento do tecido paliçádico mais espesso e, independente do genótipo, a condutância do CO<sub>2</sub>, variou em proporção à área superficial do cloroplasto exposta aos espaços intercelulares.

Recentemente Vogelmann et al. (1996), observaram que as propriedades ópticas dos tecidos foliares individuais determinam como a luz é transmitida em uma folha intacta e influenciam na fixação de CO<sub>2</sub>. A epiderme da maioria das folhas é formada de células transparentes à luz visível e tem geralmente uma forma plano-convexa, criando lentes celulares capazes de coletar e focar a luz. Apesar desta capacidade de focalizar a luz ser conhecida há mais de 80 anos, apenas recentemente tornou-se possível medir esta intensificação de luz pelas células da epiderme foliar. A maioria das plantas é capaz de focalizar a luz para níveis elevados, assim a luz que entra no mesófilo pode ser concentrada em duas a três vezes acima da luz incidente. Estas propriedades das células da epiderme são importantes para as plantas que crescem na sombra, pois podem capturar luz difusa minimizando a quantidade de luz refletida e, também, para plantas crescidas sob luz solar plena, pois aumenta a probabilidade de intercepção pelo cloroplasto e sua absorção. A maioria das folhas tem tecido paliçádico, que são mais desenvolvidos em plantas cultivadas em alta intensidade luminosa, facilitando a penetração da luz solar direta dentro das folhas. A luz que passa

através do tecido paliçádico pode se perder e para contornar este problema existe o mesófilo esponjoso, que faz com que a luz retorne ao tecido paliçádico, aumentando a chance de ser absorvida pela fotossíntese. Através do ajuste da espessura, bem como da distribuição geométrica das células deste tecido, a estrutura foliar pode atuar no controle da distribuição da luz interna, potencializando a absorção de luz e maximizando a fixação de carbono de acordo com as condições ambientais de intensidade de luz.

Desde modo, as alterações observadas na anatomia foliar das plantas transgênicas de tabaco, como o aumento dos espaços intercelulares, que facilitam a difusão de CO<sub>2</sub> e, a aparente organização do parênquima paliçádico (Figura 11), que pode atuar no controle da distribuição da luz interna, podem estar contribuindo para a maior capacidade de assimilação de CO<sub>2</sub> destas plantas.

## **4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS PLANTAS TRANSGÊNICAS E SELVAGENS QUANTO AO POTENCIAL FOTOSSINTÉTICO**

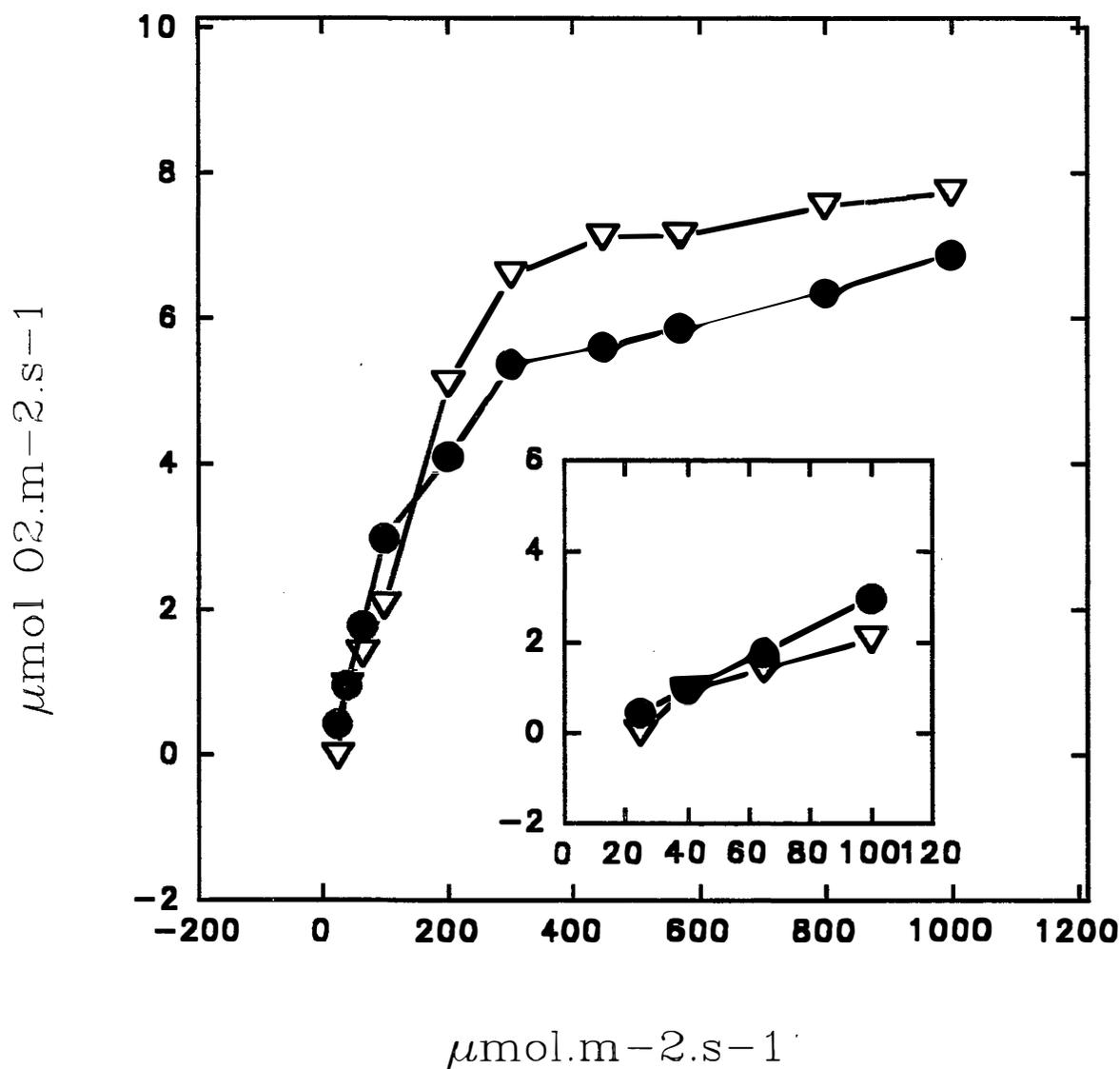
### **4.2.1 Análise de trocas gasosas**

As curvas de resposta da fotossíntese em função do aumento da intensidade luminosa indicam diferenças na capacidade fotossintética entre as plantas de tabaco transgênico e selvagem, quando cultivadas em baixa ( $50\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) ou média intensidade luminosa ( $500\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). A Figura 14 apresenta a curva de resposta da fotossíntese para plantas selvagens e transgênicas cultivadas em baixa intensidade luminosa e a taxa de fotossíntese foi determinada em condições de concentração de saturação de CO<sub>2</sub> (5%CO<sub>2</sub>), usando um eletrodo de oxigênio de disco foliar. Pode-se observar que em baixa luminosidade

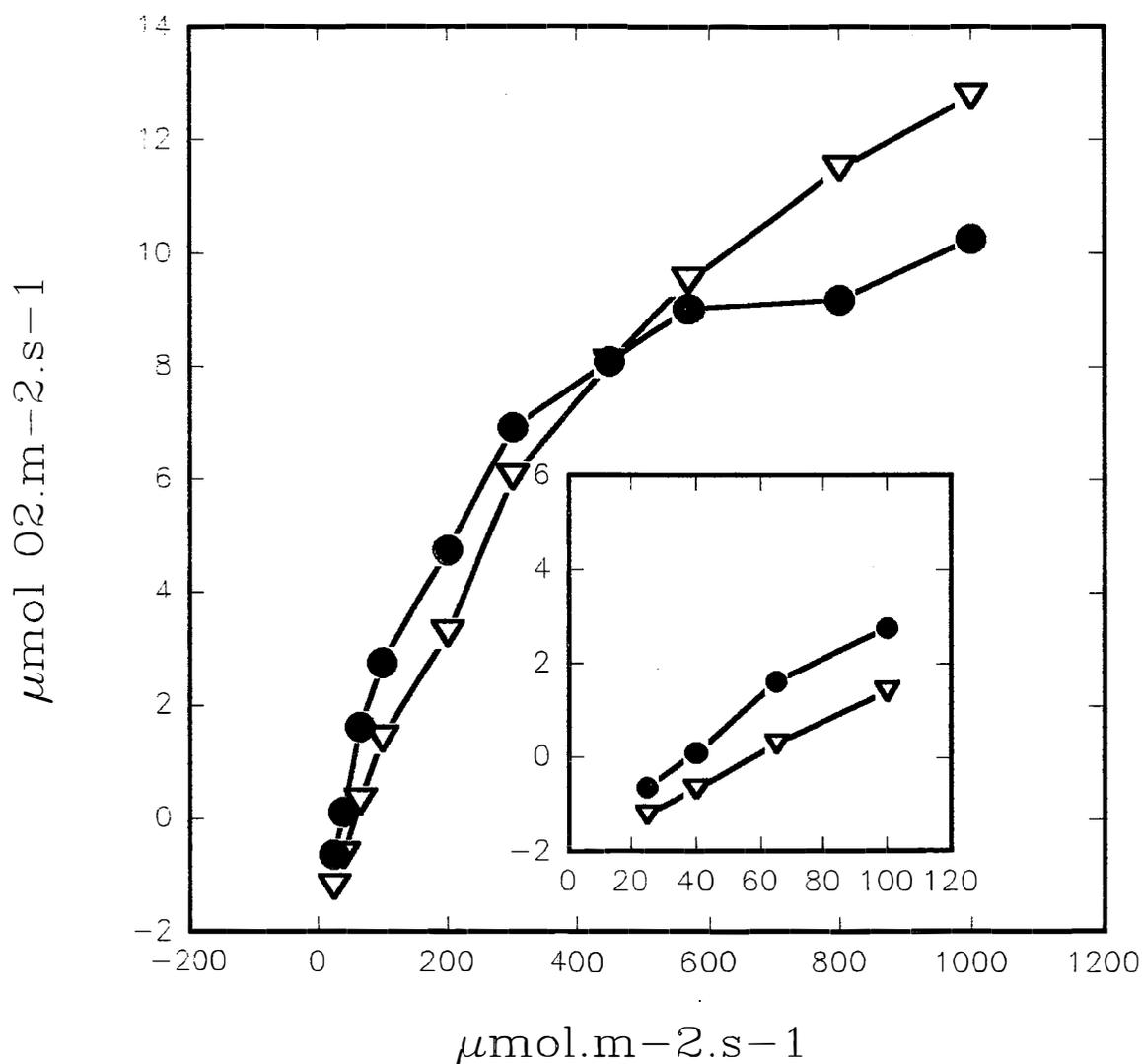
( $20-100\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) as plantas transgênicas apresentaram uma taxa fotossintética superior (inseto na Figura 14). Com o aumento da intensidade luminosa esta situação se inverteu, e as plantas transgênicas atingiram a saturação com uma taxa fotossintética menor, em uma intensidade de luz de próxima de  $300\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Nesta intensidade, o aumento da fotossíntese para as plantas selvagens foi maior e, a saturação aconteceu em intensidade luminosa maior, ao redor de  $450\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

Para as plantas cultivadas em intensidade luminosa maior, a resposta fotossintética apresentou o mesmo padrão (Figura 15) sendo que a taxa fotossintética foi maior para as plantas transgênicas entre  $20-500\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Com o aumento da intensidade luminosa ocorreu a saturação da fotossíntese nas plantas transgênicas, enquanto as selvagens não apresentaram saturação da fotossíntese em intensidade de  $1000\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

Pode-se observar então pelas Figuras 14 e 15, uma tendência das plantas transgênicas apresentarem uma taxa fotossintética superior em baixa intensidade de luz. O aumento da intensidade luminosa levou a uma saturação da fotossíntese das plantas transgênicas, enquanto nas plantas selvagens a assimilação de  $\text{CO}_2$  continua aumentando.



**Figura 14.** Curva de resposta da taxa de evolução de  $\text{O}_2$  em função do aumento na intensidade de luz em plantas transgênicas ( $\bullet$ ) e selvagens ( $\nabla$ ) de tabaco, cultivadas sob  $50\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . A fotossíntese foi medida em condições saturantes de  $\text{CO}_2$  (5%) a  $25^\circ\text{C}$ . Os dados são médias de 5 plantas de cada fenótipo e os desvios padrões foram inferiores a 10% da média.



**Figura 15.** Curva de resposta da taxa de evolução de O<sub>2</sub> em função do aumento na intensidade de luz em plantas transgênicas (●) e selvagens (∇) de tabaco, cultivadas sob  $500\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . A fotossíntese foi medida em condições saturantes de CO<sub>2</sub> (5%) a 25°C. Os dados são médias de 5 plantas de cada fenótipo e os desvios padrões foram inferiores a 10% da média.

O aumento da capacidade fotossintética de fixação de CO<sub>2</sub> das plantas transgênicas cultivadas sob condições de limitação de luz, foi observado em condições de altas concentrações de CO<sub>2</sub> (2000ppm de CO<sub>2</sub>), como pode ser verificado na Tabela 1. Estas análises foram conduzidas em um analisador de gás infra-vermelho acoplado a uma câmara de alumínio, onde foi fornecida luz actínica a intensidade luminosa de 100 e 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Pode-se observar que independente da concentração de CO<sub>2</sub>, a taxa de fotossíntese das plantas transgênicas foi sempre superior em relação às plantas selvagens, na intensidade de luz de 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ : 24% em condição atmosférica de CO<sub>2</sub>, 56% em 850ppm de CO<sub>2</sub> e 100% em condição de 2000ppm de CO<sub>2</sub>. Exceto para os dados de condição atmosférica, as diferenças observada foram significativas de acordo com o Teste F, e Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (Pimentel Gomes, 1976). Em alta intensidade luminosa, 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , as plantas transgênicas apresentaram uma tendência a redução da assimilação de CO<sub>2</sub> em relação às selvagens, em todas as condições analisadas, entretanto as diferenças foram não significativas, de acordo com o Teste F e Teste de Tukey.

A Tabela 2 apresenta os resultados de assimilação de CO<sub>2</sub> de plantas cultivadas em 500 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ : as análises realizadas com intensidade de luz de 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  apresentaram plantas transgênicas com maior assimilação de CO<sub>2</sub> que as selvagens, sendo 72% maior em condições de concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico e 39% em condições saturantes. Os resultados das análises com intensidade de luz de 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , mostraram que as plantas transgênicas têm uma taxa de fotossíntese cerca de 25% menor, independente da concentração de CO<sub>2</sub>. Todas estas diferenças foram significativas, de acordo com o Teste F e Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (Pimentel Gomes, 1976).

**Tabela 1:** Taxa de fotossíntese ( $\mu\text{molCO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) de plantas transgênicas e selvagens de tabaco, cultivadas em  $50\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , medidas em concentração atmosférica de  $\text{CO}_2$ , 850, e 2000ppm de  $\text{CO}_2$ , e temperatura foliar de  $25^\circ\text{C}$ . Os dados são médias de 10 plantas de cada fenótipo nas condições de  $100\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  e de 8 plantas para intensidade de  $1000\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

<b><math>100\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}</math></b>			
<b>genótipo</b>	<b>concentração de <math>\text{CO}_2</math></b>		
	atmosférica	850ppm	2000ppm
<b>selvagem</b>	2,92±0,91 a	1,94±0,51 b	2,04±0,63 b
<b>transgênico</b>	3,63±1,53 a	3,02±0,78 a	4,09±1,04 a
% alteração tra/s	+ 24%	+ 56%	+100%
<b><math>1000\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}</math></b>			
<b>genótipo</b>	<b>concentração de <math>\text{CO}_2</math></b>		
	atmosférica	850ppm	2000ppm
<b>selvagem</b>	7,58±0,92 a	8,82±0,69 a	5,70±1,40 a
<b>transgênico</b>	6,14±1,82 a	6,18±1,53 a	4,16±1,30 a
% alteração tra/s	- 23%	- 43%	- 37%

**Tabela 2:** Taxa de fotossíntese ( $\mu\text{molCO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) de plantas transgênicas e selvagens de tabaco, cultivadas em  $500\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , medidas em concentração atmosférica de  $\text{CO}_2$ , e 850ppm de  $\text{CO}_2$ , e temperatura foliar de  $25^\circ\text{C}$ . Os dados são médias de 10 plantas de cada fenótipo nas condição de  $100\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  e de 8 plantas para intensidade de  $1000\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

<b><math>100\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}</math></b>		
<b>genótipo</b>	<b>concentração de <math>\text{CO}_2</math></b>	
	<b>atmosférica</b>	<b>850ppm</b>
<b>selvagem</b>	2,72±1,0 b	2,18±0,78 b
<b>transgênico</b>	4,69±1,0 a	3,04±1,33 a
<b>% alteração tra/s</b>	<b>+ 72%</b>	<b>+39%</b>
<b><math>1000\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}</math></b>		
<b>genótipo</b>	<b>concentração de <math>\text{CO}_2</math></b>	
	<b>atmosférica</b>	<b>850ppm</b>
<b>selvagem</b>	14,06±2,2 a	11,30±1,94 a
<b>transgênico</b>	11,23±1,27 b	9,04±1,84 b
<b>% alteração tra/s</b>	<b>- 25%</b>	<b>- 25%</b>

Estes resultados indicam que o aumento da expressão do gene *Lhcb1\*2*, levou a um aumento da capacidade fotossintética das plantas transgênicas em condições limitantes de luz. Este aumento foi verificado em ambas as condições de intensidades de luz ( $50\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e  $500\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) em que as plantas foram cultivadas, como pode ser visto na inclinação inicial das curvas de resposta de evolução de  $\text{O}_2$  em função do aumento da intensidade de luz, Figuras 14 e 15, e nas Tabelas 1 e 2 em condições de  $100\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

Flachmann & Kühlbrandt (1995), para verificar se havia uma relação entre os níveis de expressão dos genes *cab* e a acúmulo do complexo da antena, construíram plantas de tabaco transgênicas com a adição de RNA antisense do gene *Lhcb1\*2*, apresentando portanto níveis reduzidos de mRNA *cab*. Os autores observaram que apesar dos níveis reduzidos de mRNA *cab*, a quantidade de complexo da antena do PSII nas plantas transgênicas não foi drasticamente reduzida. Quanto à capacidade fotossintética, a maioria das plantas transgênicas apresentou menor capacidade de evolução de  $\text{O}_2$  em relação às selvagens, ou seja menor eficiência fotossintética, principalmente em condições de baixa intensidade luminosa, como visto na Tabela 3. Embora os autores concluam que esta redução possa ser devida também a condições de cultivo, os resultados mostraram que plantas com menor expressão do genes *cab*, apresentaram menor capacidade fotossintética, sobretudo em condições limitantes de luz.

Os resultados encontrados no presente trabalho, associados aos do trabalho de Flachmann & Kühlbrandt (1995), sugerem que o nível de expressão dos genes *cab* podem influenciar na capacidade fotossintética de plantas cultivadas em condições limitantes de luz.

**Tabela 3.** Taxas fotossintéticas de plantas de tabaco selvagem e transgênicas (adaptado de Flachmann & Kühlbrandt, 1995).

Evolução de O <sub>2</sub> ( $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )		
Planta	Intensidade de luz ( $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )	
	33	58
selvagem	$1,9 \pm 0,2$	$4,6 \pm 0,6$
anticab-1	$1,0 \pm 0,5$	$3,4 \pm 0,3$
anticab-9	$1,1 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,2$
anticab-104	$1,8 \pm 0,5$	$4,0 \pm 0,9$
antiTP-2	$0,6 \pm 0,2$	$3,4 \pm 1,3$
antiTP-3	$1,0 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,2$
antiTP-40	$1,0 \pm 0,3$	$3,2 \pm 0,6$

#### 4.2.2 Análise de fluorescência da clorofila *a*

A análise da fluorescência da clorofila *a* foi realizada em condições atmosféricas de CO<sub>2</sub> e as medidas dos parâmetros foram feitas após o equilíbrio da fotossíntese em cada intensidade luminosa. A eficiência do transporte de elétrons pelo fotossistema II ( $\phi_{\text{PSII}}$ ) em resposta a irradiação foi determinada usando a metodologia descrita por Genty et al. (1989), seguindo as terminologias propostas por Kooten & Snel (1990).

A Figura 16 mostra as mudanças nos parâmetros da fluorescência da clorofila com o aumento da intensidade luminosa de ambos os genótipos cultivados em baixa intensidade luminosa ( $50\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). A Figura 16A mostra a variação do estado de oxidação do PSII ( $q_p$ ), ou seja, a proporção de fótons capturados que é convertida em energia química nos centros de reação do PSII para as plantas selvagens e transgênicas. Com o aumento da intensidade

luminosa há uma queda no  $q_P$  e, esta queda é menos acentuada para as plantas transgênicas, indicando que as mesmas permanecem mais oxidadas que as selvagens mesmo em elevadas condições de irradiação.

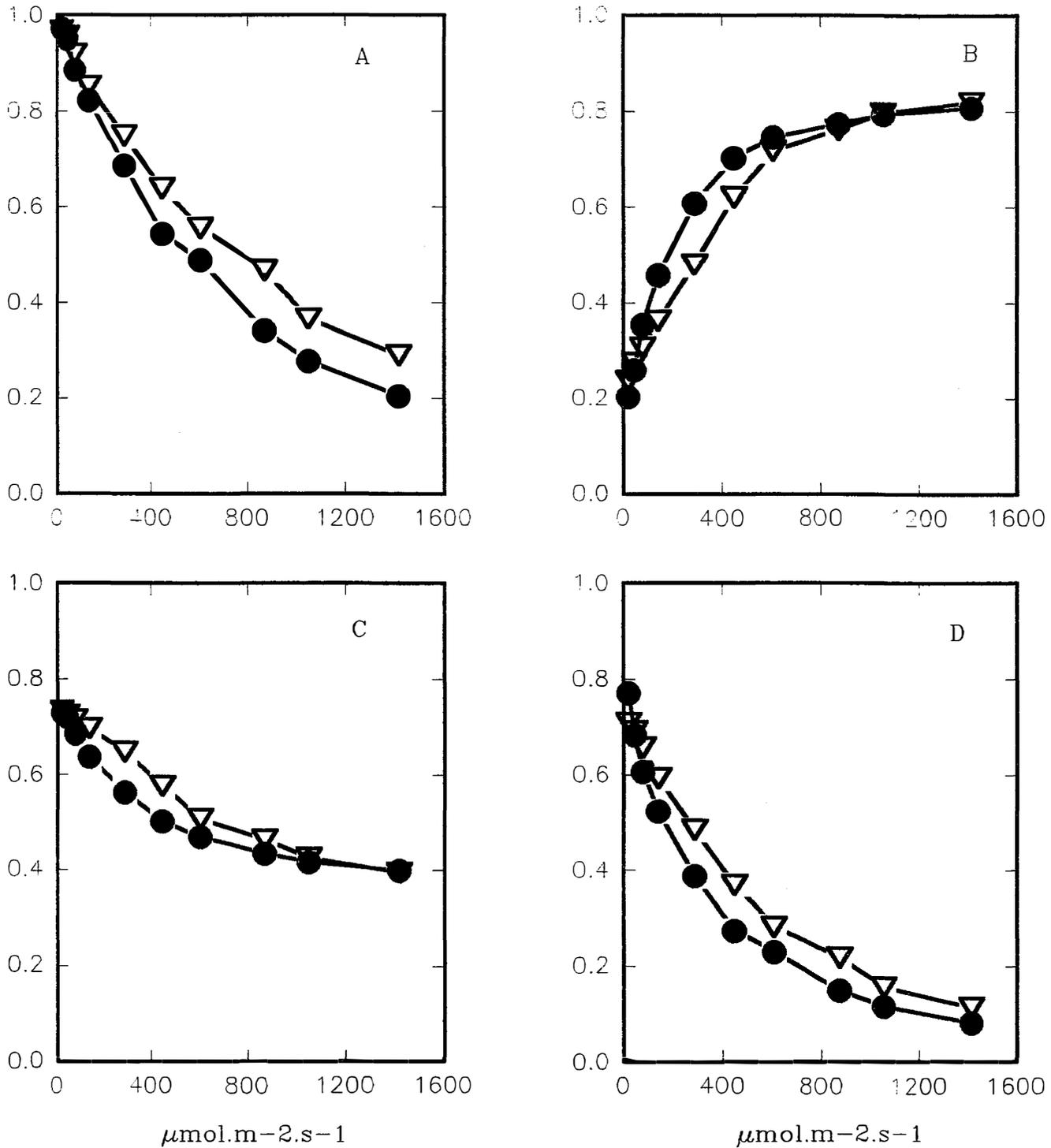
A Figura 16B mostra as variações do componente não fotoquímico,  $q_N$ , nas plantas transgênicas e selvagem. Este foi maior nas plantas selvagens em baixa luminosidade até cerca de  $600\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Acima desta intensidade de luz o  $q_N$  aumentou mais nas plantas transgênicas, atingindo valores maiores aos das plantas selvagens. Segundo Krause & Weis (1991), o mecanismo de “quenching” não fotoquímico funciona como controle e desativação de pigmentos excessivamente excitados, tendo então função protetora contra os efeitos destrutivos da alta luminosidade. Já foi observado também que em condições de  $q_N$  elevado a fotoinibição é diminuída. Como a fotoinibição do PSII parece aumentar com o estado reduzido da  $Q_A$ , a desativação térmica que ocorre nas condições de  $q_N$  elevado, aumenta a fração dos centros abertos presentes no estado de equilíbrio, impedindo então a fotoinibição (Krause & Weis, 1991). Como é esperado que as plantas transgênicas possuam uma antena coletora maior no fotossistema II em função do aumento da expressão do gene *cab* e, portanto uma maior capacidade de captação de luz, este aumento no  $q_N$  é um fator importante para proteção do fotossistema nas plantas transgênicas em condições de elevada intensidade luminosa.

Quick et al. (1991) estudando plantas transgênicas de tabaco com menor conteúdo de RUBISCO e, portanto menor capacidade fotossintética em relação às plantas selvagens, observaram que as plantas transgênicas possuíam maior  $q_N$  que as selvagens, nas condições limitantes para assimilação de  $\text{CO}_2$ . Häusler et al. (1994b), analisando plantas mutantes de cevada com menor atividade da enzima glutamina sintetase cloroplastidial, observaram que as plantas mutantes apresentavam menor capacidade fotossintética que as selvagens, em

condições de alta luminosidade e nestas condições o  $q_N$  das plantas mutantes foi maior que os das plantas selvagens. Buschmann (1995) analisando mutantes Aurea de tabaco, caracterizados por possuir menor conteúdo de clorofila, perda das lamelas dos grana, redução no complexo proteína-pigmento da antena coletora de luz e portanto maior eficiência fotossintética em condições de elevada intensidade luminosa, encontraram valores de  $q_N$  menores que os das plantas selvagens. Isto indica uma menor perda de energia via produção de calor e uma fotossíntese mais eficiente para o mutante, em condição de elevada intensidade luminosa. Estes dados mostram então que estas alterações no  $q_N$  são fenômeno comum que visam principalmente proteger o fotossistema das plantas em condições de estresse.

A Figura 16C apresenta as variações na eficiência de captura da energia de excitação pelos centros de reação do PSII abertos, estimada pela relação  $F'_v/F'_M$ . Este parâmetro diminui com o aumento da intensidade luminosa, e foi maior nas plantas transgênicas em intensidade de luz abaixo de  $600\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Acima desta intensidade, o valor foi semelhante ao das plantas selvagens.

A figura 16D mostra a variação da eficiência do transporte de elétrons pelo PSII ( $\phi_{\text{PSII}}$ ) que é medido pelo produto de  $q_P$  por  $F'_v/F'_M$  (Genty et al., 1989). Pode-se observar que com o aumento da intensidade luminosa há um diminuição no  $\phi_{\text{PSII}}$ , sendo esta diminuição menor nas plantas transgênicas, independente da intensidade luminosa. Então, em baixa luminosidade, a maior eficiência do transporte de elétrons pelo PSII nas plantas transgênicas, é devida principalmente a um maior  $F'_v/F'_M$  e menor  $q_N$ . Com o aumento da intensidade luminosa, acima de  $600\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , o  $q_P$  é o principal fator que determina a maior eficiência destas plantas.



**Figura 16.** Curva de resposta de  $q_P$  (A),  $q_N$  (B),  $F_v/F_M$  e  $\phi_{PSII}$  (D) em função de intensidade luminosa, medida em ar para plantas transgênicas (●) e selvagem (▽). Os dados são médias de 4 plantas de cada fenótipo e os desvios padrões foram inferiores a 5% da média.

Como foi mostrado no item anterior, 4.2.1, as plantas transgênicas apresentam uma maior capacidade fotossintética em condições limitantes de luz, e isto se deve principalmente à sua maior capacidade de regenerar ATP e NADPH, como será discutido no item a seguir. Os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* fornecem evidências da maior eficiência do transporte de elétrons pelo fotossistema II destas plantas independente da intensidade luminosa, que pode ser observada pelos valores de  $\phi_{PSII}$ , Figura 16 D, que são sempre maiores nas plantas transgênicas.

Em condição de alta luminosidade há uma saturação na fotossíntese das plantas transgênicas, e há duas hipóteses possíveis para esta inibição: 1) a superexpressão do gene *cab* leva a um excesso de luz absorvida causando um aumento na redução dos componentes do sistema de transporte de elétrons e a fotoinibição; ou 2) a fotossíntese pode estar sendo inibida pela restrição da reciclagem de  $P_i$  via síntese de amido e sacarose. Através da análise dos parâmetros de fluorescência fica claro que a irradiação elevada não leva a fotoinibição das plantas transgênicas, pois as mudanças em  $F'_v/F'_m$  e  $q_N$  fornecem um mecanismo eficiente de dissipação do excesso de energia que impede a redução extrema da  $Q_A$ . Com isso há um aumento do  $q_P$ , aumentando a eficiência do transporte de elétrons destas plantas ( $\phi_{PSII}$ ).

Então a limitação parece ser devida a restrição da reciclagem de  $P_i$ . Segundo diferentes autores ( Sharkey et al., 1986; Labate & Leegod, 1988; Stitt & Quick, 1989), em condições de saturação de luz e  $CO_2$ , a fotossíntese é limitada principalmente pela taxa de síntese de amido e sacarose que determinam a reciclagem de  $P_i$  para síntese de ATP nos cloroplastos. Como a demanda por  $P_i$  para fotofosforilação é maior devido ao aumento da capacidade de transporte de elétrons e, como a capacidade das plantas transgênicas em reciclar  $P_i$  não é suficiente nestas condições, há uma queda na síntese de ATP, limitando a

fotossíntese nestas condições. Pode-se verificar nos dados das tabelas 4 e 5, ítem 4.2.3 a seguir, que com o aumento da intensidade luminosa, ocorre uma restrição na síntese de ATP nas plantas transgênicas, verificada pela menor relação ATP/ADP, nestas condições.

#### 4.2.3 Conteúdo de metabólitos do Ciclo de Calvin

A Tabela 5 apresenta as mudanças no conteúdo de metabólitos de folhas de plantas cultivadas em baixa luminosidade sendo que os experimentos foram conduzidos em duas intensidades luminosas:  $100\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e  $1000\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e com concentração externa de 850ppm de  $\text{CO}_2$ , para minimizar os efeitos da fotorrespiração. Os valores de metabólitos estão próximos aos valores encontrados na literatura, de acordo com as condições de cultivo: intensidade de luz e temperatura (Labate & Leegood, 1990; Neuhaus et al., 1990; Stitt et al., 1990), como pode ser visto na Tabela 4.

**Tabela 4:** Valores de PGA, TP ( $\mu\text{mol.mg}^{-1}\text{Chl}$ ) e PGA/TP, para tabaco, espinafre e cevada, medidos em intensidade de luz de  $1000\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e temperatura de  $25^\circ\text{C}$  (dados extraídos de Labate & Leegood, 1990; Neuhaus et al., 1990; Stitt et al., 1990):

	Conteúdo de metabólito ( $\mu\text{mol.mg}^{-1}\text{Chl}$ )		
	PGA	TP	PGA/TP
tabaco	500	100	5,0
cevada	240	55	4,8
espinafre	350	60	5,7

**Tabela 5.** Conteúdo de metabólitos em plantas cultivadas em  $50\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Os dados são médias de 6 plantas  $\pm$  desvio padrão, onde TRA corresponde as plantas transgênicas e S as selvagens.

$100\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$									
Tipo de planta	conteúdo de metabólitos (nmol.mg-1Chl)						Relação de metabólitos (mol/mol)		
	PGA	TP	ATP	ADP	G6P	F6P	PGA/TP	ATP/ADP	G6P/F6P
TRA	353 $\pm$ 47	61 $\pm$ 8	181 $\pm$ 38	85 $\pm$ 32	43 $\pm$ 9	65 $\pm$ 38	5,8	2,2	0,7
S	364 $\pm$ 110	46 $\pm$ 21	74 $\pm$ 27	89 $\pm$ 51	92 $\pm$ 39	98 $\pm$ 40	8,4	0,8	0,9

$1000\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$									
Tipo de planta	conteúdo de metabólitos (nmol.mg-1Chl)						Relação de metabólitos (mol/mol)		
	PGA	TP	ATP	ADP	G6P	F6P	PGA/TP	ATP/ADP	G6P/F6P
TRA	259 $\pm$ 54	73 $\pm$ 17	89 $\pm$ 32	150 $\pm$ 49	217 $\pm$ 68	56 $\pm$ 27	3,5	0,6	3,9
S	320 $\pm$ 174	92 $\pm$ 21	121 $\pm$ 43	86 $\pm$ 37	174 $\pm$ 62	59 $\pm$ 7	3,5	1,2	2,9

Sabe-se que durante a fotossíntese, ATP é consumido nas reações catalizadas por 3-fosfoglicerato ~~kinase~~ e ribulose-5-fosfato kinase, que são reações reversíveis, da mesma maneira que a reação catalisada pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase que consome ATP. Como a reação de redução de PGA para triose-fosfato é mantida no equilíbrio durante a fotossíntese, a relação:

$$\frac{[\text{PGA}].[\text{ATP}]. [\text{NADPH}]. [\text{H}^+]}{[\text{Triose.P}]. [\text{ADP}]. [\text{NADP}^+]. [\text{P}_i]}$$

permanece próxima ao equilíbrio, e mudanças na relação entre PGA/TP, indicam mudanças na relação:

$$\frac{[\text{ATP}]. [\text{NADPH}]. [\text{H}^+]}{[\text{ADP}]. [\text{NADP}^+]. [\text{P}_i]}$$

Assim, a força assimilatória, que mede a capacidade do transporte de elétrons em regenerar ATP e NADPH, pode ser estimada pela relação PGA/TP (Dietz & Heber, 1986).

Pode-se observar que na intensidade luminosa de  $100\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , o conteúdo de PGA não difere entre as plantas transgênicas e selvagens, mas a razão PGA/TP é maior nas plantas selvagens, indicando uma limitação na redução de PGA para TP em função do fornecimento de NAPDH e

ATP. De fato o conteúdo de ATP é duas vezes maior nas plantas transgênicas em relação à selvagem, e como o conteúdo de ADP é praticamente o mesmo, a relação ATP/ADP é maior nas plantas transgênicas.

Em condições de baixa intensidade luminosa, a fotossíntese é limitada pela capacidade do transporte de elétrons em regenerar ATP e NADPH (Heber et al., 1987). Estes resultados indicam que em baixa luminosidade as plantas transgênicas têm uma maior capacidade de regenerar ATP, o que leva a uma maior redução de PGA e maior fotossíntese. Esta maior capacidade de regenerar ATP pela planta transgênica já havia sido observada através dos parâmetros de fluorescência da clorofila  $a$ , onde os valores de  $\phi_{PSII}$ , Figura 16 D, são sempre maiores nas plantas transgênicas, indicando a maior eficiência do transporte de elétrons pelo fotossistema II.

A relação G6P/F6P indica a compartimentação das hexoses dentro da célula, onde valores entre 1 e 2 mostram uma compartimentação no cloroplasto e a síntese predominante de amido, e valores entre 3 e 5 uma compartimentalização citoplasmática e síntese predominante de sacarose (Gerhardt et al., 1987). A relação G6P/F6P foi menor que 1 para as plantas transgênicas e selvagens.

Nos experimentos realizados na intensidade de luz de  $1000\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , pode-se observar que a relação PGA/TP foi similar para os dois tipos de plantas, mas a relação ATP/ADP foi menor para as plantas transgênicas. Conforme visto no item 4.3.2, o transporte de elétrons nestas condições não foi um fator limitante para a produção de ATP, indicando então uma limitação na reciclagem de  $P_i$ . Esta hipótese é enfatizada pelos dados de G6P/F6P, onde os valores de 3,9 e 2,9, indicam um fracionamento favorecendo a síntese de sacarose, como uma maneira de compensar a maior demanda por  $P_i$ . Entretanto,

parece que as plantas transgênicas são menos eficientes, em condições de alta luminosidade, na reciclagem de  $P_i$  através da síntese de sacarose.

A Tabela 6 apresenta os dados de conteúdo de metabólitos de folhas de plantas cultivadas em intensidade luminosa média,  $500\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e, como no caso anterior, os experimentos foram conduzidos em duas intensidades luminosas:  $100\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e  $1000\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e com concentração externa de 850ppm de  $\text{CO}_2$ , para minimizar os efeito da fotorrespiração.

Nas condições de  $100\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  pode-se verificar que o valor de PGA é inferior nas plantas transgênicas, a relação PGA/TP é ligeiramente inferior e a relação ATP/ADP é muito maior nas plantas transgênicas que selvagem e, a taxa de fotossíntese, Figura 15 e Tabela 2, também é superior para as plantas transgênicas independente da concentração de  $\text{CO}_2$ . O conteúdo total de hexoses fosfato é semelhante para os dois tipos de planta e a relação G6P/F6P também foi próxima de 1 para as duas, indicando a compartimentação das hexoses no cloroplasto e síntese predominante de amido. Como no experimento anterior, estes resultados indicam que em baixa luminosidade as plantas transgênicas tem uma maior capacidade de regenerar ATP, o que leva a uma maior redução de PGA e maior fotossíntese, sendo que este padrão de assimilação foi independente das condições em que as plantas foram cultivadas: baixa ( $50\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) ou média ( $500\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) intensidade de luz.

**Tabela 6.** Conteúdo de metabólito em plantas cultivadas em  $500\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Os dados são médias de 6 plantas  $\pm$  desvio padrão, onde TRA corresponde as plantas transgênicas e S as selvagens.

$100\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$									
Tipo de planta	conteúdo de metabólitos (nmol.mg <sup>-1</sup> Chl)						Relação de metabólitos (mol/mol)		
	PGA	TP	ATP	ADP	G6P	F6P	PGA/TP	ATP/ADP	G6P/F6P
TRA	263±91	49±25	69±19	39±7	72±39	70±15	5,4	1,8	1,0
S	312±76	48±29	40±8	144±91	63±20	91±64	6,5	0,3	0,7

$1000\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$									
Tipo de planta	conteúdo de metabólitos (nmol.mg <sup>-1</sup> Chl)						Relação de metabólitos (mol/mol)		
	PGA	TP	ATP	ADP	G6P	F6P	PGA/TP	ATP/ADP	G6P/F6P
TRA	244±24	23±4	33±11	146±75	57±11	43±22	10,6	0,2	1,3
S	212±37	34±6	48±9	24±8	49±18	41±15	6,5	2,0	1,2

Os resultados dos experimentos realizados em intensidade de  $1000\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , mostram que a maior capacidade de absorver luz das plantas transgênicas tem um efeito negativo sobre o seu metabolismo fotossintético. Além da planta transgênica apresentar menor taxa fotossintética, Figura 15 e Tabela 2, também apresenta maior conteúdo de PGA, maior relação PGA/TP e uma relação ATP/ADP muito baixa, principalmente se comparada à selvagem. Isto indica que nestas condições ocorre uma grande limitação para a síntese de ATP, levando a uma menor redução de PGA e, provavelmente, a limitação destas plantas reside no fato de uma reciclagem insuficiente de  $P_i$ , conforme será discutido no item a seguir, sobre conteúdo de carboidratos.

Pode-se observar nas Tabelas 5 e 6 que algumas análises apresentam valores de desvio padrões elevados, porque resultam de uma série de reações enzimáticas. Entretanto a análise do conjunto de dados obtidos neste trabalho: assimilação de  $\text{CO}_2$ , fluorescência da clorofila *a* e análise de metabólitos, indicam que as plantas transgênicas apresentam uma vantagem em relação às selvagens, quando cultivadas em baixa luminosidade devido a sua maior capacidade de regenerar ATP e NADPH.

Quando uma planta está em baixa luminosidade ou baixa concentração de  $\text{CO}_2$ , a taxa de fotossíntese pode ser aumentada pelo aumento da intensidade luminosa ou pela concentração de  $\text{CO}_2$ . Entretanto, há um ponto de saturação, onde nem o aumento de luz, nem o aumento da concentração de  $\text{CO}_2$  levam a um aumento da fotossíntese. Neste ponto parece que pelo menos um dos componentes do aparelho fotossintético não pode operar mais rápido e isto pode ser devido: à taxa de reciclagem do centros fotoquímicos; à capacidade de transporte de elétrons; ou à taxa na qual o ATP e NADPH podem ser consumidos nas reações do metabolismo do carbono que convertem  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  ao produto

final (Stitt, 1986). Então, durante a fotossíntese, a maioria do carbono fixado é exportado para o citosol como triose-fosfato e convertido a sacarose, liberando fosfato inorgânico ( $P_i$ ). Este  $P_i$  retorna ao cloroplasto em uma troca por mais triose-P que deve ser precisa. A taxa de síntese de sacarose deve então estar ajustada de maneira que quantidade suficiente de  $P_i$  seja liberada para manter sua concentração no estroma e permitir que as reações ocorram eficientemente no estroma e tilacóide (Stitt, 1987; Stitt et al., 1988).

Experimentos realizados para investigar quais os componentes do metabolismo de carbono seriam responsáveis pela restrição da fotossíntese em condições de saturação luminosa e  $CO_2$  (Stitt, 1986; Sharkey et al., 1986; Labate & Leegood, 1988; Stitt & Quick, 1989) mostraram que nestas condições a limitação principal reside na capacidade de reciclar  $P_i$  durante a síntese de sacarose no citosol e não na capacidade de transporte de elétrons. Medidas do nível de metabólitos durante o equilíbrio da fotossíntese e em condições de aumento transitório foram feitas para provar que não ocorre uma completa utilização da capacidade de transporte de elétrons em condições de saturação de luz. Para isso, a intensidade de luz de  $1500\mu E.m^{-2}.s^{-1}$  foi diminuída para  $180\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ , por 30s e em seguida retornou para  $1500\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ . Houve um aumento de 40% da taxa de evolução de  $O_2$  sobre aquela do nível de equilíbrio, seguido de uma inibição até voltar às condições de equilíbrio. A queda da intensidade luminosa produziu um decréscimo da relação ATP/ADP, enquanto o nível de PGA aumentou (Stitt, 1986). Segundo os autores (Stitt, 1986; Sharkey et al., 1986) estes resultados fornecem evidências de que a limitação da fotossíntese em condições de saturação de luz e  $CO_2$  não é devida à limitação na capacidade de transporte de elétrons: o aumento de 40% na taxa de evolução de  $O_2$  nas condições descritas indicam que o fluxo através da cadeia de transporte de elétrons e a produção e consumo de ATP e NADPH caminham mais rapidamente

que aquele necessário para manter o nível de equilíbrio da fotossíntese. Os resultados também indicam que a capacidade para reciclagem do Ciclo de Calvin-Benson e para carboxilação também não estão sendo completamente utilizados durante o estado de equilíbrio da fotossíntese. O aumento transitório da fotossíntese, e da relação ATP/ADP e queda de PGA/TP nestas condições, podem ser explicadas se houver uma restrição da disponibilidade de  $P_i$  para limitar a taxa de fotossíntese nas condições de equilíbrio da mesma.

A limitação de  $P_i$  pode ocorrer “in vivo” da seguinte maneira: em condições de saturação de luz ou  $CO_2$ , a capacidade máxima para síntese de sacarose é consequência da taxa máxima de fotossíntese, bem como a atividade da enzima SPS, cuja atividade será máxima em altas concentrações de fosforilados intermediários e baixa concentração de  $P_i$  no citosol. Deste modo, há um conflito entre as necessidades para a síntese rápida de sacarose e por fosforilação, pois a triose-P deve ser exportada rapidamente para o citosol, aumentando a relação TP/ $P_i$ , exigindo uma reciclagem maior de  $P_i$ . Se a síntese de sacarose estiver em excesso em relação a taxa de fotossíntese, então serão necessárias somente pequenas alterações nos fosforilados intermediários e de  $P_i$  para permitir que a síntese seja ativada, sem que a reciclagem de  $P_i$  seja limitante. Entretanto, quando a taxa de fotossíntese se aproxima da máxima capacidade da síntese de sacarose, a maior relação TP/ $P_i$  que será necessária no citosol para aumentar a síntese de sacarose, exige maior reciclagem de  $P_i$ , para manter sua concentração no estroma e isto começa a limitar a taxa de fotossíntese (Stitt & Heldt, 1985). A fotossíntese pode também ser inibida se a triose-P for exportada muito rapidamente para o citosol, em níveis que levem à uma diminuição dos metabólitos do ciclo de Calvin-Benson (Stitt, 1987).

A partir destes trabalhos e dos dados obtidos nos experimentos com alta intensidade luminosa, pode-se sugerir que, embora em

condições de alta luminosidade a síntese de sacarose seja favorecida, a demanda por  $P_i$  para fotofosforilação nas plantas transgênicas é muito alta, devido ao aumento da capacidade de transporte de elétrons e a reciclagem não é tão rápida quanto a necessária, diminuindo deste modo a síntese de ATP, sendo portanto um ponto fundamental da limitação da fotossíntese para as plantas transgênicas.

#### **4.2.4 Conteúdo de carboidratos durante o desenvolvimento**

A Tabela 7 apresenta o conteúdo de carboidratos medidos em folhas jovens (Tabela 7A) e folhas maduras (Tabela 7B) em plantas cultivadas em 50 e 500  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

Nas folhas jovens, Tabela 7A, o conteúdo de amido e sacarose é proporcional para cada tipo de planta independente da intensidade luminosa, mostrando que não há alterações no fracionamento, ou seja amido e sacarose são produzidas na mesma proporção (Stitt et.al., 1990) e o conteúdo de carboidratos total é 2 a 3 vezes maior nas plantas transgênicas.

Para as folhas maduras, Tabela 7B, o conteúdo de amido e sacarose é proporcional para as plantas selvagens independente da intensidade de luz. Nas plantas transgênicas a proporção entre amido e sacarose variou de acordo com a intensidade luminosa. Plantas cultivadas em baixa luminosidade apresentaram mais sacarose; com o aumento da intensidade de luz houve um grande acúmulo de amido. Nestas condições, as plantas transgênicas apresentaram 70% mais amido que as selvagens e o conteúdo total de carboidratos também foi superior, cerca de 49% (diferenças significativas, segundo Teste F ao nível de 5% de probabilidade) (Pimentel Gomes, 1976).

**Tabela 7.**

A. Conteúdo de amido e sacarose em folhas jovens. Os dados representam médias de 4 plantas  $\pm$  desvio padrão em  $\mu\text{mol hexoses equivalentes.mg}^{-1} \text{ chl}$  e as folhas foram coletadas em alta intensidade de luz ( $1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) após 2 horas do início do período luminoso.

Tipo de planta	Amido	Sacarose	Carboidrato Total
<b>plantas cultivadas em <math>50\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}</math></b>			
Transgênica	1,4 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,4	3,0 $\pm$ 0,6
Selvagem	0,6 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,3
<b>plantas cultivadas em <math>500\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}</math></b>			
Transgênica	1,8 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 0,4	3,2 $\pm$ 0,9
Selvagem	0,6 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,4

B. Conteúdo de amido e sacarose em folhas maduras. Os dados representam médias de 4 plantas  $\pm$  desvio padrão em  $\mu\text{mol hexoses equivalentes.mg}^{-1} \text{ chl}$  e as folhas foram coletadas em alta intensidade de luz ( $1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) após 2 horas do início do período luminoso.

Tipo de planta	Amido	Sacarose	Carboidrato Total
<b>plantas cultivadas em <math>50\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}</math></b>			
Transgênica	1,2 $\pm$ 0,5	2,1 $\pm$ 1,4	3,3 $\pm$ 1,6
Selvagem	1,2 $\pm$ 0,4	1,8 $\pm$ 0,1	3,0 $\pm$ 1,9
<b>plantas cultivadas em <math>500\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}</math></b>			
Transgênica	7,0 $\pm$ 2,8	4,8 $\pm$ 1,8	11,8 $\pm$ 4,6
Selvagem	4,1 $\pm$ 1,9	3,8 $\pm$ 1,9	7,9 $\pm$ 3,8

Segundo Stitt (1991), um grande número de trabalhos tem mostrado que a fotossíntese é inibida quando a demanda para fotossintatos no restante da planta é menor e é estimulada quando a demanda é maior. As evidências incluem estudos nos quais a relação fonte/dreno é manipulada, como inibição do seu metabolismo (Stitt et al., 1990) ou inibição da exportação pela folha (Goldschmidt & Huber, 1992). A hipótese da inibição da fotossíntese pelo produto final foi proposta há mais de cem anos, no entanto, a existência de uma relação entre acúmulo de carboidrato e inibição da fotossíntese é ainda bastante controversa (Stitt, 1991).

Dois mecanismos têm sido propostos para explicar como o acúmulo de carboidratos pode inibir a taxa de fotossíntese: grãos de amido grandes podem romper fisicamente os cloroplastos (Stitt, 1991); ou níveis elevados de carboidratos podem levar a uma retroinibição da síntese de carboidratos pois o  $P_i$  não está reciclando suficientemente rápido e é neste mecanismo que iremos enfatizar esta discussão.

Como visto anteriormente, a sacarose é sintetizada no citosol a partir de TP, que é exportada a partir do cloroplasto através do translocador de fosfato na troca por  $P_i$  (Stitt & Quick, 1989). Quando a síntese de sacarose é inibida ocorre um acúmulo de metabólitos fosforilados no citosol e menos  $P_i$  é reciclado para o cloroplasto, levando a uma inibição da fotossíntese (Herold, 1980). A regulação da síntese de sacarose inclui dois elementos-chave: a regulação da enzima citosólica Fru1,6-Pase pelo metabólito sinal Fru2,6 bisP; e a regulação da enzima SPS, sendo que estes mecanismos aumentam a taxa de síntese de sacarose em resposta ao aumento da fotossíntese e inibem a síntese quando há um acúmulo de sacarose nas folhas (Stitt, 1987; Stitt & Quick, 1989).

Sabe-se que, a primeira reação reversível da síntese de sacarose é catalisada pela Fru1,6Pase que é inibida por Fru 2,6 bisP. Quando a

fotossíntese aumenta há uma queda no conteúdo de Fru2,6bisP devido ao aumento de PGA e isto ativa a enzima Fru1,6Pase aumentando a síntese de sacarose. Quando a taxa de produção de hexose-fosfato excede seu uso para síntese de sacarose, há um aumento de Fru2,6bisP, que inibe o fluxo para sacarose e estimula para a síntese de amido (Stitt, 1987; Scott et al., 1995). Portanto, a síntese de sacarose é regulada por um balanço entre mecanismos de “feedforward” e “feedback” e a interação entre estes mecanismos determina se o acúmulo da sacarose levará a mudanças no fracionamento ou a inibição de sua síntese, e isto dependerá das condições de cultivo das plantas, como por exemplo intensidade luminosa (Neuhaus et al., 1990).

A inibição da síntese de sacarose poderá diminuir a fotossíntese através de mudanças na disponibilidade de  $P_i$ . Estudos feitos em cloroplastos isolados mostram que quando a fotossíntese é inibida por baixas concentrações de  $P_i$  do meio, ocorre uma diminuição da razão ATP/ADP, um acúmulo de PGA e a síntese de amido é estimulada pois o aumento de PGA ativa a enzima ADP-glucose pirofosforilase (Heldt et al., 1977). Há evidências de que esta sequência ocorra nas folhas onde a síntese de sacarose é inibida, pois já foi observado que o estímulo para a síntese de amido em folhas de espinafre contendo elevados níveis de sacarose é acompanhado por um aumento do nível de PGA (Neuhaus et al., 1990).

Vários estudos indiretos foram feitos para investigar se a fotossíntese em folhas seria limitada por  $P_i$  e mostraram que nestas condições a fotossíntese foi insensível ao  $O_2$ ; foi estimulada quando  $P_i$  foi adicionado através do fluxo de transpiração; houve um decréscimo na razão ATP/ADP, um aumento de PGA e desativação da RUBISCO. Estes resultados foram observados em mutantes com menor taxa de síntese de sacarose e amido (Neuhaus et al., 1989); após adição de inibidores da síntese de sacarose, ou durante transições para baixa

temperatura (Labate, 1989; Labate & Leegood, 1988; 1990), indicando que a fotossíntese pode ser limitada por  $P_i$  “in vivo” quando há inibição da síntese do produto final ou quando um estímulo para fixação de  $CO_2$  levam a um desequilíbrio entre fixação de  $CO_2$  e síntese de amido ou sacarose.

Portanto, a partir dos dados de fluorescência de clorofila, Figura 16B, de conteúdo de metabólitos, Tabelas 5 e 6, e de conteúdo de carboidratos, Tabela 7, podemos sugerir que a limitação da fotossíntese para plantas transgênicas analisadas em alta intensidade luminosa é devida a limitação da reciclagem de  $P_i$  pela síntese de sacarose.

### **4.3 MEDIDA DA ATIVIDADE DA ENZIMA SACROSE FOSFATO SINTASE**

A Tabela 8 apresenta os valores da atividade da enzima SPS em  $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{mg}^{-1}\text{chl}$ , para as plantas transgênicas e selvagens cultivadas em  $50\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  nas condições de limitação de F6P, UDPG e de  $V_{\text{max}}$ , conforme descrito no item 3.4.

**Tabela 8:** Atividade da enzima SPS de plantas transgênicas e selvagens cultivadas em  $50\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Os dados são médias de 4 experimentos com 4 plantas de cada fenótipo por experimento, onde -F6P e -UDPG referem-se às condições limitantes para estes metabólitos.

Tipo de Planta	Atividade da SPS ( $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{mg}^{-1}\text{chl}$ )		
	-F6P	-UDPG	$V_{\text{max}}$
transgênica	$1,17\pm 0,53$	$1,32\pm 0,42$	$4,48\pm 1,6$
selvagem	$1,30\pm 0,45$	$1,45\pm 0,50$	$3,20\pm 0,77$

Podemos observar que para as condições de limitação, -F6P ou -UDPG as plantas transgênicas e selvagens não apresentaram diferenças significativas, de acordo com o Teste F, quanto a atividade das enzimas e estes resultados estão de acordo com os encontrados na literatura (Huber et al., 1989). Nas condições de  $V_{\text{max}}$ , a atividade foi maior para os dois tipos de planta, sendo cerca de 40% superior para as plantas transgênicas.

Como visto anteriormente, o tabaco segundo a classificação proposta por Huber et al. (1989), pertence ao grupo III, ou seja espécies onde a atividade da enzima SPS é aumentada somente como resultado de aumento dos níveis de substrato e a enzima não sofre modificações covalentes (fosforilação da proteína) em resposta à luz. São espécies que acumulam primariamente amido durante o período luminoso, pois contém invertase ácida solúvel nos vacúolos das células das folhas que inibem o acúmulo da sacarose durante o período luminoso, sendo mais sensíveis a uma inibição da fotossíntese por retroinibição em resposta ao acúmulo de metabólitos. Então, para estas plantas, uma reciclagem excessiva

da sacarose e outros açúcares no citoplasma poderia resultar em uma inibição do Ciclo de Calvin e fotossíntese (Huber, 1989; Huber et al., 1989; Huber & Huber, 1992). Este tipo de regulação para a enzima SPS de tabaco justifica o aumento da atividade da enzima encontrado nas plantas transgênicas, pois nestas condições de cultivo, apresentam a taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> superior em relação à selvagem (Tabela 1).

Sharkey et al. (1991), analisando plantas transgênicas de tabaco com excesso de fitocromo, observaram que além de possuir maior capacidade fotossintética em condições de saturação de CO<sub>2</sub>, cerca de 72% maior, as plantas transgênicas também apresentaram maior atividade da enzima SPS, cerca de 90% maior em relação às plantas selvagens. Quick et al. (1991), estudando plantas transgênicas de tabaco com menor expressão do gene para a sub-unidade menor da RUBISCO (*rbcS*), verificaram que uma diminuição da enzima RUBISCO, inibiu fortemente a taxa de fotossíntese e também a atividade da enzima SPS. Estes resultados parecem concordar com a premissa de que a atividade da SPS em tabaco é alterada em função do nível de substrato e, confirmam os dados encontrados no presente trabalho, na qual observa-se que a maior capacidade fotossintética das plantas transgênicas em baixa luminosidade, aumentou também a atividade da enzima SPS.

#### **4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS DA ASSIMILAÇÃO DO NITROGÊNIO**

##### **4.4.1 Medida da atividade da Nitrato Redutase**

A Tabela 9 apresenta os dados de atividade da enzima Nitrato Redutase em U. mg<sup>-1</sup> chl. (nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> chl), na presença e ausência de Mg<sup>+2</sup>

(+EDTA), como uma maneira de estudar o estado de fosforilação da enzima de plantas transgênicas e selvagens cultivadas em baixa luminosidade ( $50\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). A tabela mostra também o estado de ativação, que é determinado como a relação entre a atividade na presença de  $\text{Mg}^{+2}$  e a atividade total, obtida na presença de EDTA.

**Tabela 9:** Atividade da enzima Nitrato Redutase, em presença de  $\text{Mg}^{+2}$  e na ausência de  $\text{Mg}^{+2}$  (+EDTA) em  $\text{U.mg}^{-1}\text{ chl}$ . Os dados são médias de 5 experimentos com 4 plantas de cada tipo por experimento.

Tipo de planta	+ $\text{Mg}^{+2}$	Atividade $\text{U.mg}^{-1}\text{ chl}$ (+EDTA)	( $\text{nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}\text{ chl}$ ) % Ativação
transgênica	$23,60\pm 7,0$	$32,97\pm 10,0$	0,72
selvagem	$16,89\pm 3,06$	$25,06\pm 6,34$	0,67

Pode-se verificar que a atividade da enzima NR é sempre superior nas plantas transgênicas em relação às selvagens, embora o estado de ativação seja quase o mesmo para os dois tipos de plantas. Sabe-se que a atividade da NR é modulada através de um processo de fosforilação/desfosforilação reversível da proteína, em resposta a mudanças na disponibilidade de luz e  $\text{CO}_2$ . Um decréscimo na fotossíntese leva a uma diminuição do estado de ativação e como consequência a estado de fosforilação da enzima responde aos níveis de produtos da fotossíntese (Ferrario et al., 1996). A capacidade fotossintética das folhas tem uma correlação positiva com o conteúdo de nitrogênio, possivelmente porque este é usado na síntese dos componentes do aparelho fotossintético e a modulação da atividade das enzimas SPS, PEP carboxilase e NR contribui para a sincronização entre assimilação de nitrogênio, fixação de carbono e

fracionamento de carbono. Já foi verificado que as plantas respondem a um déficit de suprimento de CO<sub>2</sub> pela limitação da assimilação do nitrogênio, e o inverso também ocorre (Foyer et al., 1994).

Foi observado que folhas de *N. plumbaginifolia* adaptadas ao escuro tiveram o nível de transcrição da NR aumentado em 24h pelo fornecimento de glucose, sacarose ou frutose, bem como a quantidade de proteína e a atividade aumentaram conjuntamente. Como a sacarose é derivada diretamente da fotossíntese e é o principal carboidrato transportado na planta, a indução da NR por estes açúcares sugere que a luz regula a atividade da enzima, pelo menos em parte, através da síntese de carboidratos pela fotossíntese. Estes resultados indicam que esta regulação tem como objetivo controlar a redução do nitrato em função de alterações no conteúdo de metabólitos de carbono e de nitrogênio (Vincentz et al., 1993).

Esta regulação coordenada entre os dois ciclos justifica então o aumento da atividade da enzima nitrato redutase nas plantas transgênicas cultivadas em baixa luminosidade pois, como visto, apresentam maior taxa fotossintética e também maior conteúdo de sacarose, em relação às plantas selvagens, e pode ser este um dos mecanismos que levou à alteração da atividade total da enzima.

#### **4.4.2 Medida da atividade da Glutamina Sintetase**

A Tabela 10 apresenta os dados de atividade da enzima Glutamina Sintetase em U.mg<sup>-1</sup>prot. (μmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>prot) de plantas transgênicas e selvagens cultivadas em baixa intensidade luminosa (50μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>).

**Tabela 10:** Atividade da enzima Glutamina Sintetase. Os dados são médias de sete experimentos com 4 plantas de cada fenótipo, para cada experimento.

Tipo de planta	Atividade U.mg <sup>-1</sup> prot
transgênica	0,275±0,06
selvagem	0,264±0,064

Como podemos observar, não há mudanças em relação à atividade da enzima para as plantas transgênicas e selvagens. Häusler et al. (1994 a, b), estudando plantas de cevada com atividade reduzida das enzimas glutamina e glutamato sintetase, observaram que pequenas mudanças na atividade destas enzimas podem afetar não apenas o metabolismo de nitrogênio, bem como o de carbono: assimilação de CO<sub>2</sub> e consumo de elétrons. Nos mutantes com atividade reduzida de GS, a necessidade de elétrons para assimilação de CO<sub>2</sub> foi menor que para as plantas selvagens, mostrando que a enzima exerce um certo controle sobre o transporte de elétrons e assimilação de CO<sub>2</sub>. Apesar destas relações, não encontramos alteração na atividade da enzima, nas condições em que os experimentos foram realizados.

## **4.5 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE AMIDO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS DE RESERVA DAS SEMENTES.**

### **4.5.1 Determinação do conteúdo de amido de reserva das sementes**

O resultado da análise de amido das sementes mostrou que a quantidade de amido expressa em **nmol de hexose equivalentes.mg<sup>-1</sup>sem.** foi de

92,5 para as sementes derivadas de plantas transgênicas e de 57 para as sementes de plantas selvagens, representando um aumento de 62%.

Como no caso de folhas, em tecido de reserva a síntese de amido ocorre predominantemente através da via da ADP-glucose e estudos indicam no momento em que a síntese é iniciada durante o desenvolvimento do endosperma, há uma grande atividade fosforilase e pouca atividade da amido sintase, que aparece nos estágios finais do desenvolvimento. Por exemplo, em *V.faba*, a fase de síntese de amido ocorre do meio para o final do desenvolvimento da semente, onde os cotilédones recebem carboidratos do floema, principalmente como sacarose. Esta sacarose é quebrada no citosol, e a hexose-fosfato formada entra no amiloplasto, onde acontece a síntese de amido, através da ação das enzimas AGPase, amido sintase e enzimas de ramificação (Weber et al., 1995). A regulação da enzima ADP-glucose pirofosforilase (AGPase) dos tecidos não fotossintéticos, em geral, é similar à de tecidos foliares, em relação à ativação por um aumento na relação  $PGA/P_i$  (Preiss & Greenberg, 1969; Preiss & Levi, 1980; Stitt & Sonnewald, 1995; Weber et al., 1995).

Portanto o aumento de 62% de amido encontrado nas sementes das plantas transgênicas pode refletir o aumento de amido das folhas maduras de plantas cultivadas na casa de vegetação, indicando uma ativação da enzima ADP-glucose pirofosforilase nestas condições de restrição de  $P_i$ . Também devemos considerar que as plantas transgênicas por terem um florescimento tardio em relação às selvagens, apresentam maior biomassa e número de folhas durante a época de florescimento, formação, enchimento e maturação dos frutos. Este fato pode ser uma vantagem em relação às selvagens, pois aumenta a “fonte” neste período de formação das sementes.

#### 4.5.2 Determinação da composição e conteúdo das proteínas de reserva

A Figura 17 apresenta o perfil eletroforético da fração globulina mais albumina, corado com solução 0,2% de “Comassie Brilliant Blue CBB”. Pode-se observar que há apenas uma diferença entre os perfis das plantas transgênicas e selvagens, que é a ausência de uma banda na canaleta referente à planta transgênica, de peso molecular estimado em 70kD.

A Figura 18 apresenta o perfil eletroforético da fração albumina, corada pelo método de nitrato de prata, que apresenta um maior poder de resolução. Observa-se apenas uma diferença entre os perfis das duas plantas, ou seja a presença de uma banda na canaleta referente à planta transgênica de peso molecular estimado em 20kD.

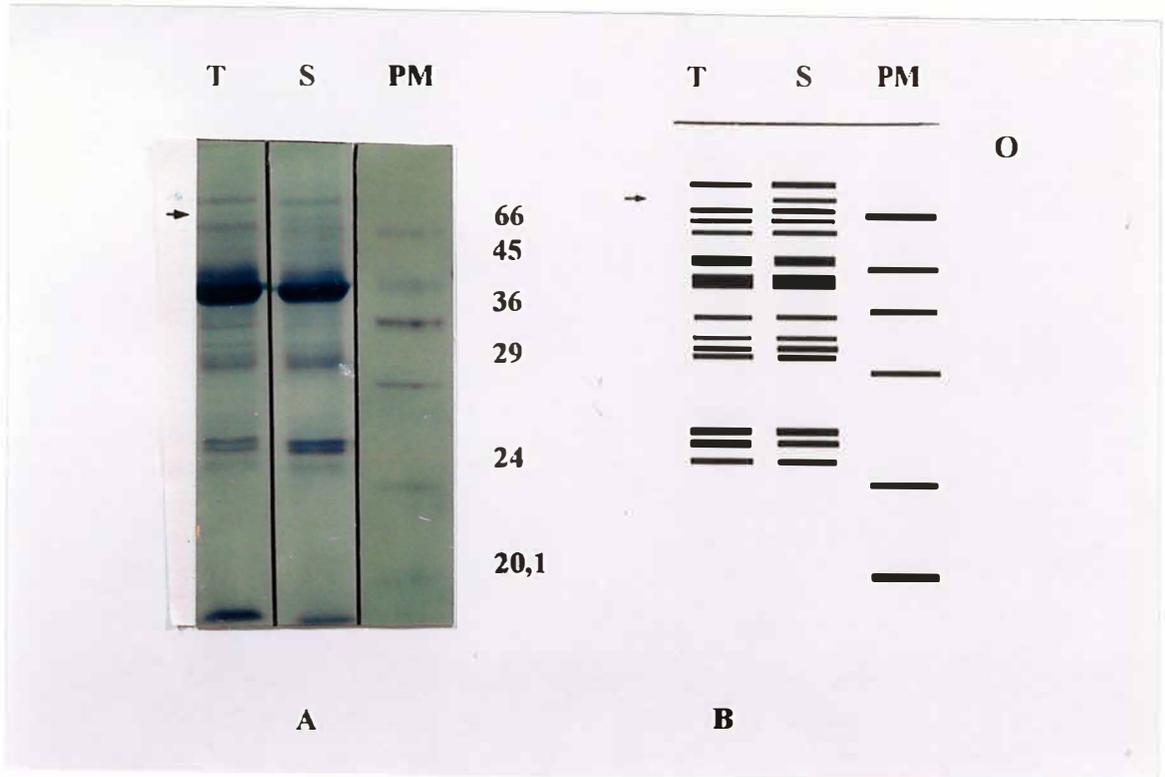
A Figura 19 apresenta o perfil eletroforético da fração globulina, corado pelo método de nitrato de prata e, por apresentar maior resolução, apresenta outras bandas que não foram visualizadas com a coloração de “Comassie Brilliant Blue”. A canaleta referente à planta transgênica mostra ausência de quatro bandas de peso molecular estimado em 70kD, 40,7kD, 24kD e 23kD, onde a de 70kD corresponde à que foi mostrada no perfil eletroforético corado com “Comassie Brilliant Blue”.

A Figura 20 apresenta o perfil eletroforético da fração glutelinas corada com solução 0,2% de “Comassie Brilliant Blue” e foram observadas três diferenças: a presença de uma banda de peso molecular estimado em 56,5kD na canaleta referente à planta transgênica e, também, a ausência de duas bandas de peso estimado em 27kD e 17,4kD. Esta fração não representa grande importância em termos de proteína de reserva.

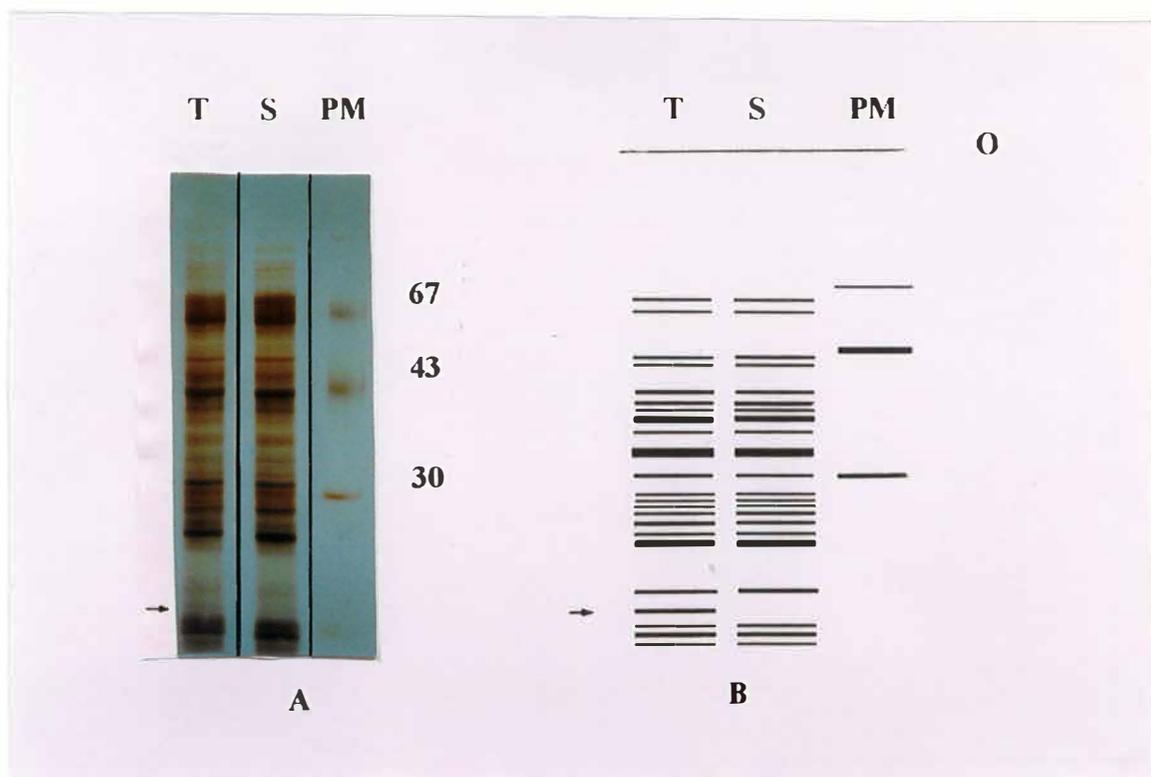
Todos os géis foram lidos em densitômetro HOEFER GS-300 (Hoefer Scientific Instruments - San Francisco) em 567nm para caracterização

quantitativa. Os resultados obtidos confirmaram os da análise qualitativa, ou seja, que as maiores alterações ocorreram na fração globulina, o principal componente das proteínas de reserva de tabaco.

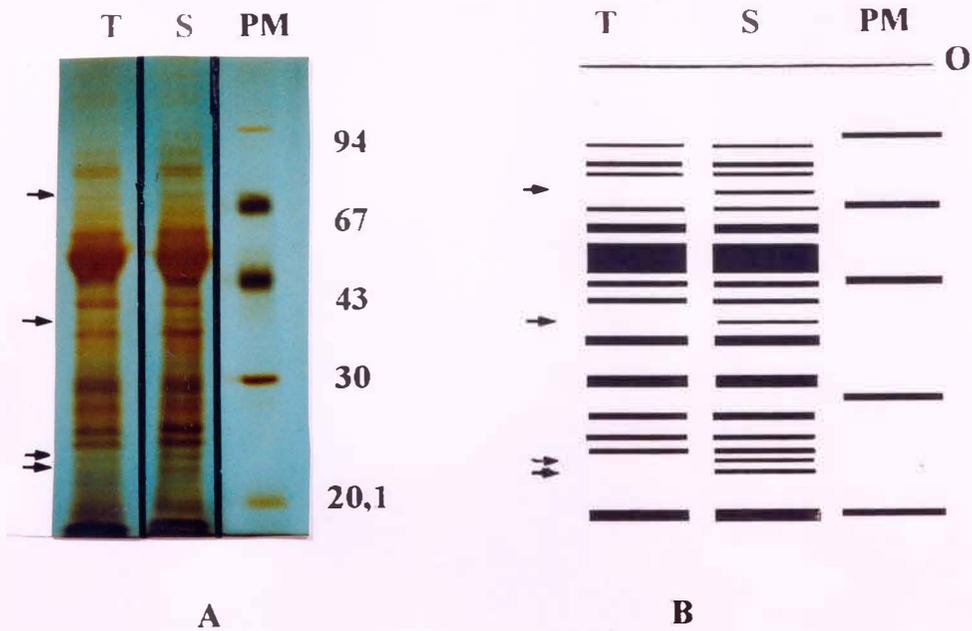
Sabe-se que a expressão dos genes para proteínas de reserva é regulado na fase de transcrição e pós-transcrição e que também podem ser regulados por alguns metabólitos, como os açúcares solúveis, onde um elevado nível destes açúcares pode reduzir a quantidade de globulinas (Turner et al., 1990; Wobus et al., 1995). Podemos sugerir então que estas alterações na fração globulina das proteínas de reserva das plantas transgênicas possam ser devidas a mudanças no nível de metabólitos, principalmente dos açúcares solúveis.



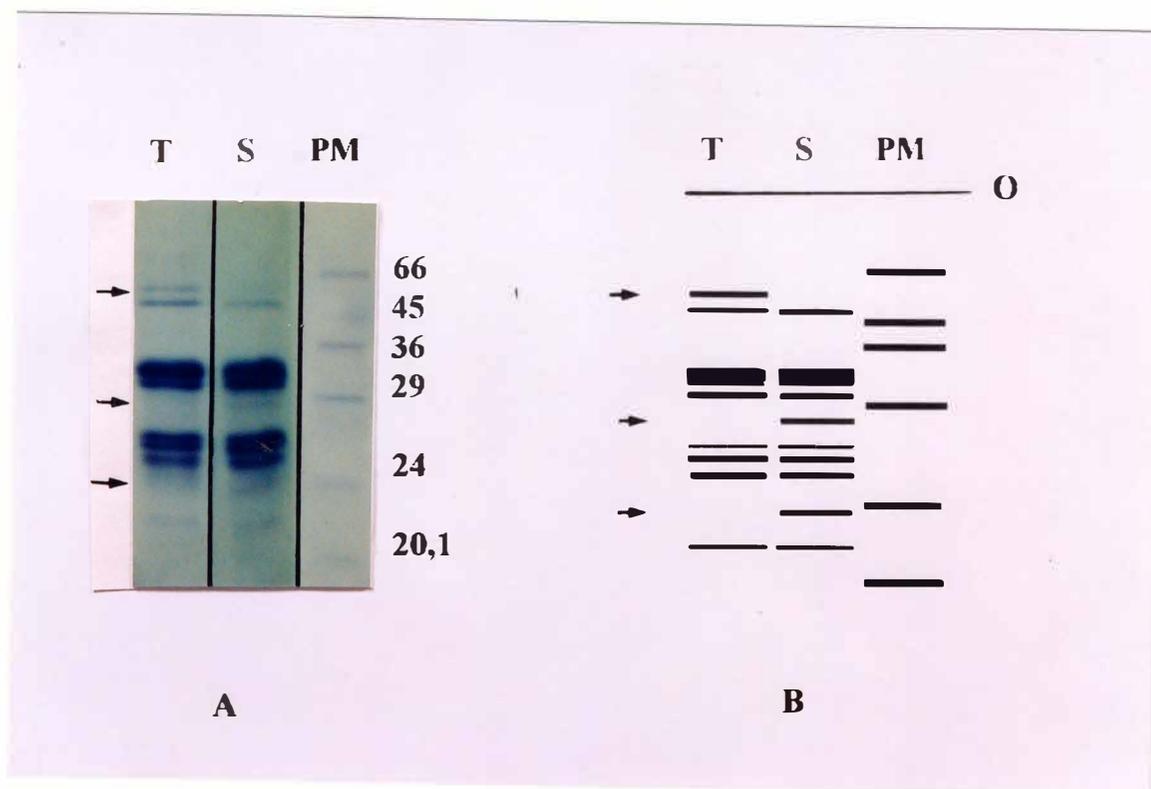
**Figura 17:** Perfil eletroforético da fração albumina mais globulina corados com solução 0,2% de “Comassie Briliant Blue” (A) e sua representação esquemática (B), onde T refere-se à plantas transgênicas, S à plantas selvagens, PM ao peso molecular, cujos valores aparecem em kD e O a origem da eletroforese. A seta indica a diferença encontrada entre os dois tipos de plantas: ausência da banda de 70kD na canaleta referente à planta transgênica.



**Figura 18:** Perfil eletroforético da fração albumina corado pela metodologia de nitrato de prata (A) e sua representação esquemática (B), onde T refere-se à plantas transgênicas, S à plantas selvagens, PM ao peso molecular, cujos valores aparecem em kD e O indica a origem da eletroforese. A seta indica a diferença encontrada entre os dois tipos de plantas: presença da banda de 20kD na canaleta referente à planta transgênica.



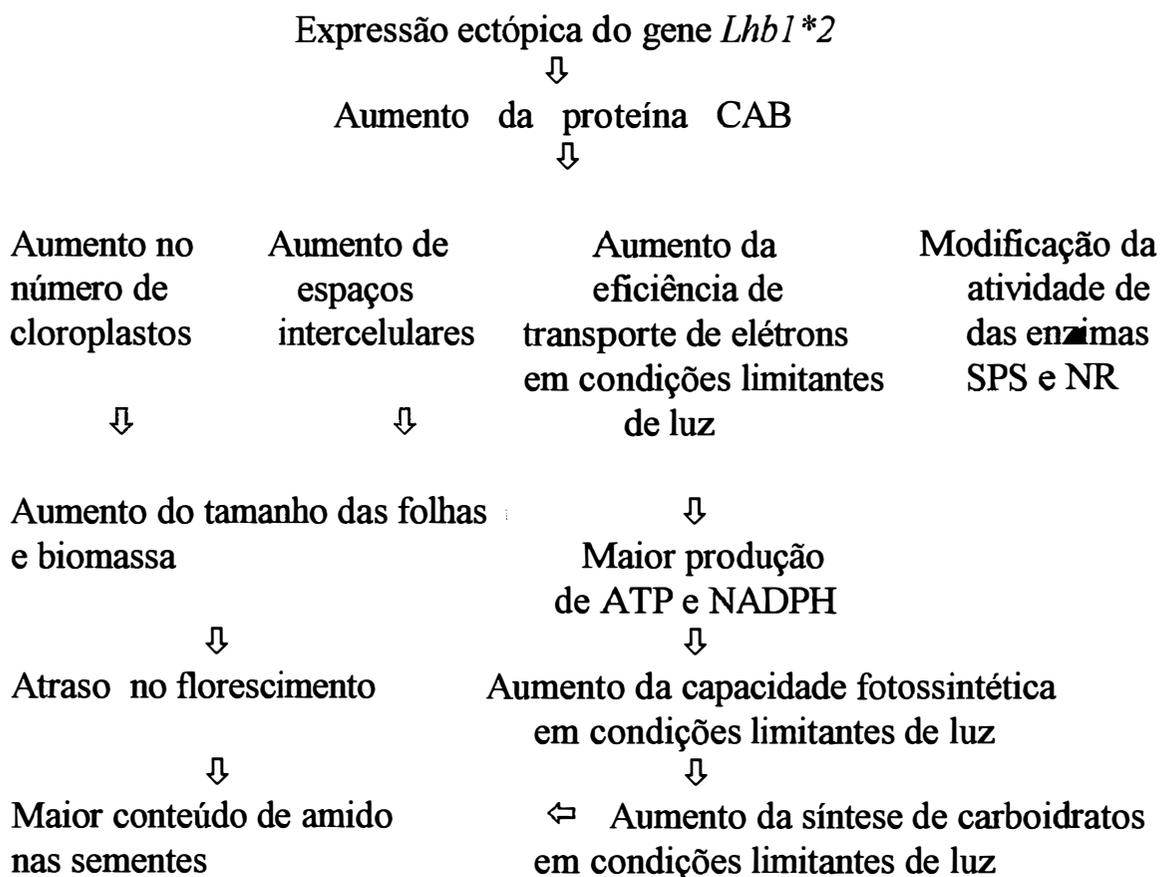
**Figura 19:** Perfil eletroforético da fração globulina corado pela metodologia de nitrato de prata (A) e sua representação esquemática (B), onde T refere-se à plantas transgênicas, S à plantas selvagens, PM ao peso molecular, cujos valores aparecem em kD e O indica a origem da eletroforese. As setas indicam as diferenças encontradas entre os dois tipos de plantas: ausência das bandas de 70kD, 40,7kD, 24kD e 23kD na canaleta referente à planta transgênica.



**Figura 20:** Perfil eletroforético da fração glutelina corado com solução 0,2% de “Comassie Brilliant Blue”(A) e sua representação esquemática (B), onde T refere-se à plantas transgênicas, S à plantas selvagens, PM ao peso molecular cujos valores aparecem em kD e O a origem da eletroforese. As setas indicam as diferenças encontradas entre os dois tipos de plantas: a presença de uma banda de 56,5kD e a ausência de duas bandas de peso estimado em 27kD e 17,4kD na canaleta referente à planta transgênica.

## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS DE CONTINUIDADE

O aumento do complexo clorofila a/b - proteína em plantas transgênicas de tabaco resultou em alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas importantes nestas plantas, apresentadas no diagrama a seguir:



- O aumento do número de cloroplastos verificado nas plantas transgênicas, pode ter sido o responsável pelo aumento do tamanho das folhas, e da biomassa, fatores importantes para maior adaptação destas plantas às condições limitantes de luz.

- O aumento dos espaços intercelulares pode ter sido também um fator importante para o aumento do tamanho das folhas, e também permitiu a difusão mais rápida do CO<sub>2</sub> através do interior dos cloroplastos, aumentando deste modo a concentração disponível para a fixação do carbono. A aparente organização do parênquima paliçádico contribui para o controle da distribuição da luz interna, potencializando sua absorção e maximizando a fixação de carbono, de acordo com as condições ambientais de intensidade de luz.

- O aumento da expressão do gene *Lhcb1\*2*, levou a um aumento da capacidade fotossintética das plantas transgênicas em condições limitantes de luz, e este aumento foi verificado em ambas as condições de intensidade de luz (50 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e 500 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) em que as plantas foram cultivadas.

- Foi verificado também um aumento da eficiência do transporte de elétrons, induzindo à uma maior produção de força assimilatória (ATP e NADPH), que pode ser usada para aumentar a fixação do CO<sub>2</sub> disponível no estroma, permitindo o aumento da síntese de carboidratos pelas plantas transgênicas, nestas condições limitantes de luz.

- Em condições de alta luminosidade, o aumento da capacidade de absorver luz das plantas transgênicas não pode ser utilizada, e estas apresentaram uma menor capacidade fotossintética.

- A expressão constitutiva do gene *Lhcb1\*2* também modificou a ação de outras enzimas, indiretamente relacionadas com o Ciclo de Calvin-Benson, como a SPS e a Nitrato Redutase. Não foi observada modificação na atividade da enzima Glutamina Sintetase.

- Finalmente, outros efeitos pleitrópicos do aumento da expressão deste gene *cab* foram verificados, pois as plantas transgênicas apresentaram maior conteúdo de amido nas sementes e alterações na composição das proteínas de reservas.

No presente trabalho as plantas foram cultivadas somente em baixa e média intensidade luminosa, e as análises fotossintéticas foram realizadas em baixa e alta luminosidade. Para melhor entendimento do comportamento destas plantas em alta luminosidade, será necessário o cultivo das mesmas nestas condições, bem como a análise de todos estes parâmetros fotossintéticos e metabólitos, o que deverá ser realizado como continuação do presente trabalho.

Outro aspecto importante para trabalhos futuros será verificar os efeitos da expressão deste gene em outras espécies, na medida que a expressão constitutiva do gene *Lhcb1\*2* apresentou aspectos bastante interessantes nestas plantas de tabaco como aumento da capacidade fotossintética, aumento síntese de carboidratos, de biomassa, e atraso no florescimento.

Podemos considerar também que esta expressão constitutiva do gene *Lhcb1\*2*, pode ter modificado a ativação da RUBISCO, a principal

enzima da fixação do carbono, nas condições limitantes de luz, através da ação de outra enzima, a RUBISCO ativase. Esta é ainda uma hipótese que precisa ser melhor investigada, o que deverá ser realizado na continuação de presente trabalho.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSSON, B. & STYRING, S. Photosystem II: Molecular organization, function and acclimatation. In: KROGMANN, D.W. ed. **Currents Topics in Bioenergetics**, London, Academic Press, 1991, v.16, p.2-81.
- ANDERSON, S.L.; TEAKLE, G.R.; MARTINO-CATT, S.; KAY, S.A. Circadian clock and phytochrome-regulated transcription is conferred by a 78 bp *cis*-acting domain of the *Arabidopsis CAB2* promoter. **The Plant Journal**, Oxford, v. 6, p. 457-70, 1994.
- ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplast. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Rockville, v.14, p. 1-15, 1949.
- BASSI, R.; PINEAU, B.; DAINESE, P.; MARQUARDT, J. Carotenoid-binding proteins of photosystem II. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 212, p. 297-303, 1993.
- BENFEY, P.N. & CHUA, N.-H. Regulated genes in transgenic plants. **Science**, Washington, v. 244, p. 174-81, 1989.

- BJÖRKMAN, O. Low-temperature chlorophyll fluorescence in leaves and its relationship to photon yield of photosynthesis in photoinhibition. In: KYLE, D.J.; OSMOND, C.B.; ARNTZEN, C.J. (eds). **Photoinhibition**, Elsevier Science Publishers, 1987, p. 123-44.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, p.248-54, 1976.
- BRUSSLAN, J.A. & TOBIN, E.M. Light-independent developmental regulation of *cab* gene expression in *Arabidopsis thaliana* seedlings. **Proceedings of the National Academy Sciences**, Washington, v. 89, p. 7791-5, 1992.
- BUSCHMANN, C. Variation of the quenching of chlorophyll fluorescence under different intensities of the actinic light in wildtype plants of tobacco and in an *Aurea* mutant deficient of light-harvesting complex. **Plant Physiology**, Rockville, v. 145, p. 245-52, 1995.
- CARRÉ, A.I. & KAY, S.A. Multiple DNA-protein complexes at a circadian-regulated promoter element. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 7, p. 2039-51, 1995.
- CASHMORE, A.R. Structure and expression of a pea nuclear gene encoding a chlorophyll a/b-binding polypeptide. **Proceedings of the National Academy Sciences**, Washington, v. 81, p. 2960-64, 1984.

- CHAMPIGNY, M.-L.; FOYER, C. Nitrate reductase of cytosolic protein kinases diverts photosynthetic carbon from sucrose to amino acid biosynthesis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 100, p.7-12, 1992.
- CHENG, C.-L.; ACEDO, G.N.; DEWDNEY, J.; GOODMAN, H.M.; CONKLING, M.A. Differential expression of the two *Arabidopsis* nitrate reductase genes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, p. 275-9, 1991.
- CHENG, C.-L.; ACEDO, G.N.; CRISTINSIN, M.; CONKLING, M.A. Sucrose mimics the light induction of *Arabidopsis* nitrate reductase gene transcription. **Proceedings of the National Academy Sciences**, Washington, v. 89, p. 1861-4, 1992.
- CHRISTOPHER, D. A. & MULLET, J.E. Separated photosensory pathways co-regulate blue light/ultraviolet-a-activated *psbD-psbC* transcription and light-induced D2 and CP43 degradation in barley (*Hordeum vulgare*) chloroplasts. **Plant Physiology**, Rockville, v. 104, p. 1119-29, 1994.
- CLERCQ, de A.; VANDEWIELE, M.; DAMME van J.; GUERCHE, P.; MONTAGU, van M.; VANDEKERCKHOVE, J.; KREBBERS, E. Stable accumulation of modified 2S albumin seed storage proteins with higher methionine contents in transgenic plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 94, p. 970-9, 1990
- COGDELL, J.R. Photosynthetic Reaction Centers. **Annual Review of Plant Physiology**, Stanford, v. 34, p. 21-45, 1983.

- COPELAND, L. Enzymes of sucrose metabolism. In: LEA, P.J. ed. **Methods in Plants Biochemistry**. London, Academic Press, 1990, v. 3, p.73-85.
- CORUZZI, G.; BROGLIE, R.; CASHMORE, A.; CHUA, N.-H. Nucleotide sequences of two pea cDNA clones encoding the small subunit of Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase and the major chlorophyll a/b-binding thylakoid polypeptide. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 258, p. 1399-402, 1983.
- DEMMIG-ADAMS, B. & ADAMS III, W.W. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. **Trends in Plant Science**, Cambridge, v 1, p.21-6, 1996.
- DIETZ, K.-J. & HEBER, U. Light and CO<sub>2</sub> limitation of photosynthesis and state os the reactions regenerating ribulose 1,5-bisphosphate or reducing 3-phosphoglycerate. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 848, p. 392-410, 1986.
- DREYFUSS, B.W. & THORBNER. J.P. Assembly of the light-harvesting complexes (LHCs) of photosystem II. Monomeric LHC IIb complexes are intermediates in the formation of oligomeric LHC IIb complexes. **Plant Physiology**, Rockville, v.106, p.829-39, 1994.
- EVANS, J.R.; CAEMMERER, S.; SETCHELL, B.A.; HUDSON, G.S. The relationship between CO<sub>2</sub> transfer conductance and leaf anatomy in transgenic tobacco with a reduced content of Rubisco. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 21, p. 475-95, 1994

FERNANDEZ ,S.V. & STANELONI, R.J. Characterization and regulation of the expression of the *Solanun tuberosum* Lhcb1 genes. **Cellular and Molecular Biology**, New York, v. 42, 1996.

FERRARIO, S.; VALADIER, M.H.; MOROT-GAUDRY, J.-F.; FOYER, C. Effects of constitutive expression of nitrate reductase in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* L. in response to varying nitrogen supply. **Planta**, Berlin, v. 196, p. 288-94, 1995.

FERRARIO, S.; VALADIER, M.-H.; FOYER,C.H. Short-term modulation reductase activity by exogenous nitrate in *Nicotiana plumbaginifolia* and *Zea mays* leaves. **Planta**, Berlin, v. 197, p. 366-71, 1996.

FLACHMANN, R. & KÜHLBRANDT, W. Accumulation of plant antenna complexes is regulated by post-transcriptional mechanism in tobacco. **The Plant Cell**, Baltimore, v.7. p. 149-60, 1995.

FOYER, C.H.; LEBREVE, C.; PROVOT, M.; VINCENTZ, M.; VAUCHERET, H. Modulation of nitrogen and carbon metabolism in transformed *Nicotiana plumbaginifolia* mutant E23 lines expressing either increased or decreased nitrate reductase activity. **Aspects of Applied Biology**, v. 34, p. 137-45, 1993.

- FOYER, C.H.; LESCURE, J.C.; LEFEBVRE, C.; MOROT-GAUDRY, J.F.; VINCENTZ, M.; VAUCHERET, H. Adaptation of photosynthetic electron transport, carbon assimilation, and carbon partitioning in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* plants to change in nitrate reductase activity. **Plant Physiology**, Rockville, v.104, p.171-8, 1994.
- FUNK, C.; SCHRÖDER, W.P.; GREEN, B.R.; RENGER, G.; ANDERSSON, B. The intrinsic 22kDa protein is a chlorophyll-binding subunit of photosystem II. **FEBS Letters**, Cambridge, v. 342, p. 261-66, 1994.
- GENTY, B.; BRIANTAIS, J.-M.; BAKER, N.R. The relationship between the quantum yield photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 990, p. 87-92, 1989.
- GERHARDT, R.; STITT, M.; HELDT, H.W. Subcellular metabolite levels in spinach leaves: regulation of sucrose synthesis during alterations in photosynthetic partitioning. **Plant Physiology**, Rockville, v. 83, p. 3970407, 1987.
- GHANOTAKIS, D.F. & YOCUM, C.F. Photosystem II and the oxygen-evolving complex. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 41, p. 255-76, 1990.
- GOLDBERG, R.B.; BARKER, S.J.; PEREZ-GRAU, L. Regulation of gene expression during plant embryogenesis. **Cell**, Cambridge, v. 56, p. 149-160, 1989.

- GOLDSCHIMIDT, E.E. & HUBER, S.C. Regulation of photosynthesis by end-product accumulation in leaves of plants storing starch, sucrose and hexose sugars. **Plant Physiology**, Rockville, v. 99; p. 1443-8, 1992.
- GOMES, L.H. Avaliação de quatro métodos para a caracterização de levedura. Piracicaba, 1995.89p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- GORISTEIN, S; NUE, I.A. ARRUDA, P. Alcohol-soluble and total protein from amaranth seed and their comparison with other cereals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.39, p. 848-50, 1991.
- GREEN, B.R.; PICHERSKY, E. ; KLOPPSTECH, K. Chlorophyll a/b-binding proteins: an extended family. **Trends in Biochemistry**, v. 16, p. 181-6, 1991.
- HÄUSLER, R.E.; BLACKWELL, R.D.; LEA, P.J. LEEGOOD, R.C. Control of photosynthesis in barley leaves with reduced activities of glutamine synthetase or glutamate synthase. I Plants characteristics and changes in nitrate, ammonium and amino acids. **Planta**, Berlin, v.194, p.406-17, 1994a.
- HÄUSLER, R.E.; LEA, P.J.; LEEGOOD, R.C. Control of photosynthesis in barley leaves with reduced activities of glutamine synthetase or glutamate synthase.II Control of electron transport and CO<sub>2</sub> assimilation. **Planta**, Berlin, v.194, p. 418-35, 1994b.

HEBER, U.; NEIMANIS, S.; DIETZ, K.J.; VILL, J. Assimilatory force in relation to photosynthetic fluxes. In: BIGGENS J. (ed). **Progress in Photosynthesis Reserach**. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1987, v.3, p. 293-9.

HELDT, H.W.; CHON, C.J.; MARONDE, D.; HEROLD, A.; STANKOVIC, Z.S.; WALKER, D.A.; KRAMINER, A.; KIRK, M.R.; HERBER, U. Role of orthophosphate and other factors in regulation of starch formation in leaves and isolated chloroplasts. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59; p. 1146-55, 1977.

HEROLD, A. regulation of photosynthesis by sink activity: the missing link. **New Phytologist**, London, v. 86, p. 131-44, 1980.

HIGGINS, T.J.V. Synthesis and regulation of major proteins in seeds. **Annual Review of Plant Physiology**, Stanford, v. 35, p. 191-221, 1984.

HIREL, B. & GADAL, P. Glutamine synthetase in rice. A comparative study of the enzymes from roots and leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 66, p. 619-23, 1980.

HIREL, B.; PERROT-RECHENMANN, C.; SUZUKI, A.; VIDAL, J.; GADAL, P. Glutamine synthetase in spinach leaves. Immunological studies and immunocytochemical localization. **Plant Physiology**, Rockville, v. 69, p. 983-7, 1982.

HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. The wather culture of growing plants without soil. 1950. University of California. Berkley.

- HODGES, M.; CORNIC, G.; BRIANTAIS, J.-M. Chlorophyll fluorescence from spinach leaves: resolution of non-photochemical quenching. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.964, p. 289-93, 1989.
- HORTON, P.; RUBAN, A.V.; REES, D.; PASCAL, A.A.; NOCTOR, G.; YOUNG, A.J. Control of the light-harvesting function of chloroplast membranes by aggregation of the LHCII chlorophyll-protein complex. **FEBS Letters**, Cambridge, v. 292, p.1-4, 1991.
- HORTON, P.; RUBAN, A.V.; WALTERS, R.G. Regulation of light harvesting in green plants. Indication by non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. **Plant Physiology**, Rockville, v. 106, p. 415-20, 1994.
- HUBER, S.C. Biochemical mechanism for regulation of sucrose accumulation in leaves during photosynthesis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 91, p.656-662, 1989.
- HUBER, S.C.; NIELSEN, T.H.; HUBER, J.L.A. PHARR, D.M. Variation among species in light activation of sucrose-phosphate synthase. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v. 277, p. 277-85, 1989.
- HUBER, S.C. & HUBER, J.L. Role of sucrose-phosphate synthase in sucrose metabolism in leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 99; p. 1275-8, 1992.

- HUBER, S.C. & HUBER, J.L. Metabolic activators of spinach leaf nitrate reductase: effects on enzymatic activity and dephosphorylation by endogenous phosphatases. **Planta**, Berlin, v. 196, p. 180-9, 1995.
- HUDSON, G.S.; EVANS, J.R.; CAEMMERER, S.; ARVIDSSON, Y.B.C.; ANDREWS, T.J. Reduction of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase content by antisense RNA reduces photosynthesis in transgenic tobacco plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 98, p. 294-320, 1992.
- JANSSON, S.; PICHERSKY, E.; BASSI, R.; GREEN, B.R.; IKEUCHI, M.; MELIS, A.; SIMPSON, D.J.; SPANGFORT, M.; STAEHELIN, L.A.; THORNER, J.P. A nomenclature for the genes encoding the chlorophyll a/b binding proteins of higher plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 10, p. 242-53, 1992.
- JOHANSEN, D.A. **Plant Microtechnique**. New York, McGraw-Hill Book Company, 1940.
- JONES, M.G.K.; OUTLAW, W.H.; LOWRY, O.H. Procedure for the assay of sucrose in range  $10^{-7}$  -  $10^{-14}$  moles. **Plant Physiology**, Rockville, v. 60, p. 379-83, 1977.
- KAISER, W.M. & BRENDLE-BEHNISCH, E. Acid-base-modulation of nitrate reductase in leaf tissues. **Planta**, Berlin, v. 196, p.1-6, 1995

KELLMANN, J.-W.; MERFORTH, N.; WIESE, M.; PICHERSKY, E.; PIECHULLA, B. Concerted circadian oscillations in transcript levels of nineteen *Lha/b (cab)* genes in *Lycopersicon esculentum* (tomato). **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 237, p. 439-48, 1993.

KLEIN, R.R.; GAMBLE, P.E.; MULLET, J.E. Light-dependent accumulation of radiolabeled plastid-encoded chlorophyll *a*-apoproteins requires chlorophyll *a*. I Analysis of chlorophyll-deficient mutants and phytochrome involvement. **Plant Physiology**, Rockville, v. 88, p. 1246-56, 1988.

KO, K.; KO, Z.W.; TURPIN, D.H.; LABATE, C.; MOHANTY, N.; GRANELL, A. Overproduction of chlorophyll *a/b* binding protein enhance photosynthetic activity in transgenic tobacco. In MURATA, N (ed.), **Research in Photosynthesis**. Netherlands, Kluwer Academic Publishers, v 3, p. 445-8, 1992.

KRAUSE, G.H. Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 74, p. 566-74, 1988.

KRAUSE, G.H. & WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 42, p. 313-49, 1991.

KRETSCH, T.; EMMER, K. ; SCHÄFER, E. Spatial and temporal pattern of light-regulated gene expression during tobacco seedling development: the photosystem II-related genes *Lhcb* (Cab) and *PsbP* (Oee2). **The Plant Journal**, Oxford, v. 7, p. 715-29, 1995.

KRÓL, M.; SPANGFORT, M.D.; HUNER, N.P.A.; ÖQUIST, G.; GUSTAFSSON, P.; JANSSON, S. Chlorophyll *a/b*-binding proteins, pigment conversion, and early light-induced proteins in a chlorophyll *b*-less barley mutant. **Plant Physiology**, Rockville, v.107, p. 873-843, 1995

KÜHLBRANDT, W. Three-dimensional structure of the light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein complex. **Nature**, London, v. 307, p. 478-80., 1994.

KÜHLDRANDT, W. & WANG, D.N. Three-dimensional structure of plant light-harvesting complex determined by electron crystallography. **Nature**, London, v. 350, p. 130-4, 1991

KÜHLDRANDT, W.; WANG, D.N.; FUJIYOSHI, Y. Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. **Nature**, London, v. 367, p. 614-21, 1994.

KUHLEMEIER, C.; GREEN,P.; CHUA,N.-H. Regulation of gene expression in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Stanford, v. 38, p. 221-57, 1987.

KUTTKAT, A.; GRIMM, R.; PAULSEN, H. Light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein inserted into isolated thylakoids binds pigments and is assembled into trimeric light-harvesting complex. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, p. 1267-76, 1995.

LABATE, C.A. The influence of temperature on the regulation of photosynthetic carbon assimilation in leaves of *Hordeum vulgare* L. Sheffield, 1989. 135p. Thesis (Doctor) - University of Sheffield.

LABATE, C.A. & LEEGOOD, R. Limitation of photosynthesis by changes in temperatures. Factors affecting the response of carbon dioxide assimilation to temperature in barley leaves. **Planta**, Berlin, v. 173; p. 905-10, 1988.

LABATE, C.A. & LEEGOOD, R. Influence of low temperature on respiration and contents of phosphorylated intermediates in darkened barley leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 91; p. 905-10, 1989.

LABATE, C.A. & LEEGOOD, R. Factors influencing the capacity for photosynthetic carbon assimilation in barley leaves at low temperatures. **Planta**, Berlin, v. 182; p. 492-500, 1990.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T<sub>4</sub>. **Nature**, London, v.227, p. 680-5, 1970.

LEA, P.J.; BLACKWELL, R.; CHEN, F.-L.; HECHT, U. Enzymes of ammonia assimilation. In: LEA, P.J. (ed). **Methods in Plants Biochemistry**. London, Academic Press, 1990, v. 3, p.257-75.

- LEEGOOD, R. Enzymes of the Calvin Cycle. In: LEA, P.J. ed. **Methods in Plants Biochemistry**. London, Academic Press, 1990, v. 3, p.15-37.
- LI, X.; HENRY, R.; YAUN, J. CLINE, K.; HOFFMAN, N.E. A chloroplast homologue of the signal recognition particle subunit SRP54 is involved in the post-translational integration of a protein into thylacoid membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.92, p. 3789-93, 1995.
- LILLO, C. & RUOFF, P. hysteric behavior of nitrate reductase. Evidence of an allosteric binding site for reduced pyrimidine nucleotides. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 267, p. 13456-9, 1992.
- LONG, S.P. & HÄLLGREN, J.E. Measurement of CO<sub>2</sub> assimilation by plants in the field and laboratory. In: COOMBS, J.; HALL, D.O.; LONG, S.P.; SCURLOCK, J.M.O (ed). **Techniques in bioproduitivity and photosynthesis**. Oxford, Pergamon Press, 1985, p.62-94.
- LONG, Z.; WANG, S.-Y.; NELSON, N. Cloning and nucleotide sequence analysis of genes coding for the major chlorophyll-binding protein of the moss *Physcomitrella patens* and the halotolerant alga *Dunaliella salina*. **Gene**, Amsterdam, v. 76, p. 299-312, 1989.
- LOWRY, O. & PASSONNEAU, J.V. **A flexible system of enzymatic analysis**. Academic Press, New York, 1972.

- LUTHE, D.S. Electrophoretic analysis of seed proteins in the dicotyledoneae. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v 10, p. 254-62, 1992.
- McNALLY, S.F.; HIREL, B.; GADAL, P.; MANN, F.; STEWART, G. Glutamine synthetases of higher plants. Evidence for a specific isoform content related to their possible physiological role and their compartmentation within the leaf. **Plant Physiology**, Rockville, v. 72, p. 22-5, 1983.
- MEEHAN, L.; HARKINS, K.; CHORY, J.; RODERMEL, S. *Lhcb* transcription is coordinated with cell size and chlorophyll accumulation. Studies on fluorescence-activated, cell-sorter-purified single cell from wild-type and mutants *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, Rockville, v.112, p. 953-63, 1996.
- MEYER, H.; THIENEL, U.; PIECHULLA, B. Molecular characterization of the diurnal/circadian expression of the chlorophyll a/b-binding proteins in leaves of tomato and other dicotyledonous and monocotyledonous plant species. **Planta**, Berlin, v. 180, p. 5-15, 1989.
- MULLET, J.E.; KLEIN, P.G. KLEIN, R.R. Chlorophyll regulates accumulation of the plastid-encoded chlorophyll apoproteins CP43 and D1 by increasing apoprotein stability. **Proceedings of the National Academy Sciences**, Washington, v.87, p. 4038-42, 1990.
- NAGY, F.; KAY, S.A.; CHUA, N.-H. Gene regulation by phytochrome. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 4, p. 37-42, 1988.

- NEUHAUS, H.E.; KRUCKEBERG, A.L.; FEIL, R.; STITT, M. Decrease - activity mutants of phosphoglucose isomerase in the cytosol and chloroplast of *Clarkia xantiana*. **Planta**, Berlin, v.178, P. 110-22, 1989.
- NEUHAUS, H.E.; QUICK, W.P.; SIEGEL, G.; STITT, M. Control of photosynthate partitioning in spinach leaves. Analysis of the interaction between feedforward and feedback regulation of sucrose synthesis. **Planta**, Berlin, v. 181; p. 583-92, 1990.
- OBERSCHIMIDT, O.; HÜCKING, C.; PIECHULLA, B. Diurnal Lhc gene expression is present in many but not all species of the plant kingdom. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 27, p. 147-53, 1995.
- PAUL, M.J.; KNIGHT, J.S.; HABASH, D.; PARRY, M.A.J.; LAWLOR, D.W.; BARNES, S.A.; LOYNES, A.; GRAY, J.C. Reduction in phosphoribulokinase activity by antisense RNA in transgenic tobacco: effect on CO<sub>2</sub> assimilation and growth in low irradiance. **The Plant Journal**, Oxford, v.7; p. 535-42, 1995.
- PETER, G.F. & THORNBER, J.P. Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment-proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 266, p. 16745-54. 1991.

- PICHERSKY, E.; BERNATZKY, R.; TANKSLEY, S.D.; BREIDENBACH, R.B.; KAUSCH, A.P. CASHMORE, A.R. Molecular characterization and genetic mapping of two clusters of gene encoding chlorophyll *a/b*-binding proteins in *Lycopersicon esculentum* (tomato). **Gene**, Amsterdam, v. 40, p. 247-58, 1985.
- PIECHULLA, B. Plastid and nuclear mRNA fluctuations in tomato leaves - diurnal and circadian rhythms during extended dark and light periods. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 11, p. 345-53, 1988.
- PIECHULLA, B. Changes of diurnal and circadian (endogenous) mRNA oscillations of the chlorophyll *a/b* binding protein in tomato leaves during altered day/night (light/dark) regimes. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.12, p.317-27, 1989.
- PIECHULLA, B. & GRUISSEM, W. Diurnal mRNA fluctuations of nuclear and plastid genes in developing tomato fruits. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 6, p. 3593-99, 1987.
- PIMENTEL GOMES,F. **Curso de Estatística Experimental** Livraria Nobel Ltda, São Paulo, 1976, 427p.
- PLUMLEY, F.G. & SCHIMIDT, G.W. Light-harvesting chlorophyll *a/b* complexes: interdependent pigment synthesis and protein assembly. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 7, p. 689-704, 1995.

PORTIS JR., A.R. Rubisco activase. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1015, p.15-28, 1990.

PORTIS JR., A.R. Regulation of Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 43, p. 415-37, 1992.

PREISS, J. & GREENBERG, E. Allosteric regulation of uridine diphosphoglucose: D - fructose - 6 - phosphate - 2 - glucosyl transferase (E.C.2.4.1.14). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 36, p. 289-95, 1969.

PREISS, J. & LEVI, C. Starch biosynthesis and degradation. In: HATCH, M.D. & BOARDMAN, N.R. (ed.). **The Biochemistry of Plants**. London, Academic Press, 1980, v.3, p. 371- 423.

QUICK, W.P.; SCHURR, U.; SCHEIBE, R.; SCHULZE, E.-D.; RODERMEL, S.R.; BOGORAD, L.; STITT, M. Decreased Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase in transgenic tobacco transformed with "antisense" *rbcS*. I Impact on photosynthesis in ambient growth conditions. **Planta**, Berlin, v. 183, p. 542-54, 1991.

QUILLERE, I.; DUFOSSE, C.; ROUX, Y.; FOYER, C.; CABOCHE, M.; MOROT-GAUDRY, J.-F. The effects of deregulation of NR gene expression on growth and nitrogen metabolism of *Nicotiana plumbaginifolia* plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 145, p. 1205-11, 1994.

- REES, D. & HORTON, P. The mechanism of changes in photosystem II efficiency in spinach thylakoids. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1016, p. 219-27, 1990.
- REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal Cell Biology**, New York, v.17,p.17, 1963.
- RIESMEIER,W.J.; FLÜGGE,U-I.; BURKHARD,S.; HEINEKE,D.; HELDT,H-W.; WILLMITZER,L.; FROMMER,W.B. Antisense repression of the chloroplast triose phosphate translocator affects carbon partitioning in transgenic potato plants. **Proceedings of the National Academy Sciences**, Washington, v.90, p.6160-4, 1993.
- SALVUCCI, M.E. Regulation of RUBISCO activity in vivo. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.77, p. 164-71, 1989.
- SANO, M. & KAWASHIMA, N. Isolation and partial characterization of the major seed protein from *Nicotiana tabacum* and accumulation during development. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.47, p. 1305-10, 1983
- SCHREIBER, U.; SCHLIWA, U.; BILGER, W. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v.10, p. 51-62, 1986.

- SCOTT, P.; LANGE, A.J. PILKIS, S.J. KRUGER, N.J. Carbon metabolism in leaves of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) containing elevated fructose 2,6-bisphosphate levels. **The Plant Journal**, Oxford, v.7, p. 461-9, 1995.
- SHARKEY, T.D.; STITT, M.; HEINEKE, D.; GERHARDT, R.; RASCHKE, K.; HELDT, H.W. Limitation of photosynthesis by carbon metabolism. II O<sub>2</sub>-insensitive CO<sub>2</sub> uptake results from limitation of triose phosphate utilization. **Plant Physiology**, Rockville, v. 81, p. 1123-29, 1986.
- SHARKEY, T.D.; VASSEY, T.L.; VANDERVEER, P.J.; VIESTRA, R.D. Carbon metabolism enzymes and photosynthesis in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) having excess phytochrome. **Planta**, Berlin, v. 185; p. 287-96, 1991.
- SHEWRY, P.R. Plant storage proteins. **Biological Review**, Prague, v. 70, p. 375-426, 1995.
- SPURR, A.R. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **Journal of Ultrastructure Research**, New York, v. 26, p. 31-43, 1969.
- STITT, M. Limitation of photosynthesis by carbon metabolism. I. Evidence for excess electron transport capacity in leaves carrying out photosynthesis in saturating light and CO<sub>2</sub>. **Plant Physiology**, Rockville, v. 81, p. 1115-22, 1986.

STITT, M. Fructose 2,6-bisphosphate and plant carbohydrate metabolism. **Plant Physiology**, Rockville, v. 84, p. 201-4, 1987.

STITT, M. Rising CO<sub>2</sub> levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 14. p. 741-62, 1991.

STITT, M. & HELDT, H.M. Control of photosynthetic sucrose synthesis by fructose 2,6-bisphosphate. VI. Regulation of cytosolic fructose-1,6-bisphosphate in spinach leaves by an interaction between metabolic intermediates and fructose 2,6-bisphosphate. **Plant Physiology**, Rockville, v. 78, p. 599-608, 1985.

STITT, M.; WILKE, I.; FEIL, R.; HELDT, H.W. Coarse control of sucrose-phosphate synthase in leaves: alterations of the kinetic properties in response to the rate of photosynthesis and accumulation of sucrose. **Planta**, Berlin, v.174; p. 217-30, 1988.

STITT, M. & QUICK, W.P. Photosynthetic carbon partitioning: its regulation and possibilities for manipulation. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.77, p. 633-41, 1989.

STITT, M; SCHAEWEN, von A.; WILLMITZER, L. "Sink" regulation of photosynthetic metabolism in transgenic tobacco plants expressing yeast invertase in their cell wall involves a decrease of the Calvin-cycle enzymes and an increase of glycolytic enzymes. **Planta**, Berlin, v. 183; p. 40-50, 1990.

STITT, M.; QUICK, W.P.; SCHURR, U.; SCHULZE, E.-D.; RODERMEL, S.R.; BOGORAD, L. Decreased Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase in transgenic tobacco transformed with "antisense" *rbcS*. II Flux-control coefficients for photosynthesis in varying light, CO<sub>2</sub>, and air humidity. **Planta**, Berlin, v. 183, p. 555-66, 1991.

STITT, M. & SONNEWALD, U. Regulation of metabolism in transgenic plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 46, p. 341- 68, 1995.

SULLIVAN, T.D.; CHRISTENSEN, A.H.; QUAIL, P.H. Isolation and characterization of a maize chlorophyll a/b binding protein gene that produces high levels of mRNA in the dark. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 215, p.431-40, 1989.

TERZAGHI, W.B. & CASHMORE, A.R. Light-regulated transcription. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 46, p. 445-74, 1995.

THOMPSON, F.W.; & WHITE, M.J. Physiological and molecular studies of light-regulated nuclear genes in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.42, p.423-66, 1991.

TINGEY, S.V. & CORUZZI, G.M. Glutamine Synthetase of *Nicotiana plumbaginifolia*. Cloning and *in vitro* expression. **Plant Physiology**, Rockville, v. 84, p. 366-73, 1987.

- TURNER, S.R.; BARRAT, D.H.P.; CASEY, R. The effect of different alleles at the *r* locus on the synthesis of seed storage proteins in *Pisum sativum*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 14, p. 793-803, 1990.
- van KOOTEN, O. & SNEL, J.F.H. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 25, p. 147-50, 1990.
- VERNON, L.P. Spectrophotometric determination of chlorophylls and pheophitins in plant extracts. **Analytical Chemistry**, Washington, v.32,p. 1144-50, 1960.
- VINCENTZ, M.; MOUREAUX, T.; LEYDECKER, M.-T.; VAUCHERET, H.; CABOCHE, M. Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by N and C metabolites. **The Plant Journal**, Oxford, v.3; p. 315-24, 1993.
- VOGELMANN, T.C.; NISHIO, J.; SMITH, W. Leaves and light capture: light propagation and gradients of carbon fixation within leaves. **Trends in Plant Science**, v. 1, p. 65-70, 1996.
- von CAEMMERER, S. & FARQUHAR, G.D. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and gas exchange of leaves. **Planta**, Berlin, v. 153, p. 376-387, 1981.

- WATSON, M. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metal. **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, New York, v.4, p. 475-81, 1958.
- WEBER, H.; HEIM, U.; BORISJUK, L.; WOBUS, U. Cell-type specific, coordinate expression of two ADP-glucose pyrophosphorylase genes in relation to starch biosynthesis during seed development of *Vicia faba* L. **Planta**, Berlin, v.195, p. 352-61, 1995.
- WEHMEYER, B.; CASHMORE, A.R.; SCHAFER, E. Photocontrol of the expression of genes encoding chlorophyll *a/b* binding proteins and small subunit of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in etiolated seedlings of *Lycopersicon esculentum* (L.) and *Nicotiana tabacum* (L.). **Plant Physiology**, Rockville, v. 93, p. 990-7, 1990.
- WOBUS, U.; BORISJUK, L.; PANITZ, R.; MANTEUFFEL, R.; BÄUMLEIN, H.; WOHLFAHRT, T.; HEIM, U.; WEBER, H.; MISÉRA, S.; WESCHKE, W. Control of seed storage protein gene expression: new aspects on an old problem. **Journal of Plant Physiology**, Washington, v. 145, p. 592-99, 1995.
- WRAY, J.L. & FIDO, R.J. Nitrate reductase and nitrite reductase. In: LEA, P.J. ed. **Methods in Plants Biochemistry**. London, Academic Press, 1990, v. 3, p.241-56.
- WRAY, J.L. & FILNER, P. Structural and functional relationships of enzyme activities induced by nitrate in barley. **Biochemical Journal**, London, v. 119, p. 715-25, 1970.