**ESTUDO DA ASSIMILAÇÃO DO NITRATO EM PLANTAS
TRANSGÊNICAS DE TABACO (*Nicotiana tabacum*. L.c.v. PETITE
HAVANA SR 1) QUE EXPRESSAM O GENE *Lhcb1*2* DE
ERVILHA CONSTITUTIVAMENTE.**

Gustavo José Meano Brito

Biólogo

Orientador: Prof. Dr. **Carlos Alberto Labate**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia, Área de Concentração:
Genética e melhoramento de plantas.

PIRACICABA

Estado de São Paulo – Brasil

Fevereiro de 2001

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

Brito, Gustavo José Meano

Estudo da assimilação do nitrato em plantas transgênicas de tabaco (*Nicotina tabacum*. L.c.v. Petite Havana SR1) que expressam o gene *Lhcb1*2* de ervilha constitutivamente / Gustavo José Meano Brito. - - Piracicaba, 2001.

77 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2001.
Bibliografia.

1. Fisiologia vegetal 2. Fotossíntese 3. Fumo transgênico 4. Glutamina 5.
Melhoramento genético vegetal 6. Metabolismo vegetal 7. Redutase de nitrato I. Título

CDD 633.71

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

*Dedico a meus queridos pais José da Hora e
Maria da Penha, e ao
Irmão e Amigo Rodrigo Meano*

Agradecimentos

Nossas vidas são por vezes tão confusas que levamos tempo para entendê-las. O desenvolvimento científico se faz da mesma maneira. Obrigado Carlos Alberto Labate, pois sua forte personalidade e orientação foram muito importantes para o meu amadurecimento profissional e pessoal.

Os caminhos do dia a dia ficam bem mais agradáveis ao lado de pessoas fortes e otimistas. Obrigado Mônica Labate pelos ensinamentos laboratoriais e incentivo.

Cada pessoa que passa em nossa vida deixa uma marca que influencia diretamente a nossa história. O convívio diário em um laboratório gera uma diversidade de momentos, que por si só valem a pena. Sem os colegas de laboratório esta dissertação nunca ficaria da mesma forma. Obrigado Zé, Luciana, Solange, Sílvia, Marcelo, Alexander, Karine, Palmira, los compañeros argentinos: Esteban, Alejandro, Guillermo, estagiários: Juliano, Raphael, Daniele, Raqueline e Letícia.

O centro da pesquisa é a arte de questionar de modo crítico e criativo, para, assim, melhor intervir na realidade. Como tal, constitui-se a mola mestra do aprender a aprender. Em vez de decorar, saber pensar. Os caminhos da pesquisa nos levam ao encontro de companheiros que vivenciam diariamente a busca do conhecimento, e conseguem compartilhar os saberes adquiridos, disponibilizando desta forma o conhecimento científico. Obrigado a todos os colegas do Departamento de Genética ESALQ-USP que de alguma forma contribuíram na elaboração desta dissertação, em especial: Prof. Márcio, Reinaldo, Sabrina, Prof. Ricardo, Salete, Léo, Laboratório de Fisiologia Vegetal - UNICAMP, Prof. Sodek, Luciano, e Departamento de Estatística ESALQ por compartilharem as técnicas e saberes laboratoriais.

Enfim, sem os amigos tudo fica mais difícil, portanto obrigado a todos que passaram por minha vida durante estes meses que residi em Piracicaba.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xii
SUMMARY.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 O fotossistema de plantas superiores.....	18
2.2 Sistema coletor de luz.....	19
2.3 Fotossistema em condições de baixa luminosidade.....	21
2.4 Interação entre metabolismo do carbono e assimilação do nitrogênio em plantas.....	23
2.5 Enzima Nitrato Redutase.....	24
2.6 Regulação da Expressão gênica da NR.....	26
2.7 Enzima Glutamina Sintetase.....	29
2.8 Aminotransferases.....	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1 Cultivo das plantas transgênicas e selvagens.....	32
3.2 Preparo do extrato foliar para determinação de metabólitos.....	33
3.3 Determinação de feofitina.....	34
3.4 Determinação do conteúdo de metabólitos do ciclo de Calvin -Benson.....	34
3.4.1 Determinação do conteúdo de Ácido 3-Fosfoglicérico.....	35
3.4.2 Determinação do conteúdo de Triose Fosfato e Frutose 1,6 Bifosfato.....	35
3.4.3 Determinação do conteúdo de Hexoses fosfato.....	36
3.5 Medida da atividade da glutamina sintetase.....	36
3.6 Medida da atividade da nitrato redutase.....	37
3.7 Quantificação do nitrato em folhas/raízes.....	38
3.8 Determinação de amino ácidos em tecido foliar.....	39
3.9 Cálculo da Clorofila.....	40
3.10 Análise Estatística.....	41
4 RESULTADOS.....	42
4.1 Determinação da atividade da Nitrato Redutase.....	42
4.2 Determinação da Glutamina Sintetase.....	44
4.3 Determinação da relação 3PGA/TP e hexoses em folhas.....	46
4.4 Determinação do Conteúdo de Nitrato em Folhas e Raízes.....	51
4.5 Determinação dos Amino Ácidos.....	52
5 DISCUSSÃO.....	60
5.1 Aumento da ativação da Nitrato Redutase.....	60
5.2 Aumento da atividade da Glutamina sintetase.....	64
5.3 Aumento da porcentagem de glutamina e glutamato, e diminuição da porcentagem de treonina.....	66
5.4 Aumento da porcentagem de Glutamina e Glutamato, e diminuição de Treonina.....	67
6 CONCLUSÃO.....	70
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	amino ácidos
ADP	adenosina 5-difosfato
AGPase	ADPglucose pirofosforilase
Ala	alanina
AMP	adenosina 5-monofosfato
Arg	arginina
Asp	aspartato
Asn	asparagina
ATP	adenosina 5-trifosfato
CAB	<i>chlorophyl a/b binding protein</i>
CO ₂	gás carbônico
CR	centro de reação
DHAP	dihidroxiacetona-fosfato
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido tetra acético etilenodiamino
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
F6P	frutose 6-fosfato
FBP	frutose bifosfato (Total)
Fru1,6 bisP	frutose 1,6-bifosfato
Fru2,6 bisP	frutose 2,6-bifosfato
Fru1,6 bisPase (FBPase)	frutose 1,6-bifosfatase
Fru6P,2-Quinase	frutose 6-fosfato2-quinase
GAP-DH	gliceraldeído 3-P desidrogenase
G1P	glucose 1-fosfato
G6P	glucose 6-fosfato
Glu	glutamato
Gln	glutamina
Gly	glicina

GS (E.C. 6.3.1.2)	glutamina sintetase
Hepes	ácido N-2-hidroxietilpiperazine-N'2-etanosulfônico
His	histidina
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Precisão
kDa	kilodaltons
Ile	isoleucina
LHC	Complexo coletor de luz
Leu	leucina
Lys	lisina
MES	ácido 2-(N-morfolino)etanosulfônico
Met	metionina
MoCo	Molibidênio-pterina
Mops-NaOH	ácido 3-(morfolino)propanosulfônico
NAD ⁺	dinucleotídeo adenina nicotinamida
NADH	dinucleotídeo adenina nicotinamida (reduzido)
NADH ⁺	dinucleotídeo adenina fosfato nicotinamida
NADH-GDH (E.C. 1.4.1.2)	glutamato desidrogenase
NADPH	dinucleotídeo adenina fosfato nicotinamida (reduzido)
NiR (E.C. 1.7.7.1)	nitrito redutase
NR (E.C.1.6.6.1)	nitrato redutase
NRK	nitrato redutase kinase
NO ₃ ⁻	Nitrato
OAA	oxalacetato
PEP	fofoenolpiruvato
PEPC	fofoenolpiruvato carboxilase
Phe	fenilalanina
2PGA	ácido 2-fosfoglicérico
PGA	ácido 3-fosfoglicérico
PGK	fosfoglicerato quinase
Pi	fosfato inorgânico

PMSF	fenilmetilsulfonil fluorido
PS	fotossistema
RUBISCO	ribulose 1,5-bifosfato caborxilase/oxigenase
RuBP	ribulose 1,5-bifosfato
Ser	serina
SPS	sacarose fosfato sintase
Thr	treonina
TP	triose fosfato
Tris	2-amino 2-(hidroximetil)propano 1,3-diol
Tyr	tirosina
UDP	uridina 5-difosfato
UDPG	uridina 5-difosfato glucose
Val	valina

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Transporte de eletrons durante a fotossíntese na membrana dos tilacóides. O fotossistema II esta apresentado com uma visão geral das subunidades que o compõem.....	20
2 Esquema simplificado da regulação da Nitrato Redutase pela fosforilação reversível da enzima seguida da ligação da proteína 14-3-3.....	25
3 Representação esquemática do gene inserido.....	32
4 Quantificação de amino ácidos em plantas cultivadas em baixa luminosidade.....	54
5 Porcentagem de amino ácidos em plantas cultivadas em baixa luminosidade.....	55

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Atividade da enzima Nitrato Redutase, na presença de Mg^{+2} e na ausência de Mg^{+2} . Protocolo I.....	43
2 Teste de comparação das médias da porcentagem de ativação da enzima NR em plantas cultivadas em baixa luminosidade.....	43
3 Atividade da enzima Nitrato Redutase, na presença de Mg^{+2} e na ausência de Mg^{+2} . Protocolo II.....	44
4 Teste de comparação das médias da porcentagem de ativação da enzima NR em plantas cultivadas em baixa luminosidade.....	44
5 Atividade da enzima Glutamina Sintetase. Protocolo I.....	45
6 Comparações feitas a partir do teste de friedman das médias da atividade da GS em plantas transgênicas cultivadas em baixa luminosidade.....	45
7 Atividade da enzima Glutamina Sintetase. Protocolo II.....	46
8 Comparações feitas a partir do teste de friedman das médias da atividade da GS em plantas transgênicas cultivadas em baixa luminosidade.....	46
9 Conteúdo de metabólitos em plantas cultivadas em baixa luminosidade e analisadas em baixa luz.....	47
10 Conteúdo de metabólitos em plantas cultivadas em baixa luminosidade e analisadas em alta luz.....	48
11 Comparações entre genótipos cultivados em baixa luz e analisados em baixa luz.....	49
12 Comparações entre genótipos cultivados em baixa luz e analisados em alta luz.	50
13 Resultados do conteúdo de NO_3^- em folhas de plantas com 60 dias.....	51

14	Resultados do conteúdo de NO_3^- em raízes de plantas com 60 dias.....	51
15	Valores médios da quantificação de amino ácidos em plantas cultivadas em baixa luminosidade.....	52
16	Análise estatística dos resultados de amino ácidos em plantas cultivadas em baixa luminosidade.....	53
17	Teste de comparação entre as plantas analisadas para o amino ácido Thr.....	53
18	Valores médios da porcentagem de cada amino ácido em plantas cultivadas em baixa luminosidade.....	55
19	Análise estatística dos resultados de porcentagem de amino ácidos em plantas cultivadas em baixa luminosidade.....	56
20	Teste de comparação entre as plantas analisadas para os amino ácidos Glu, Gln e Thr. Em plantas cultivadas em baixa luminosidade.....	56
21	Quantificação de amino ácidos em plantas cultivadas em baixa luminosidade. Resultados obtidos em um <i>pool</i> de 7 plantas.....	58
22	Quantificação de amino ácidos em plantas cultivadas em baixa luminosidade. Resultados obtidos em um <i>pool</i> de 7 plantas.....	59

**ESTUDO DA ASSIMILAÇÃO DO NITRATO EM PLANTAS
TRANSGÊNICAS DE TABACO (*Nicotiana tabacum*. L.c.v. PETITE HAVANA
SR 1) QUE EXPRESSAM O GENE *Lhcb1*2* DE ERVILHA
CONSTITUTIVAMENTE.**

Autor: Gustavo José Meano Brito

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Labate

Resumo

O sistema coletor de luz (LHC) é o principal complexo de proteínas associado a carotenóides e clorofilas, localizado nas membranas dos tilacóides nas plantas e algas superiores. O LHC atua como um sistema antena para o fotossistema I e o fotossistema II e tem um papel chave na captação da energia luminosa para a fotossíntese (Horton et al, 1996). Os processos de transporte de elétrons, fixação do CO₂ e assimilação do nitrato estão relacionados às necessidades de ATP, poder redutor e cofatores proteicos como, ferredoxina ou tiorredoxinina. Existe uma forte correlação entre o metabolismo do carbono e nitrogênio em plantas superiores, pois os esqueletos carbônicos e a energia, produtos da fotossíntese, são necessários à assimilação do nitrato direta ou indiretamente, através da síntese de sacarose (Ferrario-Mery, 1998; Foyer et al., 1998). A regulação deste processo é necessária para prevenir uma competição potencial da disponibilidade de poder redutor e precursores orgânicos, necessários para às vias biossintéticas (Champigny, 1995). A assimilação do nitrato para a biossíntese de amino ácidos e outras moléculas necessita de ferredoxina reduzida (Durnford & Falkowski, 1997). Neste trabalho nós investigamos a regulação do metabolismo fotossintético e a assimilação do nitrato, em plantas transgênicas de tabaco que produzem uma proteína da ervilha de 28kDa do sistema principal do complexo LHCII. As análises foram conduzidas em condições de baixa luminosidade. Os resultados demonstraram um aumento na assimilação de nitrogênio das plantas transgênicas, evidenciado pelo maior estado de ativação da nitrato redutase, maior atividade da glutamina sintetase e mudanças no conteúdo de amino ácidos. Glutamato e Glutamina aumentaram nas folhas das plantas transgênicas, enquanto Treonina teve uma severa diminuição.

STUDY OF THE NITRATE ASSIMILATION IN TRANSGENIC PLANTS OF TOBACCO (*NICOTIANA TABACUM* L., CV PETITE HAVANA, SR1) EXPRESSING THE PEA LHCB1*2 GENE CONSTITUTIVELY.

Author: Gustavo José Meano Brito

Advisor: Prof. Dr. Carlos Alberto Labate

Summary

The light harvesting system (LHC) is the main complex of proteins associated with carotenoids and chlorophylls, located in thylakoid membrane in plants and green algae. LHC acts as an antenna system to photosystem I and photosystem II and plays a key role in harvesting light for photosynthesis (Horton et al, 1996).

The processes of photosynthetic electron transport, CO₂ fixation and nitrogen assimilation are tightly regulated due to the requirements for ATP, reductant and protein cofactors such as ferredoxin or thioredoxin. There is a strong correlation between C and N metabolism in higher plants, because the C skeletons and the energy produced by photosynthesis, are necessary for nitrate assimilation directly or indirectly, via sucrose synthesis. (Ferrario-Mery, 1998, Foyer et al., 1998).

Regulation of this processes are required to prevent potential competition allowing allocation of reducing power and appropriate organic precursors to the required biosynthetic pathways (Champigny, 1995).

The assimilation of nitrate for the biosynthesis of amino acids and other molecules requires photosynthetically reduced ferredoxin (Durnford & Falkowski, 1997). In this work we investigate the regulation of photosynthetic metabolism and the nitrate assimilation in transgenic plants of tobacco which produce the 28kDa pea protein of the main LHCII complex. Enzyme activities were measured in plants grown under low light conditions.

The results showed an increased nitrogen assimilation of the transgenic plants, evidenced by an increase in the activation state of nitrate reductase, higher activity of glutamine synthetase and changes in amino acids content. Glutamate and glutamine increased in leaves of transgenic plants, while threonine had a severe reduction.

1. INTRODUÇÃO

As constantes variações nos fatores ambientais, como luz, temperatura, disponibilidade hídrica entre outros, exigem das plantas mecanismos de aclimação rápida às novas condições, de tal forma que o seu desenvolvimento e reprodução sejam pouco alterados. As plantas são capazes de ajustar o tamanho do sistema antena de acordo com a disponibilidade de luz para o crescimento. Por exemplo, em condições de sombreamento, alteram a alocação do nitrogênio disponível no estroma dos cloroplastos, principalmente na forma da enzima Rubisco, para as proteínas dos tilacóides, na tentativa de aumentar o tamanho do sistema coletor de luz (LHCII e LHCI) e o transporte de elétrons (Stitt, 1991). Até recentemente acreditava-se que o tamanho do sistema coletor de luz era determinado principalmente pela ação de moléculas fotorreceptoras, como os fitocromos, que regulariam a expressão dos genes fotossintéticos. Ao contrário, está cada vez mais evidente que os sistemas coletores de luz nos cloroplastos são entidades autoregulatórias e respondem ao estado de redução dos componentes do transporte de elétrons nas membranas dos tilacóides (Allen et al., 1995). O mecanismo de sinalização, presente nos tilacóides para indicar o aumento no estado de redução das membranas, envolve um intrincado conjunto de fatores de regulação pós-tradução com a fosforilação das principais proteínas do LHCII. Em condições de excesso de luz, o aumento no estado de redução das plastoquinonas, localizadas entre os dois fotossistemas, promove a ativação de uma proteína quinase que fosforila o seu alinhamento com o PSII e o consequente

distanciamento em direção do PSI, transferindo parte da energia diretamente para este fotossistema. O mecanismo de ajuste na distribuição da energia de excitação entre os dois fotossistemas é extremamente importante para evitar a fotodestruição do PSII causada pelo excesso de luz. A longo prazo (horas-dias) o aumento no estado de redução das membranas dos tilacóides leva à diminuição na transcrição dos genes *Lhcb*, responsáveis pela síntese das proteínas CAB (“Chlorophyll a/b binding protein”) do LHCII e das proteínas do centro de reação (CR) do PSII. Dessa forma, os cloroplastos regulam o tamanho das antenas e fotossistemas, proporcionalmente à intensidade de luz, onde a planta está crescendo. Com a diminuição da intensidade de luz tem-se uma maior transcrição dos genes do LHCII e PSII, propiciando um aumento do tamanho das antenas e do fotossistema para absorver mais luz e transduzir mais energia. O mecanismo de sinalização para o controle da expressão desses genes ainda não está totalmente conhecido, porém existem evidências de que a ativação dos genes envolve uma ou mais proteínas fosfatases no citossol.

Com o objetivo de aumentar o tamanho do LHCII e estudar as consequências sobre a regulação do processo fotossintético, plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR1) foram transformadas com o gene quimérico *Lhcb1*2* de ervilha (Janson et al., 1992) sob o controle do promotor constitutivo 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV). Os resultados desse trabalho inicial mostraram que a expressão ectópica do gene *Lhcb1*2* levou ao aumento da capacidade fotossintética das plantas transgênicas em condições limitantes de luz, além de induzir uma série de efeitos pleiotrópicos que resultaram no aumento da biomassa vegetal, alterações morfológicas e anatômicas das folhas, com as transgênicas apresentando um maior número de cloroplastos por célula, além de um menor número de células por área. Do ponto de vista metabólico, as plantas transgênicas apresentam aumento no conteúdo de carboidratos (amido e sacarose), principalmente nas folhas mais jovens; maior conteúdo de amido nas sementes e aumento no tamanho das flores. Esses resultados levantaram uma série de questões sobre a regulação do metabolismo fotossintético, suas interações com a assimilação do nitrato e síntese de amino ácidos, e as consequências para o desenvolvimento e produtividade das plantas.

O objetivo do presente trabalho foi de estudar as interações do metabolismo do carbono e nitrogênio em plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR1) que expressam o gene quimérico *Lhcb1*2* (TR-1 e TR-2). As plantas foram cultivadas em baixa luminosidade ($100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e as análises enzimáticas realizadas em discos de folhas congelados no momento de sua coleta, utilizou-se um sistema de análises múltiplas que permite determinar a taxa fotossintética e fluorescência da clorofila em diferentes condições de temperatura, disponibilidade de CO_2 e luz.

As análises efetuadas nas plantas transgênicas apresentaram alterações na atividade e estado de ativação das enzimas envolvidas na assimilação do nitrato, Nitrato Redutase (NR) e Glutamina Sintetase (GS). Além disso, foram observadas alterações nas concentrações dos vários metabólitos que participam do processo fotossintético (3PGA, Triose-P), açúcares (G6P, F6P, G1P, hexoses), assimilação do nitrato (Glutamato, Glutamina e Nitrato).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O fotossistema das plantas superiores.

A fotossíntese compreende uma série de reações que iniciam nas membranas dos tilacóides com a captação da energia solar por um grupo de pigmentos complexados às proteínas (LHCII e LHCI), e associados aos fotossistemas II e I, respectivamente. Os LHCII e LHCI são formados por vários complexos distintos de proteínas que ligam os pigmentos de clorofila *a* e *b*, e carotenóides (Andersson e Styring, 1991; Golbeck e Bryant, 1991; Green et al., 1991). A função das proteínas CAB é a de orientar a disposição espacial das moléculas de clorofila e carotenóides, para que a energia seja transferida ao PSII de maneira eficiente (Külbrandt et al., 1994). Cerca de 200-300 moléculas de clorofila estão associadas a cada centro de reação (CR), formando uma unidade funcional do PSII (Horton et al., 1996). Os LHCII consistem de dois tipos distintos de complexos pigmento-proteína. O primeiro possui, duas proteínas relacionadas, CP47 e CP43 (que estão acopladas a aproximadamente 50 moléculas de clorofila *a*), ligadas ao centro de reação formando a parte central do PSII (Figura 1). O segundo tipo de complexos associados ao CR são os complexos do LHCII, consistindo de polipeptídeos de 20-30 kDa associados a clorofilas do tipo *a* e *b* e xantofilas. O LHCIIb é o principal complexo; possui uma estrutura trimérica e está associado a aproximadamente 60% das clorofilas do PSII. O LHCIIb é composto por polipeptídeos de 28, 27 e 25 kDa, codificados pelos genes

Lhcb1, *Lhcb2* e *Lhcb3*, respectivamente. As proteínas CAB estão organizadas em populações proximais (25 e 28 kDa) e distais (27 e 28 kDa). Os complexos menores, LHCIIa (CP29), LHCIIc (CP26) e LHCIIId (CP24) são proteínas monoméricas, e estão associadas a apenas 5% do total de clorofila do PSII (Horton et al., 1996; Külbrandt et al., 1994). Acredita-se que esses complexos têm por função ligar o CR do PSII aos complexos LHCIIb. Um LHCII típico contém 5 complexos LHCIIb e 3-4 complexos menores, os quais formam juntos uma grande antena oligomérica na membrana dos tilacóides (Bassi et al., 1992; Jansson, 1994).

As proteínas CAB são codificadas por genes nucleares que pertencem a uma família multigênica consistindo de pelo menos 5 genes em *Arabidopsis*, 6 em *Nicotiana tabacum*, 8 em *Nicotiana plumbaginifolia* e 15 genes em tomate (Jansson et al., 1992). Essas proteínas são sintetizadas no citoplasma e depois importadas pelo cloroplasto onde sofrem processamento para serem integradas às membranas dos tilacóides (Green et al., 1991).

2.2. Sistema coletor de luz

As plantas são capazes de ajustar o tamanho do sistema coletor de luz de acordo com a luminosidade disponível para o crescimento (Anderson e Anderson, 1988). A quantidade desses complexos determina a maior ou menor capacidade da planta captar a energia solar. Em baixa luminosidade, a habilidade da planta manter boas taxas fotossintéticas é condicionada pela sua capacidade genética de aumentar a quantidade dos LHCII. Para contornar esta limitação, Ko et al., 1992 e Real, 1997 mostraram que é possível aumentar a quantidade de LHCII por PSII, expressando o gene *Lhcb 1*2* de ervilha que codifica a proteína CAB tipo I (28 kDa) do LHCIIb, em plantas transgênicas de tabaco. Duas linhagens transformadas independentemente (CAB-1 e CAB-2) foram selecionadas de uma série de 21, cujos níveis endógenos da proteína CAB foram os mais elevados.

Figura 1. Transporte de elétrons durante a fotossíntese na membrana dos tilacóides. O fotossistema II está apresentado com uma vista geral das subunidades que o compõem. Adaptado de Alberts et al, 1994 e Hankamer et al, 1997.

2.3. Fotossistema em condições de baixa luminosidade.

Plantas de sombra ou expostas a baixas luminosidades possuem mais clorofila *b* e mais sistemas de captação da energia luminosa PSII (LHC II) e PSI (LHC I) para maximizar a captação da luz. Esta dinâmica dos componentes do sistema de captação da energia luminosa, presente em plantas expostas a baixas luminosidades, ocorre com utilização da energia gerada no transporte de elétrons, fotofosforilação de proteínas, além de, utilizar componentes do sistema de fixação de carbono, particularmente Rubisco (E.C. 4.1.1.39). Estas alterações resultam em menores taxas fotossintéticas, uma vez que as plantas nesta condição saturam em baixas irradiâncias (Anderson, 1995).

No presente estudo, quando cultivadas em condições limitantes de luz, as plantas *Lhcb1*2* transgênicas de tabaco e petúnia crescem mais vigorosas que as selvagens. A expressão ectópica do gene causou uma série de efeitos pleiotrópicos que resultaram em alterações na morfologia e desenvolvimento das plantas. As plantas transgênicas possuem folhas maiores, borda contínua e espaços intercelulares maiores. A análise estatística da contagem de cloroplastos por células do parênquima paliçádico por extensão linear e área apresentou diferenças, sendo o número de cloroplastos por célula maior nas plantas transgênicas (Real, 1997). O número de células da epiderme superior por extensão linear também é significativamente menor, mostrando que o aumento na expansão foliar das plantas transgênicas se deve, provavelmente, ao aumento no número de cloroplastos por célula, levando a uma maior desorganização do parênquima paliçádico. Como consequência, os espaços intercelulares são maiores e as folhas mais grossas. A porcentagem de diminuição no número de células do parênquima paliçádico e das células da epiderme superior por extensão linear são muito semelhantes nas duas linhagens transgênicas (23-18% e 23-21,7% para a TR-1 e TR-2, respectivamente) (Labate et al, 2001). Esses resultados corroboram o aumento estimado na área foliar das plantas transgênicas usando a relação comprimento largura das folhas, que foi ao redor de 23,6-20,3% na TR-1 e TR-2, respectivamente. Quando o número total de cloroplastos das células do

parênquima paliçádico é estimado por área foliar, há uma redução nas plantas transgênicas, embora não seja estatisticamente significativo.

A germinação das sementes transgênicas de tabaco é mais precoce, ocorrendo cerca de 2-3 dias antes das selvagens; o hipocótilo das plântulas após 15 dias da germinação possui o dobro do comprimento do selvagem. O tempo para atingir o florescimento também foi alterado nas plantas transgênicas (100 dias) em relação às selvagens (75 dias) dependendo das condições do tratamento. Esse atraso no florescimento é consequência do aumento do período de desenvolvimento vegetativo, e consequente aumento no número de folhas nas plantas transgênicas até atingir o florescimento (30 folhas) em relação à selvagem 17 folhas. O atraso no desenvolvimento vegetativo é característico nas plantas transgênicas, apresentando internódios mais curtos.

A análise funcional das plantas transgênicas mostrou um aumento na capacidade fotossintética em baixa luminosidade. O “Quantum Yield” aparente e a taxa fotossintética foram determinados em condições saturantes de CO₂, utilizando um eletrodo de oxigênio. Não existem diferenças significativas do “Quantum Yield” aparente entre as plantas transgênicas e selvagens. Por outro lado, a capacidade fotossintética medida na faixa de 55-260 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ foi significativamente maior nas plantas transgênicas quando expressas com base no conteúdo de clorofila. Outro aspecto relevante diz respeito ao conteúdo de clorofila; não houve grandes diferenças, com exceção das plantas TR-2 que apresentaram uma ligeira diminuição no conteúdo total de clorofila (a + b). A relação clorofila a/b é um indicador do tamanho das antenas em relação ao PSII. Os dados revelam que não houve alteração dessa relação entre as plantas (Luciana, 2000). Entretanto, análises de densitometria de geis não desnaturantes (Deriphat-PAGE) mostraram que houve um aumento na quantidade de complexos LHCIIB trimérico em relação à LHCIIB monomérico, fotossistema II e fotossistema I (Labate et al., 2001). Esses resultados indicam que o tamanho do LHCII é maior nas plantas transgênicas (15-30%) quando comparado às selvagens. Por outro lado, a ausência de diferenças indica a existência de um mecanismo compensatório nas plantas transgênicas, onde a diminuição no número de cloroplastos

por área e a expansão foliar fazem com que o conteúdo de clorofila por área seja semelhante ao das plantas selvagens.

A aumento na capacidade fotossintética em baixa luminosidade também pode ser verificado com o aumento no conteúdo de carboidratos em folhas jovens e maduras, após 8h de exposição à baixa luminosidade. O conteúdo total de carboidratos (amido e sacarose) foi significativamente maior nas plantas transgênicas (Real, 1997).

2.4. Interação entre metabolismo do carbono e assimilação do nitrogênio em plantas

O primeiro passo na assimilação do nitrato envolve a redução à nitrito no citosol (Rufty et al., 1986; Vaughn e Campbell, 1988; Fedorova et al., 1994), catalisada pela enzima Nitrato Redutase (NR, EC 1.6.6.1), utilizando o poder redutor (NADH) gerado pelo catabolismo do carbono. A reação é altamente regulada e em muitas espécies vegetais as folhas são o principal local da redução do nitrato. O nitrito é reduzido à glutamina no estroma dos cloroplastos, pela Nitrito Redutase (NiR, EC 1.7.7.1) utilizando ferredoxina reduzida, produzida pela fotossíntese (Back et al., 1988). O custo energético da assimilação do nitrato representa cerca de 25% do total produzido pela fotossíntese (Guerrero et al., 1981; Solomonson e Barber, 1990), o que implica na necessidade do controle da distribuição da energia produzida pelo cloroplasto, entre fixação do carbono e a assimilação do nitrogênio.

Morcuende et al. (1998) investigaram a importância do fornecimento de açúcar na regulação do metabolismo do nitrogênio e ácidos orgânicos em plantas de tabaco e verificaram um aumento na taxa de assimilação do nitrato e síntese de α -oxoglutarato, e alguns amino ácidos, quando foi fornecido 25 mM de sacarose. A taxa *in vivo* da assimilação do nitrato (estimada pela acumulação do íon amônio e nitrato) teve um aumento de 2 vezes. Ocorreu um decréscimo de 3-fosfoglicerato (3PGA) e fosfoenolpiruvato (PEP) e um grande aumento de α -oxoglutarato, indicando que o fluxo de carbono da glicólise para os ácidos orgânicos foi estimulado pela sacarose. Os pesquisadores concluíram que a sacarose inicia uma ativação coordenada da assimilação do nitrato, amônia, biossíntese de amino ácidos, e síntese de α -

oxoglutarato. A sacarose estaria atuando de acordo com o nitrato e antagonisticamente com a glutamina (Gln) para aumentar a atividade da NR e a assimilação do nitrato. Complementando a ação do nitrato e glutamina, a sacarose aumentou o fluxo de nitrogênio via amônia para os amino ácidos, aumentando a formação de α -oxoglutarato.

2.5. Enzima Nitrato Redutase (E.C. 1.6.6.1)

A atividade da NR é regulada pelo controle da expressão gênica, modificando a quantidade da proteína e, também, pelo mecanismo pós-tradução de fosforilação reversível da proteína (Kaiser e Spill, 1991; Huber et al., 1996). A modificação covalente da enzima ocorre na presença de cátions divalentes, principalmente Mg^{2+} . A forma ativa da NR é rapidamente fosforilada por uma proteína quinase (Nitrato Redutase Quinase – NRK), que responde às alterações na concentração de Ca^{2+} do citossol e metabólitos fosfoester produzidos pela fotossíntese. A quinase é inibida por DHAP (dehidróxido acetona fosfato), glucose-6-fosfato (G6P) e frutose-1,6-bifosfato (F1,6bisP); intermediários da síntese de sacarose. Outros metabólitos fosfoesteres promovem uma inibição parcial da enzima. Fosfato inorgânico (Pi) e hexoses fosfato não produzem qualquer efeito inibitório sobre a quinase. Uma vez fosforilada a NR é rapidamente inibida por uma proteína da classe 14-3-3 (Huber et al., 1996). O acoplamento da proteína inibidora é acelerado pela presença de Mg^{2+} . O modelo atual sobre o mecanismo de inativação da NR propõe que a proteína 14-3-3 se acopla à região fosforilada da NR (SER 543 em espinafre e SER 534 em *Arabidopsis*) promovendo uma ligeira alteração conformacional, obstruindo o fluxo de elétrons entre os centros reativos (Huber et al., 1996). A NR é um dímero composto por duas subunidades idênticas, cada uma com peso molecular de aproximadamente 110 kDa, com dois sítios ativos distintos conectados por três domínios envolvidos no transporte de elétrons. Os elétrons provenientes de NAD(P)H são doados ao sítio ativo onde se localiza um dinucleotídeo flavina adenina (FAD), daí seguem em direção a uma molécula Fe-Heme e, finalmente, para o cofator molibdênio-pterina (MoCo), que reduz o nitrato a nitrito.

Figura 2. Esquema simplificado da regulação da Nitrito Redutase pela fosforilação reversível da enzima seguida da ligação da proteína 14-3-3 Adaptado de Huber et al, 1996.

2.6. Regulação da Expressão gênica da NR.

O controle da expressão gênica da NR está associado à presença de nitrato e aos produtos da fotossíntese; o aumento no conteúdo de sacarose na folha induz o aumento na quantidade de RNAm e da proteína NR (Cheng et al., 1992; Vincentz et al., 1993). Por outro lado, nessas condições a transcrição dos genes da fotossíntese (*Lhcb* e *rbcS*, por exemplo) é diminuída, o que permite manter a assimilação do nitrato sob controle da fotossíntese, mantendo um balanço entre os dois processos (Lin e Cheng, 1997; Jang e Sheen, 1997). Além dos açúcares, a luz também afeta a regulação dos genes fotossintéticos e da nitrato redutase entretanto, a sacarose pode substituir parcialmente a indução dos genes da NR como foi demonstrado em plântulas estioladas de *Arabidopsis* e *Nicotiana plumbaginifolia* (Cheng et al., 1992; Vincentz et al., 1993). A transcrição do gene NR na presença de nitrato (NO_3^-) e de luz é bastante rápida, ao redor de 40 min (Melzer et al., 1989). No caso do tabaco a expressão do gene NR é coordenada por um ritmo circadiano, com o aumento na quantidade de RNAm durante à noite e diminuição no decorrer do dia (Deng et al., 1991^b). O acúmulo da proteína atinge o máximo algumas horas após o pico do RNAm (Galangau et al., 1988). A glutamina, que atua como repressor da expressão do gene da NR, esta envolvida com o ritmo circadiano; o seu acúmulo está correlacionado com os baixos níveis de RNAm da NR (Deng et al., 1991^a). Este metabólito modula não apenas a expressão do gene da Nitrato Redutase como também da fosfoenol-piruvato carboxilase (PEPC), aumentando a atividade dessa última e diminuindo a primeira. Ao mesmo tempo, a glutamina possui efeitos mais imediatos na atividade da PEPC, com uma modulação direta do estado de fosforilação da proteína. A estimulação simultânea da fosforilação da PEPC (que aumenta a atividade) e da sacarose fosfato sintase (SPS), uma enzima importante para a síntese de sacarose (que é inativada), assegura o suprimento adequado de esqueletos carbônicos para a síntese de amino ácidos, às custas de uma desaceleração da síntese de sacarose. A fosforilação da proteína também interfere na rápida modulação da atividade da enzima NR. A atividade da NR é, portanto, coordenada com a atividade da SPS (Champigny, 1995).

A via de síntese da sacarose nas folhas possui dois pontos de regulação principais: a enzima frutose-1,6-bifosfatase (FBPase) e a SPS (Stitt, 1987). A triose-P exportada pelo cloroplasto após a fixação do CO_2 é rapidamente convertida em frutose-1,6-bifosfato (FBP) e hidrolisada à frutose-2,6-bifosfato, cuja síntese e degradação depende das enzimas Fru6P,2 Quinase e Fru2,6 Fosfatase, respectivamente, F6P e P_i ativam a quinase e inibem a fosfatase (Cseke e Buchanan, 1983^b; Cseke et al., 1983^a). Por outro lado, a atividade quinase é inibida por ácido fosfoglicérico (PGA) e triose-P, produtos da fixação fotossintética do CO_2 (Stitt, 1987). A FBPase está envolvida no controle inicial da síntese de sacarose; dependendo do consumo do conteúdo de sacarose a sua atividade é aumentada ou diminuída pelo metabólito F2,6 P. Por outro lado, a SPS sofre dois tipos de regulação: controle “fino” e por fosforilação (“coarse control”) (Stitt, 1987). O controle fino consiste da regulação alostérica da enzima por metabólitos que modificam a atividade da enzima. Por exemplo, glucose-6-fosfato (G6P) promove o aumento da atividade, elevando a afinidade da enzima por frutose-6-fosfato (F6P) (Stitt, 1987). Fosfato inorgânico (P_i) é um potente inibidor, competindo com UDP-glucose (Amir e Preiss, 1982; Doehlert e Huber, 1983). O controle por fosforilação resulta em modificações na atividade da SPS na luz, aumentando a sensibilidade da enzima por P_i . (Stitt, 1987; Huber et al., 1989). Dessa forma, as plantas conseguem regular a partição do carbono, aumentando ou diminuindo a síntese de sacarose em função da atividade da FBPase e, principalmente, regulando o estado de ativação da SPS via fosforilação reversível dessa proteína. Esse mecanismo de regulação está coordenado com a demanda de carbono para a síntese de amino ácidos. Por exemplo alterações rápidas no estado de ativação da SPS e fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) foram observadas quando altas concentrações de NO_3^- (40mM) foram fornecidas à folhas cultivadas em condições limitantes desse nutriente (Foyer et al., 1994; Van Quy et al., 1991; Van Quy e Champigny, 1992). A co-regulação do metabolismo de carbono e nitrogênio *via* fosforilação das proteínas levou a uma inibição da atividade da SPS e aumento da atividade da PEPC. O aumento na atividade da PEPC promoveu um aumento na síntese de malato desviando o fluxo de carbonos para a síntese de amino ácidos (Champigny e Foyer, 1992).

Champigny e Foyer (1992) propuseram que a coordenação entre o metabolismo do carbono e nitrogênio é exercida inicialmente pelos metabólitos glutamina e glutamato, que funcionam como sinais e regulam a atividade de quinases que irão regular as principais enzimas (SPS, NR e PEPC). Por exemplo, a indução ou repressão da síntese de RNAm da PEPC é função das concentrações intracelulares de glutamina e glutamato, respectivamente. A ativação ou inibição da proteína quinase que regula o estado de ativação da PEPC depende desses dois metabólitos, glutamina e glutamato, respectivamente.

Com a possibilidade de obtenção de plantas transgênicas que apresentam diferentes níveis de expressão de genes que codificam a síntese de enzimas regulatórias tem sido possível ampliar os estudos da regulação do metabolismo do carbono e nitrogênio em plantas. Vincentz e Caboche (1991) obtiveram plantas de *Nicotiana plumbaginifolia* que superexpressão o gene *nia-2* da NR, utilizando o promotor 35S do CaMV. As plantas apresentaram um aumento da atividade foliar da NR *in vitro*, e também, uma redução significativa de NO_3^- nas folhas e um aumento no conteúdo de glutamina (Foyer et al., 1994; Quillere et al., 1994). Foyer et al. (1994) analisaram plantas transgênicas de *N. plumbaginifolia* com diferentes níveis de expressão do gene da NR; com aumento na atividade da NR em 5 vezes e com diminuição da atividade até 20 vezes o valor observado em plantas não transformadas (controle). Em condições de saturação de luz as plantas com menor atividade da NR apresentaram um redução da taxa fotossintética por área, entretanto, as plantas superexpressando a enzima não apresentaram diferenças significativas em relação às plantas controle. Quando a taxa fotossintética foi expressa com base no conteúdo de clorofila as plantas com baixa expressão da enzima apresentaram taxas semelhantes ou até superiores às controle. Surpreendentemente, as plantas que superexpressam a NR apresentaram taxas de fotossíntese e respiração no escuro, relacionadas ao conteúdo de clorofila, semelhantes às plantas controle. Além disso, o conteúdo de carboidratos (amido e sacarose) e proteínas também não apresentaram diferenças. A atividade da enzima SPS foi muito semelhante nas plantas transgênicas, independentemente do nível de expressão do gene da NR. A atividade da PEPC ao contrário, foi maior tanto com base no conteúdo de clorofila ou proteína, nas plantas com baixa expressão da

NR comparado às plantas controle ou que superexpressam o gene *nia-2*. A partir desses resultados ficou evidente que o aumento da atividade da NR não foi suficiente para provocar qualquer impacto na capacidade fotossintética, crescimento ou produção de biomassa. O aumento da atividade da NR não resultou em grandes alterações na regulação do metabolismo de carbono e nitrogênio nas folhas.

2.7. Enzima Glutamina Sintetase (E.C. 6.3.1.2)

Originalmente se pensava que a amônia era incorporada na forma orgânica através de uma aaminação redutiva do 2-oxoglutarato, catalisada pela glutamato desidrogenase (NADH-GDH, EC 1.4.1.2). Agora acredita-se que a função da enzima é na direção da quebra do glutamato, liberando 2-oxoglutarato para o metabolismo no ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Existem muitas evidências de que a glutamina sintetase (GS, EC 6.3.1.2) é a porta principal de entrada da conversão da amônia para amino ácidos nas plantas superiores. A glutamina sintetase catalisa a conversão ATP dependente do glutamato para glutamina, a enzima possui afinidade muito alta pela amônia (K_m 3-5 μ M) e está presente em todos os tecidos de plantas (Lea, 1993).

Nas plantas superiores a GS é uma proteína octamérica com peso molecular nativo de 350-400 kDa. Em tamanho e estrutura quaternária parece muito a enzima isolada dos mamíferos, mas é distinta das enzimas isoladas das bactérias, que consiste de 12 subunidades. Níveis muito altos de atividade da GS foram isolados de nódulos de raízes fixadoras de nitrogênio. Análises das subunidades individuais da GS demonstraram que existem três formas isoeletricas distintas (α , β , γ , nas folhas foi demonstrado que elas estão localizadas no citoplasma (GS1) e no cloroplasto (GS2). Foi estabelecido para *Phaseolus vulgaris* que a GS é codificada por uma família pequena de multigenes, e as várias subunidades existentes na estrutura desta enzima é explicada em nível gênico. Existe uma grande similaridade (74%) entre as seqüências do cloroplasto e citoplasmática, o que tem levado ao questionamento de que os dois genes surgiram de uma duplicação de um gene nuclear pré-existente, seguido de uma modificação.

A GS cloroplástica nas folhas é aparentemente regulada pela luz. Em trigo a atividade enzimática das folhas aumenta com a idade, e existe uma correlação clara com a capacidade fotossintética e fotorrespiratória. Em ervilhas, o RNAm da GS₂ aumenta aproximadamente 20 vezes em abundância com 72 horas de iluminação de folhas estioladas, enquanto o RNAm GS₁ não é alterado.

Tem sido demonstrado que a atividade da GS das plantas aumenta várias vezes durante a nodulação de várias leguminosas. Este aumento ocorre ao mesmo tempo que a nitrogenase é expressa no bacterioide *Rhizobium* e a leghemoglobina é produzida no citossol da planta. O aumento do RNAm da GS durante a nodulação de *P. vulgaris* pode ser devido à indução do gene *gln-γ* (Lea, 1993).

2.8. Aminotransferases

As aminotransferases, também conhecidas como transaminases, catalizam a transferência de um grupo amino da segunda posição de um amino ácido para um 2-óxo-ácido, produzindo um novo amino e um novo óxo-ácido. Glutamato é o maior doador de amino e faz parte de duas reações importantes. Ambas reações liberam 2-oxoglutarato, que pode retornar para o ciclo da GS ou ciclo da glutamato sintase. As enzimas aminotransferases têm sido detectadas em plantas que sintetizam todos os amino ácidos protéicos (exceto prolina) fornecendo o correto precursor oxó-ácido disponível. Assim o nitrogênio pode ser prontamente distribuído para o glutamato, via aspartato e alanina para todos os amino ácidos. A reversibilidade destas reações permite mudanças leves na demanda de para amino ácidos chaves, apesar de que em vias específicas, como fotorrespiração, certas enzimas tendem a operar somente em uma direção. Existem boas evidências de que as aminotransferases são promíscuas e utilizam uma vasta gama de substratos tanto de amino quanto oxó-ácidos. Foram encontradas várias formas isoenzimáticas da aspartato aminotransferase em plantas superiores, e existe boa evidência de que o citoplasma, mitocondria, cloroplasto e peroxissomo, cada um possui sua própria isoenzima. O peso molecular da aspartato aminotransferase varia entre 95 e 110kDa e contém duas subunidades. A aspartato aminotransferase pode estar envolvida no transporte do poder redutor da mitocôndria

e cloroplasto para o citoplasma. O ciclo permite a produção de NADH no citoplasma para importantes reações metabólicas, ex. a redução do hidroxipiruvato no peroxisoma. Frequentemente o oxaloacetato é transportado diretamente mas a conversão para aspartato é extremamente rápida. Um procedimento similar acontece na fotossíntese C4 quando o aspartato é transportado entre as células do mesófilo e as do parênquima seguida da síntese inicial de oxaloacetato (Lea, 1993).

Com base no que foi apresentado nos parágrafos acima, as plantas de tabaco (TR-1 e TR-2) representaram um excelente sistema modelo para desenvolver uma série de estudos básicos sobre a regulação do metabolismo do carbono e nitrogênio. O objetivo desse trabalho é o de identificar como diferentes componentes da fixação do carbono e assimilação do nitrogênio estão sendo alterados em plantas transgênicas cultivadas em baixa luminosidade ($100\mu\text{mol.m}^{-2},\text{s}^{-1}$) e analisadas em diferentes condições de iluminação.

3. MATERIAL 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, Departament 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 inserto ligado ao gene de resistência à canamicina (Bevan, 1984).

O gene construído foi uma fusão de seqüências de DNA codificando a porção madura da proteína CAB do gene *Lhcb 1*2* de ervilha e do peptídeo trânsito da sub-unidade menor da Rubisco (*rbcS*) e foi usada uma seqüência de 30 pares 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 *Lhcb 1*2* Tipo I de ervilha.

Figura 3. Representação esquemática do gene inserido

As sementes de tabaco transgênico e selvagem foram inicialmente germinadas em sementeiras contendo substrato orgânico. Após um mês, as plântulas com cerca de 7-8cm foram transplantadas para vaso com um mistura em proporções iguais de vermiculita e substrato orgânico, onde permaneceram até o final dos experimentos e, diariamente foi acrescentada solução nutritiva de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950). Estas plantas foram cultivadas em câmara de crescimento controlado (Conviron), com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 16h de luz. A intensidade luminosa foi mantida em $100\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.2. Preparo do extrato foliar para determinação de metabólitos

Foram usados discos foliares de 10cm para a determinação de metabólitos do Ciclo de Calvin-Benson. O metabolismo da folha foi interrompido pelo sistema de congelamento rápido acoplado à câmara de análise de trocas gasosas à temperatura de -190°C. Este sistema consiste de um pistão pneumático, localizado 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 N₂ 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 nitrogênio (N₂) líquido, até que seja realizada a extração dos metabólitos.

A extração foi realizada em 10% de (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 N₂ líquido com 800 μl de HClO₄ 10% (v/v). Em seguida o extrato foi transferido para tubo de centrífuga do tipo "Eppendorf" em gelo. O almofariz foi lavado com 200 μl de HClO₄ 1% e acrescido ao extrato. O tubo foi centrifugado a aproximadamente 14000 rpm por dois minutos. Após marcado o volume do tubo e, 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_2CO_3 5M. O sobrenadante foi utilizado para análise de metabólitos e o “pellet” descartado.

3.3.Determinação de feofitina

Em condições de extração ácida, a clorofila é convertida à feofitina, que foi determinada de acordo com o método de Leegood (1993): o “pellet” verde resultante da extração de $HClO_4$, 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 655 nm 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 655 nm

A_{666} : absorbância a 666 nm

V: volume de acetona 80% (ml)

3.4. Determinação do conteúdo de metabólitos do Ciclo de Calvin-Benson

Todos os metabólitos foram medidos de acordo com a 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 absorbância, no comprimento de onda de 340nm, que ocorre quando o NADH ou NADPH passam do estado reduzido para o oxidado ou vice e versa. De acordo com cada metabólito a quantidade de extrato variou de 50 a 100ml, em um volume total de ensaio de 1ml, onde a absorbância foi

lida ao final de cada reação. As enzimas utilizadas foram da Boehringer Mannheim (Alemanha).

3.4.1.Determinação do conteúdo de Ácido 3-fosfoglicérico

O ensaio para determinação do conteúdo de PGA continha 50mM de imidazole-HCl, 1mM de $MgCl_2$, 20mM de NaCl, e 2mM de β -mercaptoetanol, ajustados a pH 7,1. Acrescentou-se a esta reação 50mM de NADH, 1mM de ATP, 11 unidades de PGK (fosfoglicerato quinase) e 11 unidades de GAP-DH (gliceraldeído 3P-desidrogenase).

3-PGA + ATP $\rightarrow$ glicerato 1,3-bisP + ATP (fosfoglicerato kinase)

glicerato 1,3-bisP + NADH $\rightarrow$ gliceraldeído 3-P + NAD^+ + P_i (gliceraldeído 3-P desidrogenase)

3.4.2.Determinação do conteúdo de Triose-fosfato e Frutose 1,6-bifosfato

O ensaio para determinação de TP + FBP continha 50mM de Imidazole-HCL, 1mM de $NaHAsO_4$, 1mM de EDTA (ácido tetra acético etilenodiamino) e 2mM de β -mercaptoetanol, ajustados a pH 7,5, acrescidos de 1mM NAD^+ . 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 $\rightarrow$ DHAP + gliceraldeído-3-P (aldolase)

DHAP $\rightarrow$ gliceraldeído-3-P (triose-P isomerase)

arsenato

Gliceraldeído-3-P + NAD^+ $\rightarrow$ PGA + NADH (gliceraldeído-3-P desidrogenase)

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

Sedoheptulose 1,7 bisP $\rightarrow$ DHAP + eritrose-4-P (aldolase)

3.4.3.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), (pH 8,1) e 0,5mM de NADP^+ . Foram adicionadas 0,06 unidades de glucose 6-fosfato desidrogenase, seguido de 0,35 unidades de fosfoglucoose isomerase e 0,2 unidades de fosfoglucomutase.

Glucose-1-P $\rightarrow$ glucose-6-P (fosfoglucomutase)

Frutose-6-P $\rightarrow$ glucose-6-P (fosfoglucoose isomerase)

Glucose-6-P + NADP^+ $\rightarrow$ 6 P-gluconato + NADPH (glucose-6-P desidrogenase)

3.5. Medida da Atividade da Glutamina Sintetase

A enzima GS é capaz de catalisar a substituição da amônia amina da glutamina. Se a hidroxilamina é substituída por amônia, tem-se a produção de ácido hidroxâmico que pode ser medido colorimetricamente pela reação com ferro clorídrico. O mesmo produto final pode ser obtido usando glutamato e hidroxilamina na reação normal de síntese. Ao contrário da rota sintética, a reação transferase requer manganês no lugar de magnésio, precisa somente de uma porção catalítica de ADP e necessita da presença de arsenato ou fosfato.

A extração foi feita com tampão contendo 50mM Imidazole (pH 7,5) e 10mM MgCl_2 14.3mM de β -mercaptoetanol, mantida em gelo. O tecido vegetal foi macerado com pistilo e almofariz em nitrogênio líquido. Após a maceração foi adicionado 80 μ l do tampão para cada 0,20g de tecido fresco. Após o descongelamento da amostra foi efetuada a centrifugação a 15.000 rpm por 10min a 4°C. Durante todo o tempo o

tecido foi mantido em gelo. O sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade da GS.

O tampão de ensaio contendo 30mM de Glutamina, 40mM de Imidazole, 3mM MnCl_2 , 0.4 mM NaADP, 10 mM Na_2HAsO_4 , 80mM de Hidroxilamina. O ensaio foi efetuado com 500 μl do tampão de extração adicionado de 100 μl da amostra/branco e incubados em banho maria a 37°C por 15min. Após este tempo foi adicionado 2 ml da solução de parada composta de cloreto férrico acidificado. A densidade óptica foi lida a 540nm e foi utilizado como padrão ácido L-glutâmico γ -monohidratado.

3.6. Determinação do estado de ativação da Nitrato Redutase.

A metodologia utilizada para a quantificação do estado de ativação da nitrato redutase baseou-se no mecanismo de ativação da enzima. A presença do Mg^{+2} no ensaio enzimático permite a avaliação das enzimas ativas, no momento da extração. Por outro lado, quando a reação é conduzida na presença de EDTA, tem-se a atividade máxima. A relação entre a atividade máxima/atividade *in vivo* fornece a porcentagem de ativação da enzima em determinada condição metabólica. Discos foliares de 10 cm^2 , coletados duas horas após o início do fotoperíodo, foram macerados em N_2 líquido com 800 μl de tampão de extração composto de 0,1M de Hepes (pH 7,5), 2mM de ditioneitol (DTT), 1mM de fenil-metil-sulfonil florido (PMSF) e 10mM de MgCl_2 , somente para ensaio com Mg^{+2} . Após centrifugação por cinco minutos em microcentrífuga à 4°C, foram separadas amostras para determinação do conteúdo de proteína total e clorofila e a atividade foi medida usando nitrato de potássio como substrato, em meio com Mg^{+2} .

O tampão de ensaio com Mg^{+2} era composto de HEPES 100mM pH 7,5, KNO_3 5mM, NADH 0,5mM, MgCl_2 10mM a reação foi efetuada em um volume final de 500 μl , sendo 100 μl da amostra, em banho maria à temperatura de 30°C por 5 ou 15 min. A reação foi interrompida com adição de 100 μl de acetato de zinco 1M. O extrato foi revelado com adição de 500 μl de 1% sulfanilamida em HCl 3N e 1ml de 0,02% N-(1-naftil) etilenodiamino dihidroclorido. Após 15 minutos, a proteína

precipitada foi removida por centrifugação em microcentrífuga. A leitura foi convertida para a quantidade de nitrito através de uma curva padrão pré-estabelecida (0-10 nmol de nitrito).

Para o ensaio da atividade máxima, o tampão continha HEPES 100mM pH 7,5, KNO_3^- 5mM, NADH 0,5mM, EDTA 10mM. a reação foi efetuada em um volume final de 500 μl , sendo 100 μl da amostra, em banho maria a temperatura de 30°C por 5 ou 15 min. A reação foi interrompida com a adição de 100 μl de acetato de zinco 1M. O extrato foi revelado com adição de 500 μl de 1% sulfanilamida em HCl 3N e 1ml de 0,02% N-(1-naftil) etilenodiamino dihidroclorido. Após 15 minutos, a proteína precipitada foi removida por centrifugação em microcentrífuga. A leitura foi convertida para a quantidade de nitrito utilizando a mesma curva padrão anterior.

3.7. Quantificação Do Nitrato Em Folhas/Raízes

A quantificação do Nitrato nas folhas foi efetuada segundo a metodologia de Cataldo (1975), que consiste na nitrificação do ácido acetil salicílico. O tecido fresco foi macerado com nitrogênio líquido e depois foi adicionado 6ml de tampão fosfato para cada 1g de tecido. O homogenado foi filtrado e centrifugado a 30.000g por 15min. Alíquotas de 200 μl do extrato foram incubadas com 800 μl de ácido salicílico 5% em H_2SO_4 concentrado. Após 20min em temperatura ambiente foi adicionado 19ml de 2N NaOH até o pH chegar a 12N. As amostras esfriaram à temperatura ambiente e a densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro a 410nm. Uma curva padrão contendo 1-60 $\mu\text{g}/20\text{ml}$ (0,08 μM -4,8 μM) foi utilizada para comparar as leituras das amostras. O branco para cada amostra foi feito com 200 μl de extrato, 800 μl de H_2SO_4 concentrado sem ácido salicílico e 19 ml de NaOH 2N.

3.8 Determinação de amino ácidos em tecido foliar.

O protocolo de extração de amino ácidos utilizado foi adaptado a partir de Bielecki & Turner (1966). Um disco foliar de 10cm² foi macerado em N₂ líquido e foi feita uma extração com MCA (Metanol/Clorofórmio/Água) na proporção de 20ml para cada grama de material. Após a incubação do extrato por 2h à temperatura ambiente foi efetuada uma centrifugação a 2500 rpm por 20min. Os amino ácidos permanecem solúveis no sobrenadante e para cada 4ml de sobrenadante foi adicionado 1ml de clorofórmio e 1,5ml de H₂O. Foi efetuada uma nova centrifugação e a marcação do volume final. O sobrenadante foi colocado a 38°C por 2h, centrifugado a 14.000 rpm por 10min, e filtrado em filtro millipore de 0,22 µm.

A quantificação dos amino ácidos nas amostras foi efetuada como descrito no método de Bielecki & Turner (1966). Os amino ácidos foram separados por cromatografia líquida de alta precisão (HPLC) fase reversa em coluna C18 Suprapac ODS-2 4 x 250mm, fluxo de 0,8 ml.min⁻¹ (Supelco), temperatura ambiente, utilizando como solventes um tampão fosfato (Tampão A) de pH 7,25 (50mM NaOAc, 50mM Na₂HPO₄, 20ml tetrahidrofurano, 20ml metanol, pH corrigido com HAc glacial (aproximadamente 1,5ml), desgaseificado com ultra-som e filtrado com filtro para solventes orgânicos da millipore HVPL 047 de 0,45µm). O tampão orgânico utilizado para constituir o gradiente (Tampão B) era de Metanol grau HPLC 65% feito com água milli-Q e desgaseificado e filtrado a vácuo com o filtro HVPL 047 da millipore. Após derivação dos AA com o-fitaldeído (OPA), os derivados OPA foram detectados por fluorescência com auxílio do detector de fluorescência da Shimatsu, regulado para excitação (λ_{ex} = 250nm) e emissão (λ_{em} = 480nm).

O reagente OPA foi preparado diariamente a partir de uma solução estoque conforme descrito abaixo:

Borato, pH 9,5

2,4g de ácido bórico em 90 ml de H₂O

ajustar o pH para 9,5 com NaOH 2N

completar para 100ml

OPA-borato, pH 9,5

50mg em 1ml MeOH

+ 6,5 ml borato, pH 9,5

Reagente OPA

2,5ml da solução OPA-borato, pH 9,5

+ 20μl 2-mercaptoetanol (adicionado no dia)

A amostra foi preparada com 20μl da amostra/padrão adicionados a 60μl do reagente OPA ou seguindo a mesma proporção

3.9. Cálculo da Clorofila

O conteúdo de clorofila foi usado para padronizar as atividades enzimáticas. Na quantificação da clorofila foram utilizados os mesmos extratos obtidos para verificação das atividades enzimáticas. O método de extração da clorofila baseou-se na utilização de 50μl do extrato antes da centrifugação, dissolvido em 950μl de acetona 80%, mantido no escuro e centrifugado antes da leitura no espectrofotômetro, em cubeta de quartzo. A absorbância da clorofila geralmente é medida a 652nm e a concentração de clorofila (mg l^{-1}) é dada pela expressão: $(A_{652}) \times 1000/34,5$. Para uma determinação acurada da clorofila *a* e *b*, os coeficientes utilizados foram usados, baseados nas leituras de absorbância feitas em acetona 80% a 663.6 e 646.6.(Porra et al., 1989).

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{M}) = 13.19 A_{663.6} - 2.57 A_{646.6}$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{M}) = 22.10 A_{646.6} - 5.26 A_{663.6}$$

$$\text{Clorofila Total } (\mu\text{M}) = 7.93 A_{663.6} + 19.53 A_{646.6}$$

3.10. Análise Estatística.

A Análise de Variância de Friedman é um teste não-paramétrico para dados mensurados de forma ordinal, abrangendo três ou mais amostras e equivalendo à ANOVA com dois critérios. Este procedimento recebe também a designação de Dupla Análise de Variância por Postos.

Todos os dados obtidos foram analisados pelo teste de friedman, que permite a análise de amostras relacionadas com uma variável ou k variáveis, cujos dados sejam categóricos ou ordenativos. Foi utilizado o auxílio do programa BioEstat 1.0 (Ayres et al., 1998), que utiliza a formula abaixo:

$$X^2_r = Fr = \left| \frac{12}{Nk(k+1)} \sum_{j=1}^k R_j^2 - 3N(k+1) \right|$$

N= número de linhas;

k = número de colunas;

Rj = soma dos postos da coluna j;

Quanto maior o *Fr* (valor) maior a significância, e se o valor de “p” que é a probabilidade obtida nos testes de hipótese (inferência estatística) for igual ou menor que o nível alfa previamente estabelecido ($\alpha = 0,05$), rejeita-se a hipótese de nulidade H_0 (Os tratamentos são iguais), e admite-se que os tratamentos são diferentes aceitando a H_1 (Os tratamentos são diferentes).

4. RESULTADOS

Com o intuito de entender como a assimilação do nitrogênio foi alterada, nas plantas transgênicas, foram delineados experimentos que demonstraram diferenças em enzimas chave do metabolismo do nitrogênio (nitrato redutase e glutamina sintetase). Visando elucidar as alterações ocorridas na atividade enzimática, bem como na ativação das enzimas, foram realizados experimentos para quantificar o conteúdo de Nitrato, substrato direto da NR e do processo de formação de amino ácidos. Alguns metabólitos, conhecidos como principais reguladores, tanto do processo fotossintético, como da assimilação do nitrogênio, também foram quantificados nas folhas.

4.1. Determinação da atividade da Nitrato Redutase

Os dados da atividade da enzima Nitrato Redutase estão apresentados em $U \cdot mg^{-1} chl$ ($nmol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1} chl$), na presença de Mg^{2+} ou de EDTA. A utilização de Mg^{2+} e EDTA serviu para estudar o estado de ativação da enzima nas plantas transgênicas e selvagens, cultivadas em baixa luminosidade ($100 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$). O estado de ativação é determinado pela relação entre a atividade na presença de Mg^{+2} e a atividade máxima, na presença de EDTA. Foram feitos dois tipos de experimentos para ensaio da atividade e ativação da NR. Os primeiros resultados

foram obtidos no protocolo que utilizava 0,40g de tecido foliar para 1.800µl de tampão de extração, e tempo de reação 15 minutos.(Tabela 1)

Tabela 1: Atividade da enzima Nitrato Redutase, *in vivo* (+ Mg^{+2}) máxima (+EDTA) em $U\ mg^{-1}\ chl$. Os dados são médias de 10 plantas de cada genótipo, $\pm$ o erro padrão.

	TR-1	TR-2	S	Fr	p
Mg^{+2}	3.3 ± 0.25	3.1 ± 0.2	3.25 ± 0.26	0.3182	0.8529
EDTA	4.34 ± 0.37	4.4 ± 0.34	5.03 ± 0.33	5.0909	0.0784
Ativação	$77,2 \pm 2.3$	74.3 ± 3.6	64.6 ± 3.2	7.4091	0.0246

Fr: representa o coeficiente de *friedman*

p : probabilidade obtida nos testes de hipótese (inferência estatística)

A comparação das médias da porcentagem de ativação da enzima Nitrato Redutase entre as plantas, demonstrou que tanto TR-1 quanto TR-2 apresentaram maiores porcentagens de ativação do que as plantas selvagens, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2 : Teste de comparação das médias da porcentagem de ativação da enzima NR em plantas cultivadas em baixa luminosidade.

Comparação	Diferença	(p)
C1 e S	12.5	<0.05
C1 e C2	4	>0.05
C2 e S	8.5	>0.05

p = probabilidade obtida nos testes de hipótese (inferência estatística)

Com o intuito de, confirmar os resultados da atividade e ativação da enzima Nitrato Redutase foram feitas algumas alterações no protocolo inicial. Um novo

experimento foi conduzido utilizando 0,20g de tecido foliar para 1.200µl de tampão de extração e tempo de reação 5 minutos, os resultados estão na Tabela 3.

Tabela 3: Atividade da enzima Nitrato Redutase *in vivo* (+Mg⁺²) e máxima (+EDTA) em U mg⁻¹ chl. Os dados são médias de 12 plantas de cada genótipo, e acompanham o erro padrão.

	TR-1	TR-2	S	Fr	P
Mg ⁺²	1.74 ± 0.16	1.9 ± 0.14	1.17 ± 0.11	3.73	0.1548
EDTA	2.92 ± 0.26	2.86 ± 0.32	2.8 ± 0.24	0.1154	0.9439
Ativação	59.4±1.9	54.9±3.5	42.2±2.3	14.1154	0.0009

Fr = representa o coeficiente de *friedman*

p = probabilidade obtida nos testes de hipótese (inferência estatística).

A análise dos resultados obtidos demonstrou que nas plantas transgênicas a ativação da NR manteve-se significativamente maior quando comparadas às selvagens, como mostram a Tabela 4.

Tabela 4: Teste de comparação das médias da porcentagem de ativação da enzima NR em plantas cultivadas em baixa luminosidade.

Comparação	Diferença	(p)
C1 e S	17.5	<0.05
C1 e C2	2	>0.05
C2 e S	15.2	<0.05

p= probabilidade obtida nos testes de hipótese (inferência estatística)

4.2. Determinação da atividade da Glutamina Sintetase

Os dados obtidos na análise da atividade da enzima Glutamina Sintetase demonstraram que existe diferença entre as plantas transgênicas e selvagens

cultivadas em baixa intensidade luminosa ($100\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). O protocolo inicial utilizava 80 μl do tampão de extração para 0,20g tecido foliar. Os resultados foram expressos em $\text{U mg}^{-1} \text{ chl } (\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}.\text{chl})$, como mostra a Tabela 5.

Tabela 5. Atividade da enzima Glutamina Sintetase, protocolo inicial. Os dados são médias de 9 plantas de cada genótipo, e acompanham o erro padrão.

TR-1	TR-2	S	Fr	p
$86,77 \pm 11,45$	$80,56 \pm 8,79$	$47,73 \pm 9,94$	6	0,0498

Fr = coeficiente de friedman

p = probabilidade obtida nos testes de hipótese (inferência estatística)

As médias obtidas nas plantas transgênicas foram significativamente superiores às plantas selvagens e as comparações estão demonstradas na Tabela 6.

Tabela 6. Comparações feitas a partir do teste de friedman das médias da atividade da GS em de plantas transgênicas e selvagens cultivadas em baixa intensidade luminosa ($100\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Comparações	Diferença	(p)
C1 e C2	0	> 0.05
C1 e S	9	< 0.05
C2 e S	9	< 0.05

p = probabilidade obtida nos testes de hipótese (inferência estatística).

Com o intuito de, confirmar os resultados da atividade da enzima Glutamina Sintetase, além de otimizar a metodologia de análise enzimática, algumas alterações foram feitas no protocolo inicial. O novo protocolo utilizava 0,40g de tecido foliar para 1.800 μl de tampão de extração, os resultados estão na Tabela 7.

Tabela 7. A tabela apresenta os dados de atividade da enzima Glutamina Sintetase, metodologia utilizando 1.800µl do tampão de extração para 0,40g tecido foliar. Os dados são médias de 6 plantas para cada genótipo

TR-1	TR-2	S	Fr	p
263,52 ± 16,86	257,64 ± 25,83	201,92 ± 29,36	6,33	0,0421

Fr = coeficiente de friedman

p = probabilidade obtida nos testes de hipótese (inferência estatística).

Os resultados obtidos com o novo protocolo mantiveram as diferenças entre as médias das transgênicas, que foram significativamente superiores, às plantas selvagens. O aumento da atividade enzimática observado nesse experimento pode ser explicado pelo uso de uma maior quantidade de tampão que possibilitou uma extração enzimática mais eficiente. As comparações de médias estão demonstradas na Tabela 8.

Tabela 8. Comparações das médias da atividade da GS em de plantas transgênicas e selvagens cultivadas em baixa intensidade luminosa ($100\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), feitas a partir do teste de friedman, metodologia utilizando 1.800µl do tampão de extração para 0,40g tecido foliar. Os dados são médias de 6 plantas para cada genótipo.

Comparações	Diferença	(p)
C1 e C2	1	> 0.05
C1 e S	8	< 0.05
C2 e S	7	< 0.05

p = probabilidade obtida nos testes de hipótese (inferência estatística).

4.3. Determinação da Reação 3PGA/TP e hexoses em folhas.

Estudos das mudanças nos metabólitos em relação às variáveis ambientais como a luz podem servir de informação sobre como o metabolismo fotossintético na folha esta sendo limitado e regulado.

Foram observadas diferenças entre as plantas transgênicas e selvagens, em alguns metabólitos chave do Ciclo de Calvin, como PGA, TP e G6P nas plantas cultivadas e analisadas em baixa luz (Tabela 9), as comparações dos metabólitos que apresentaram diferença encontram-se na tabela 11. As plantas cultivadas em baixa luz e analisadas em alta luz apresentaram diferenças nos metabólitos PGA e G6P (Tabela 10), as comparações estão na tabela 12.

Tabela 9. Conteúdo de metabólitos em plantas cultivadas em $100\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, e analisadas em baixa luz ($250\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Os dados são médias de 8 plantas de cada genótipo acompanhados do erro padrão. Os metabólitos acompanhados de * apresentam diferença significativa pelo teste de friedman.

$250\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$									
Conteúdo de metabólitos ($\text{nmol.mg}^{-1}.\text{chl}$)/ Relação de metabólitos (mol/mol)									
Genótipo	PGA*	TP*	PGA/ TP	FBP	G6P*	F6P	G6P/ F6P	G1P	Hexoses P
S	256 ± 7	35 ± 6	7,4	7 ± 2	42 ± 10	14 ± 5	3	11 ± 5	67 ± 20
TR-1	256 ± 17	29 ± 9	8,7	5 ± 1	24 ± 8	16 ± 4	1,5	10 ± 3	49 ± 16
TR-2	204 ± 22	25 ± 9	8,3	6 ± 1	29 ± 6	15 ± 5	1,9	11 ± 1	55 ± 13

Tabela 10. Conteúdo de metabólitos em plantas cultivadas em $100\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, e analisadas em alta luz ($1000\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Os dados são médias de 8 plantas de cada genótipo acompanhados do erro padrão. Os metabólitos acompanhados de * apresentam diferença significativa pelo teste de friedman.

$1000\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$									
Conteúdo de metabólitos ($\text{nmol.mg}^{-1}.\text{chl}$)/ Relação de metabólitos (mol/mol)									
Genótipo	PGA*	TP	PGA/ TP	FBP	G6P*	F6P	G6P/ F6P	G1P	Hexoses
S	625 ± 91	39 ± 11	15,9	10 ± 3	20 ± 3	15 ± 4	1,3	15 ± 6	50 ± 14
TR-1	247 ± 54	40 ± 13	6,2	11 ± 3	39 ± 7	24 ± 5	1,6	16 ± 3	78 ± 15
TR-2	326 ± 48	35 ± 8	9,5	9 ± 2	33 ± 8	17 ± 5	1,9	17 ± 5	67 ± 18

As comparações entre os genótipos nas plantas cultivadas em baixa luminosidade e analisadas e baixa luminosidade demonstraram que as diferenças mais significativas foram entre TR-2 e S para triose fostato, entre TR-1 e S para G6P (Tabela 11).

Tabela 11. Comparações entre genótipos cultivados em $100\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e analisados em $250\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ que apresentaram diferença significativa pelo teste de friedman

PGA	Fr = 6	P = 0.0498
Comparações	≠	(p)
C1 e C2	9	<0.05
C1 e S	3	>0.05
C2 e S	6	>0.05

Triose	Fr = 6	P = 0.0498
Comparações	≠	(p)
C1 e C2	3	>0.05
C1 e S	6	>0.05
C2 e S	9	<0.05

G6P	Fr = 10	P = 0.0067
Comparações	≠	(p)
C1 e C2	5	>0.05
C1 e S	10	<0.05
C2 e S	5	>0.05

Fr = coeficiente de friedman

p = probabilidade obtida nos testes de hipótese (inferência estatística).

As comparações entre as plantas cultivadas em baixa luz e analisadas em alta luz, apresentaram diferenças mais significativas entre TR-1 e S para PGA, e TR-1 e S e entre TR-2 e S para G6P (Tabela 12)

Tabela 12. Comparação entre o conteúdo de metabólitos dos genótipos cultivados em $100\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e analisados em $1000\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ que apresentaram diferença significativa pelo teste de friedman

PGA	Fr = 12.28	p = 0.0021
Comparações	≠	(p)
C1 e C2	5	>0.05
C1 e S	13	<0.05
C2 e S	8	>0.05

G6P	Fr = 9.25	p = 0.0098
Comparações	≠	(p)
C1 e C2	1	>0.05
C1 e S	11	<0.05
C2 e S	10	<0.05

Fr = coeficiente de friedman

p = probabilidade obtida nos testes de hipótese (inferência estatística).

4.4. Determinação do Conteúdo de Nitrato em folhas e raízes

Com o objetivo de verificar se a disponibilidade de nitrato para a enzima nitrato redutase estava diferente entre as plantas transgênicas e selvagens, foram efetuados experimentos de quantificação do nitrato nas folhas e raízes.

A análise do conteúdo de nitrato nas folhas e raízes não demonstrou diferenças significativas entre as plantas transgênicas e selvagens cultivadas em baixa luminosidade (Tabela 13 e 14), onde “Fr” representa o coeficiente de friedman e “p” a probabilidade obtida nos testes de hipótese (inferência estatística).

Tabela 13. Resultados do conteúdo de NO_3^- nas folhas, em mg/g peso fresco de plantas com 60 dias, foram utilizados 1 grama de tecido vegetal. Os resultados não apresentam diferenças significativas pelo teste de friedman. As médias são provenientes de 6 plantas.

	TR-1	TR-2	S
Médias	5486	5367	5946
Desvio	751	737	964

Fr = 3

p = 0.2231

Tabela 14. Resultados do conteúdo de NO_3^- nas raízes, em mg/g peso fresco de plantas com 60 dias, foram utilizados 1 grama de tecido vegetal. Os resultados não apresentam diferenças significativas pelo teste de friedman. As médias são provenientes de 6 plantas.

	TR-1	TR-2	S
Médias	4751	4339	4354
Desvio	499	417	584

Fr = 1.1429

p = 0.5647

4.5. Determinação dos Amino ácidos solúveis em folhas

As análises dos dados obtidos na quantificação de amino ácidos foram efetuadas de duas formas. Análise dos valores obtidos na leitura de cada amostra que são expressos em nmol/mg de massa fresca. Com o objetivo de um maior controle sobre a possível variação na extração de uma amostra para a outra foram feitas análises a partir da porcentagem de cada amino ácido na respectiva amostra.

Na análise dos valores médios de amino ácidos foi verificada diferença significativa para a treonina, que foi maior nas plantas selvagens do que nas transgênicas, como demonstram a Figura 4, Tabela 15 e Tabela 16. O teste de comparação do conteúdo de Thr esta representado na Tabela 17.

Tabela 15. Valores médios da quantificação de amino ácidos (nmol/mg de massa fresca) em plantas cultivadas em baixa luminosidade, extração efetuada com um disco foliar de 10cm² e 4 ml de tampão, o volume final foi liofilizado e ressuspendido em 500µl de água milli-Q. As médias foram obtidas a partir de 4 plantas para cada genótipo, e os resultados estão acompanhados do erro padrão.

	TR-1	TR-2	S
Asp	3.87±0.64	4.22±0.29	4.79±0.48
Glu	6.94±1.43	6.29±0.58	5.47±0.70
Asn	0.09	0.05	0.12
Ser	1.27±0.25	1.26±0.25	1.91±0.25
Gln	3.61±0.48	3.56±0.48	3.05±0.28
Gly	0.14	0.14	0.05
Thr	0.24	0.25	3.06
Ala	0.51	0.58	0.65
Total	16.65±2.69	16.33±1.44	19.09±2.05

Tabela 16. Análise estatística dos resultados de amino ácidos em plantas cultivadas em baixa luminosidade, extração efetuada com um disco foliar de 10cm² e 4 ml de tampão, nas duas primeiras horas do período luminoso, o volume final foi liofilizado e ressuspendido em 500µl de água milli-Q. As médias foram obtidas a partir de 4 plantas para cada genótipo.

	Fr	(p)
Asp	1.5	0.4724
Glu	0.88	0.6456
Asn	0	1
Ser	1.5	0.4724
Gln	1.625	0.4437
Gly	0	1
Thr	6	0.0498
Ala	0	1
Total	2.3750	0.3050

Fr = coeficiente de friedman

p = probabilidade obtida nos testes de hipótese (inferência estatística).

Tabela 17. Teste de comparação entre as plantas analisadas para o amino ácido Thr. Em plantas cultivadas em baixa luminosidade, extração efetuada com um disco foliar de 10cm² e 4 ml de tampão, o volume final foi liofilizado e ressuspendido em 500µl de água milli-Q.

	Thr	
Comparações	Diferença	(p)
TR-1 e TR-2	0	>0.05
TR-1 e S	6	<0.05
TR-2 e S	6	<0.05

p = probabilidade obtida nos testes de hipótese (inferência estatística).

Figura 4. Quantificação de amino ácidos em plantas cultivadas em baixa luminosidade, extração efetuada com um disco foliar de 10cm² e 4 ml de tampão, o volume final foi liofilizado e ressuspensionado em 500µl de água milli-Q

A análise das porcentagens de amino ácidos presentes em cada amostra apresentou diferenças significativas para os amino ácidos Glutamato, Glutamina e Treonina, como mostra a Figura 5 e as Tabelas 18 e 19. Os testes de comparação estão demonstrados na Tabela 20.

Figura 5. Porcentagem de amino ácidos em plantas cultivadas em baixa luminosidade, extração efetuada com um disco foliar de 10cm² e 4 ml de tampão, o volume final foi liofilizado e ressuspendido em 500µl de água milli-Q

Tabela 18. Valores médios da porcentagem de cada amino ácido em plantas cultivadas em baixa luminosidade. As médias foram obtidas a partir de 4 plantas para cada genótipo, e os resultados estão acompanhados do erro padrão.

AA	TR-1	TR-2	S
Asp	23.49±1.15	25.93±0.29	25.37±1.47
Glu	40.83±2.22	38.64±0.48	28.80±2.32
Asn	0.53±0.12	0.31±0.11	0.61±0.122
Ser	7.91±1.47	7.63±0.75	9.81±0.64
Gln	21.84±2	21.82±1.03	16.31±0.64
Gly	1.06	0.75	0.30
Thr	1.30	1.50	15.35±3.11
Ala	3.05±0.64	3.43±0.48	3.45±0.41

Tabela 19. Análise estatística dos resultados de porcentagem de amino ácidos em plantas cultivadas em baixa luminosidade. As médias foram obtidas a partir de 4 plantas para cada genótipo.

AA	Fr	(p)
Asp	2.3750	0.3050
Glu	6.5	0.0388
Asn	2	0.3679
Ser	3.5	0.1738
Gln	6	0.0498
Gly	2.6250	0.2691
Thr	6	0.0498
Ala	2	0.3678

Fr - coeficiente de friedman

p = probabilidade obtida nos testes de hipótese (inferência estatística).

Tabela 20. Teste de comparação entre as plantas analisadas para os amino ácidos Glu, Gln e Thr. Em plantas cultivadas em baixa luminosidade.

Glu		
Comparações	Diferença	(p)
C1 e C2	2	>0.05
C1 e S	7	<0.05
C2 e S	5	<0.05
Gln		
Comparações	Diferença	(p)
C1 e C2	0	>0.05
C1 e S	6	<0.05
C2 e S	6	<0.05
Thr		
Comparações	Diferença	(p)
C1 e C2	0	>0.05
C1 e S	6	<0.05
C2 e S	6	<0.05

p = probabilidade obtida nos testes de hipótese (inferência estatística).

Com o objetivo de testar a metodologia anterior e confirmar a diferença nos amino ácidos mencionados anteriormente foram planejados dois experimentos, nos quais um total de sete plantas foram analisadas em conjunto. As extrações foram feitas em duas condições.

Na primeira foram utilizadas plantas cultivadas em baixa luminosidade, e a extração foi feita a partir de 7 discos foliares de 10cm² liofilizados e macerados em 4ml de tampão de extração. O volume final foi liofilizado e ressuspendido em 500µl de água milli-Q. Foram observadas diferenças nos amino ácidos Glu, Thr e Tyr. O conteúdo de glutamato na amostra das plantas TR-1 e TR-2 foi duas vezes superior ao obtido na amostra das plantas selvagens. O conteúdo de treonina foi oito vezes superior na amostra das plantas selvagens quando comparada com as amostras das plantas transgênicas (Tabela 21).

No segundo experimento foram utilizadas plantas cultivadas em alta luminosidade, e a extração foi feita a partir de 70 discos de 1 cm² de material vegetal liofilizados e macerados em 4ml de tampão de extração. O volume final foi liofilizado e ressuspendido em 500µl de água milli-Q. Foram observadas diferenças nos amino ácidos Glu e Thr. O conteúdo de glutamato foi cinco vezes maior nas amostras das plantas transgênicas. O conteúdo de treonina foi cinco vezes maior nas selvagens, quando comparado com as transgênicas (Tabela 22).

Estes resultados vem confirmar os resultados anteriores para estes dois amino ácidos, obtidos nos ensaios com plantas individuais, além disso, estes experimentos revelaram outros amino ácidos que não podiam ser evidenciados na metodologia na qual eram utilizados somente um disco para a extração dos amino ácidos. Como representam melhor o conteúdo de amino ácidos dos genótipos analisados, esta metodologia pode ser uma excelente opção para experimentos futuros.

Tabela 21. Quantificação de amino ácidos em plantas cultivadas em baixa luminosidade. Estes resultados foram obtidos em um *pool* de 7 plantas para cada genótipo. Onde foram utilizados 7 discos de 10cm² de material vegetal liofilizados para 4ml de tampão de extração. O volume final foi liofilizado e ressuspensionado em 500µl de água milli-Q. Os resultados estão expressos em nmol/mg de MS.

AA	C1	C2	S
Asp	2.21	1.66	2.39
Glu	12.91	11.50	6.88
Asn	0.42	0.38	0.71
Ser	4.18	3.56	5.49
Gln	4.25	3.87	5.68
Gly	1.11	0.88	0.00
Thr	0.84	0.82	6.62
Ala	5.82	5.19	8.34
Tyr	1.16	1.07	3.28
Met	0.19	0.16	0.19
Val	0.25	0.19	0.51
Phe	1.17	0.81	0.80
Ile	0.01	0.01	0.12
Leu	0.14	0.09	0.21
Lys	0.00	0.00	0.00
Totais	34.68	30.18	41.22

Tabela 22. Quantificação de amino ácidos em plantas cultivadas em alta luminosidade. Estes resultados foram obtidos em um *pool* de 7 plantas para cada genótipo. Onde foram utilizados 70 discos de 1cm² de material vegetal liofilizados para 4ml de tampão de extração. O volume final foi liofilizado e ressuspensionado em 500µl de água milli-Q. Os resultados estão expressos em nmol/mg MS.

AA	C1	C2	S
Asp	0.04	0.04	0.28
Glu	2.96	1.67	0.39
Asn	0.37	0.27	0.84
Ser	1.42	1.00	2.69
Gln	0.78	0.56	0.75
Gly	0.17	0.11	0.30
Thr	1.25	0.97	5.18
Tyr	0.23	0.15	0.34
Met	0.30	0.22	0.63
Val	0.35	0.25	0.70
Phe	0.43	0.29	0.58
Ile	0.12	0.10	0.42
Leu	0.53	0.39	1.15
Lys	0.09	0.03	0.10
Totais	9.05	6.04	14.35

5. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados no capítulo anterior revelam nitidamente que a fisiologia das plantas com aumento da expressão do gene *Lhcb1*2* (CAB) apresentam aumento no estado de ativação da enzima Nitrato Redutase, aumento da atividade da enzima Glutamina Sintetase, aumento significativo na porcentagem dos amino ácidos Glutamina e Glutamato e diminuição significativa da porcentagem de Treonina, presentes nas folhas, quando comparadas às plantas selvagens.

5.1. Aumento da ativação da Nitrato Redutase

Morcuende et al. (1998), efetuaram experimentos com folhas de tabaco destacadas expostas à baixa luminosidade, em diferentes tratamentos com fornecimento de açúcares e compostos nitrogenados, os autores verificaram que as folhas submetidas ao tratamento com água (Controle) tiveram uma grande redução no nível do transcrito *Nia*, e um declínio de 50% da atividade da nitrato redutase e no conteúdo de nitrato, aumento no conteúdo de amido, enquanto os açúcares permaneceram baixos, os amino ácidos aumentaram somente um pouco durante 8 horas de incubação. Grande parte do nitrogênio acumulou no amino ácido glutamina. Em uma outra situação, quando expostas a 20mM de nitrato,

estes órgãos apresentaram uma taxa estimada de assimilação do nitrato duas vezes maior, além de um aumento na atividade da nitrato redutase, porém no estado de ativação. O fornecimento de nitrato não levou a um decréscimo da glutamina. Ocorreu uma diminuição nos açúcares, amido, e hexose fosfatos, mas 3PGA e PEP não decresceram significativamente.

Embora as condições experimentais do nosso trabalho sejam distintas, uma vez que utilizamos discos foliares retirados de plantas cultivadas íntegras, em potes, deveríamos esperar um aumento na atividade da nitrato redutase, já que estamos fornecendo solução nutritiva com 10mM de nitrato e as plantas CAB possuem uma maior disponibilidade de NADP e ATP (Real, 1997). Entretanto, nossos experimentos demonstraram que a atividade da nitrato redutase não apresentou diferença significativa entre as plantas CAB e selvagens, apesar disso tivemos um aumento significativo na porcentagem de ativação da enzima.

Man et al. (1999) demonstraram que o estado de ativação da nitrato redutase não está sempre correlacionado com a atividade total da nitrato redutase, sendo assim uma maior ou menor quantidade da enzima não está correlacionada com uma maior ou menor porcentagem de enzimas ativas, em folhas. Eles utilizaram plantas de cevada com fornecimento alto e baixo de nitrato e submeteram as plantas a dias curtos e longos, para manipular as concentrações de nitrato estocados nas folhas. Em plantas com alto nitrato/dias longos a atividade máxima da NR (NRA_{max}) e a proteína NR foram constantes durante a fase luminosa. Nas plantas com baixo nitrato/dias longos foi encontrado aproximadamente 30% da NRA_{max} e proteína NR, do que nas plantas com alto nitrato. Em baixo nitrato/dias longos, NRA_{max} e proteína NR decresceram fortemente durante a segunda parte do período luminoso. O decréscimo foi precedido de um grande decréscimo do conteúdo de nitrato das folhas. Os dias curtos levam geralmente a uma maior concentração de nitrato nas folhas. Sob condições de dias curtos/baixo nitrato, a NRA_{max} foi levemente maior do que em condições de dias longos e permaneceu constante ao longo do dia. Isto correlacionou com a manutenção de altas concentrações de nitrato durante o período de luz curta. O estado de ativação na luz foi muito semelhante em plantas com alto nitrato e baixo nitrato, mas a

inativação pelo escuro foi duas vezes maior nas plantas com alto nitrato. Sendo assim os pesquisadores chegaram à conclusão de que NRA_{max} em plantas de baixo nitrato/dias longos foi levemente compensada pelo maior estado de ativação da NR.

Em nossos experimentos tanto as plantas transgênicas quanto as plantas selvagens foram submetidas as mesmas concentrações de nitrato e expostas as mesmas condições ambientais, os experimentos de quantificação do conteúdo de nitrato, nas folhas e raízes, demonstram que ambas possuem conteúdos deste composto nitrogenado tão próximos que não apresentaram diferenças significativas.

O aumento do estado de ativação da NR nas folhas das plantas CAB pode estar relacionado com a diminuição da disponibilidade da proteína NR, que pode ser explicado com base nos dados de atividade total expostos na Tabela 1, embora esta não tenha sido significativa, as diferenças ficaram bem próximas da significância. A atividade total representa a quantidade total de enzimas disponíveis para as reações metabólicas, com base nos dados da Tabela 1 podemos supor que o conteúdo da enzima NR está ligeiramente menor nas plantas transgênicas. O aumento da ativação da enzima poderia estar funcionando como mecanismo compensatório em função da diminuição da disponibilidade da proteína nas plantas transgênicas, uma vez que as plantas CAB apresentam uma diferença na disposição celular quando comparadas com as selvagens (Luciana, 2000).

Uma outra forma de explicar a disponibilidade da enzima NR seria a maior porcentagem do amino ácido glutamina observada, nas plantas transgênicas, pois vários pesquisadores tem colocado a glutamina como inibidora da expressão do gene *NIA*. Entretanto o trabalho de Dzuibany et al (1998) levantam dúvidas do controle negativo da glutamina sobre o *pool* de transcritos do *nia2*. Foram analisadas folhas de um mutante de *Arabidopsis thaliana* deficiente na glutamato sintase, que acumulava glutamina em suas folhas, quando iluminado em condições que favoreciam a fotorrespiração. O acúmulo de glutamina nas folhas deste mutante e o concomitante declínio do glutamato não foi correlacionado com uma

redução do nível de transcrito foliar do *nia2*. Estes resultados indicam que a glutamina pode não exercer um controle negativo no *pool* de transcritos da *nia2* nas folhas. Com base neste trabalho seria possível levantar uma hipótese para explicar a diminuição não significativa da atividade da proteína NR observada nas plantas CAB, caso a quantidade de proteínas disponíveis estivesse diretamente relacionada com a quantidade de RNAm.

A glutamina foi citada por vários pesquisadores como reguladora da atividade das enzimas diretamente relacionadas com a absorção de nitrato. A glutamina atuou negativamente na expressão da NR em folhas de tabaco (Deng, 1991^a). Em Culturas de células de espinafre a presença de glutamina levou a uma redução na expressão de RNAm da NR e uma diminuição na atividade da NR, entretanto os resultados não se repetiram para o RNAm da NiR e a atividade NiR (Ogawa et al., 1999). Tem sido frequentemente proposto, na base de estudos correlacionados e efeitos de inibidores, que a glutamina, ou metabólitos relacionados, exercem controle negativo na regulação da expressão do *NIA*. Dzuibany et al. (1998) Utilizaram mutantes de *Arabidopsis* deficientes no Fd-GOGAT crescidos na presença de 2% de CO₂ para suprimir a fotorrespiração, e depois transferidos para níveis atmosféricos de CO₂. Apesar do grande acúmulo da glutamina, o transcrito *NIA* respondeu como as plantas selvagens. Os autores concluíram que a glutamina não exerce controle negativo no *NIA*, e argumentaram que a repressão reportada em outros estudos após a adição de glutamina exôgena pode ser um efeito indireto, devido a inibição da absorção do nitrato, pela glutamina.

A questão gerada em torno do papel da glutamina na regulação dos genes *nia* deve-se, em grande parte, à diferença existente na experimentação dos diversos autores. Trabalhos que utilizam fornecimento de glutamina exôgena podem fornecer resultados falsos com relação ao papel da glutamina endôgena. As plantas de tabaco TR-1 e TR-2, que apresentaram aumento no conteúdo de glutamina e glutamato endôgeno, representam uma excelente ferramenta experimental, pois elas apresentam maior conteúdo destes amino ácidos sem serem submetidas a ambientes com alto O₂, ou fornecimento exôgeno, são portanto de grande valia para elucidar as duvidas com relação ao real papel destes

amino ácidos na transcrição dos genes *nia*, sendo assim nossos experimentos estão mais próximos dos possíveis níveis fisiológicos uma vez que trabalhamos com plantas intactas com alteração em uma proteína indiretamente relacionada com a via metabólica de assimilação do Nitrato.

Apesar de possuir maior quantidade de glutamina, as plantas transgênicas não apresentaram diferenças na atividade da NR quando comparadas com as plantas selvagens, o que nos leva a crer que a glutamina não está exercendo uma regulação negativa no *nia* seja verdadeira. Entretanto a atividade total da nitrato redutase pode servir apenas como uma estimativa da quantidade de enzima disponível, e seriam necessários estudos do conteúdo de RNAm *nia*, para complementar os dados. Desta forma, mais experimentos são necessários para responder estas questões.

5.2. Aumento da atividade da Glutamina Sintetase

A maior atividade da enzima glutamina sintetase observada nas plantas CAB, deve-se principalmente a isoenzima cloroplastidial, GS2. A expressão constitutiva do gene *Lhcb1*2* levou a um aumento do sistema de captura de energia luminosa, e maior disponibilidade de ATP que fornece a energia necessária à GS para conversão de glutamato para glutamina (Real, 1997). Neste ponto uma molécula de amônia é incorporada ao glutamato formando a glutamina. Esta amônia pode ter origem em um dos dois processos principais produtores de amônia: a redução do nitrato, e o processo de fotorrespiração.

A expressão dos genes de tabaco codificadores de enzimas plastidiais envolvidas na assimilação da amônia foram examinadas com relação às taxas dos dois maiores processos produtores de amônia nas folhas por Migge et al. (1997). O impedimento da redução do nitrato induzido pela aplicação de tungstato, um análogo do molibidênio, que inibe a nitrato redutase, resultou em um aumento nos *pools* de RNAm da NR e NiR. Este efeito foi em parte revertido pela aplicação de amônia. Os resultados suportam uma regulação negativa derivada do nitrato por metabólitos do nitrogênio na abundância de RNAm da NR e NiR. Os

níveis de transcritos da GS-2 e da Fd-GOGAT e correspondentes atividades enzimáticas permaneceram inalteradas pelo impedimento da redução do nitrato, sugerindo que a expressão gênica da GS-2 e Fd-GOGAT não estão sobre controle dos produtos finais da assimilação do nitrogênio. O crescimento do tabaco a uma pressão parcial de CO₂ suficientemente alta para suprimir a fotorrespiração (300Pa CO₂) não teve efeito nos níveis de transcritos da GS-2 e da Fd-GOGAT. Os pesquisadores concluíram que a taxa de produção de amônia pela fotorrespiração não exerce controle metabólico na expressão gênica da GS-2 e da Fd-GOGAT.

A maior atividade da glutamina sintetase nas plantas CAB pode estar também relacionada com a maior porcentagem de ativação da NR. Esta enzima estaria disponibilizando mais nitrito para a nitrito redutase cloroplastidial, desta maneira pode estar ocorrendo uma maior disponibilidade da amônia proveniente da assimilação do nitrato para a enzima glutamina sintetase. Entretanto, sabe-se que nas plantas C3 a maior parte da amônia utilizada pela GS é proveniente da fotorrespiração (Migge et al., 1997; Lea, 1993; Stitt, 1999). Portanto fica mais plausível a hipótese exposta acima de que a enzima Glutamina Sintetase estaria mais ativa devido à sua localização cloroplastidial, e uma maior disponibilidade de ATP, que levaria a um aumento de todo o metabolismo cloroplastidial, direcionando a sua maquinaria de transcrição e tradução a uma atividade maior. Além disso, o número de cloroplastos das Plantas CAB esta alterado, sendo maior por área foliar nas plantas CAB quando comparados às selvagens (Labate, 2001), temos portanto um outro fator que leva a crer na existência de uma maior disponibilidade da enzima GS por área foliar, o que poderia estar relacionado com a maior atividade dessa enzima nas plantas CAB, quando comparadas com as plantas selvagens. Os resultados foram expressos em atividade da enzima por clorofila, como as análises de clorofila não apresentaram diferença significativa entre plantas CAB e Selvagens, podemos assim deduzir que temos mais enzima nas plantas CAB, apesar do resultado de atividade ser representativo da disponibilidade de proteína GS nas folhas, análises de *western blotting* específica

para a GS, seriam necessárias para comprovar esta hipótese da maior disponibilidade desta enzima.

5.3. Conteúdo de Metabólitos

Os fotossintatos podem ser convertidos em sacarose e exportados, ou estocados como amido, ou usados para a síntese de amino ácidos. O Fluxo dessas vias metabólicas precisa ser regulado por dois motivos. Primeiro, a taxa total de produtos sintetizados precisa ser coordenada com a taxa de fixação do CO_2 para prevenir a inibição da fotossíntese, resultante do decréscimo dos intermediários do ciclo de Calvin ou a acumulação dos intermediários fosforilados e diminuição do fosfato inorgânico. A razão 3PGA/Pi tem um papel chave na sinalização do balanço entre a taxa fotossintética e os produtos finais sintetizados. Segundo, a distribuição de carbono fixado entre os produtos precisa ser regulada. (Stitt & Sonnewald, 1995). Estudos bioquímicos indicam que a síntese de amino é regulada pela ADPglucose-pirofosforilase (AGPase). Esta enzima é autamente ativada por 3PGA e inibida por Pi (Preiss, 1998). A superprodução de amido inibi a produção fotossintética de sacarose e sua exportação. A regulação *in vivo* tem portanto uma dupla função: (a) ativação da AGPase, pelo aumento da razão 3PGA/Pi, que media a síntese de amido em resposta ao aumento de fornecimento de fotossintatos; e (b) inibição da AGPase pela queda da taxa 3PGA/Pi que protege contra uma excessiva perda de triose fosfatos para amido (Stitt & Sonnewald, 1995).

Estudos das mudanças nos metabólitos em relação com variáveis ambientais como a luz podem servir de informação sobre como o metabolismo fotossintético na folha esta sendo limitado e regulado. O transporte de elétrons fornece ATP e NADPH para a redução do glicerato-3-P, e a razão entre as quantidades de triose-P e o glicerato-3-P pode ser usada como uma indicação do poder de assimilação luminosa (Leegood, 1995). Quando ocorre um decréscimo na utilização dos produtos do transporte de elétrons pelo metabolismo, esperasse uma queda na razão PGA/TP. O aumento da razão PGA/TP observado nas transgênicas indica uma maior utilização dos produtos do transporte de elétrons (ATP e NADPH). O NADPH e ATP gerado

pelos dois fotossistemas podem ser utilizados para a síntese de um grande número de outros compostos indo desde amino ácidos até lipídios.

As plantas transgênicas cultivadas em baixa luminosidade ($100\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) apresentaram um aumento na razão 3PGA/TP o que pode estar levando a uma maior ativação da AGPase, que catalisa a formação de ADP-glicose a partir de ATP e Glicose-1-fosfato, favorecendo a síntese de amido. Já as plantas cultivadas em alta luminosidade ($1000\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) apresentaram uma diminuição da razão 3PGA/TP indicando que nestas circunstâncias a síntese de amido pode estar inibida. O estudo dos metabólitos é importante pois as análises complementam os dados obtidos com relação a assimilação do nitrato, sustentando a hipótese de que as plantas transgênicas apresentam uma maior disponibilidade de energia e potencial redutor.

5.4. Aumento da porcentagem de Glutamina e Glutamato, e diminuição de Treonina

Da família dos amino ácidos derivados do aspartato, as vias metabólicas de síntese de lisina, treonina, metionina e isoleucina, tem sido extensivamente estudada. Sabe-se que a via complexa que origina estes amino ácidos necessitam uma considerável quantidade de energia gerada pelo NADPH e ATP. Se estas reações são realizadas dentro do cloroplasto a energia é derivada diretamente da luz. As interconversões metabólicas nas diferentes vias estão sujeitas a controle regulatório por *feedback* estrito pelos amino ácidos finais produzidos. A lisina inibe quase totalmente sua própria síntese, quando na concentração de 1.0mM, e também a síntese da homoserina e treonina. A treonina entretanto, inibi somente sua própria síntese e a da homoserina. Sabe-se que a treonina tem capacidade de inibir a homoserina dehydrogenase (Lea and Blackwell, 1993).

O aumento da disponibilidade (porcentagem) dos amino ácidos glutamina e glutamato nas folhas transgênicas vem complementar os dados obtidos para as enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase. A maior porcentagem de ativação observada para a enzima NR é forte indício de que mais nitrato esta sendo assimilado pela planta, formando mais nitrito que penetra no cloroplasto para ser convertido em

amônia, pela enzima glutamina sintetase. A glutamina sintetase é considerada hoje a porta única de entrada da amônia nos amino ácidos em plantas superiores, esta enzima catalisa a conversão dependente de ATP do Glutamato para Glutamina. A enzima glutamato sintase é responsável pela transferência do grupo amida da glutamina para o 2-oxoglutarato para formar duas moléculas de glutamato. A enzima glutamato sintase trabalha em conjunto com a glutamina sintetase na assimilação da amônia. A glutamato sintase existe em duas formas nas plantas superiores, uma utiliza ferredoxina reduzida como fonte de poder redutor e outra utiliza NADH. O Glutamato é o maior doador de grupos amino e faz parte de duas reações importantes. Ambas as reações que liberam 2-oxoglutarato, que pode voltar para o ciclo glutamina sintetase/glutamato sintase. As enzimas aminotransferases, também conhecidas como transaminases, catalisam a transferência do grupo amino da posição 2 de um amino ácido para um 2-oxo ácido para permitir a formação de um novo amino e um novo oxo ácido. (Lea, 1993). A maior porcentagem dos amino ácidos glutamato e glutamina nas plantas transgênicas é facilmente explicada pelas diferenças observadas na porcentagem de ativação da NR e atividade da GS, pois a alteração no metabolismo destas enzimas, aliado ao aumento da capacidade de geração de ATP e NADPH (Real, 1997) observado nas plantas transgênicas, pode estar diretamente correlacionado com o aumento no conteúdo dos aminoácidos glutamato e glutamina.

O amino ácido treonina é formado em uma via metabólica complexa que também envolve os amino ácidos lisina e metionina, componentes freqüentemente limitantes da qualidade das plantas utilizadas como gêneros alimentícios. Todas as reações envolvidas na síntese destes amino ácidos requerem uma considerável quantidade de energia fornecida na forma de NADPH e ATP, quando estas reações são carreadas nos cloroplastos a energia é proveniente diretamente da luz (Lea & Blackwell, 1993).

A diminuição significativa do amino ácido treonina nas plantas CAB quando comparadas com as selvagens, pode ter ocorrido em função de um desvio da energia disponível para a rota de síntese dos amino ácidos glutamina e glutamato, que também acontecem dentro dos cloroplastos e tem prioridade por serem os primeiros amino

ácidos formados e vão dar origem a todos os outros com auxílio das aminotransferases.

Os amino ácidos podem ser divididos artificialmente, em 5 famílias, baseadas nos seus precursores: a) **Aspartato**: Asparagina, lisina, treonina, metionina e isoleucina; b) **Glutamato**: Glutamina, arginina e prolina; c) **Piruvato**: alanina, serina, cysteina e glicina; d) **Eritrose 4-fosfato**: fenilalanina, tirosina e triptofano; e) **Ribose 5-fosfato**: Histidina (Lea & Blackwell, 1993).

As plantas transgênicas possuem aparentemente uma maior tendência a formar mais amino ácidos do grupo do Glutamato. Este fato poderia ser explicado pelo aumento da atividade da glutamina sintetase que estaria sintetizando mais glutamina, que participa como precursora na síntese do glutamato. Tanto a síntese de glutamina quanto a síntese de treonina estão localizadas nos cloroplastos, desta forma a diminuição do conteúdo de treonina pode ser função do aumento da síntese de glutamina observado nas plantas transgênicas, já que, estaria ocorrendo um desvio de energia da síntese de treonina direcionado para a via da glutamina.

6. CONCLUSÃO

A expressão do gene *Lhcb1*2* constitutivamente em condições de baixa luminosidade resultou em alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas que diferenciaram as plantas de tabaco transgênicas das selvagens.

As plantas transgênicas apresentaram: 1) aumento no estado de ativação da enzima Nitrato Redutase, 2) aumento da atividade da enzima Glutamina Sintetase, 3) aumento significativo na porcentagem dos amino ácidos Glutamina e Glutamato e 4) diminuição significativa da porcentagem de Treonina, presentes nas folhas, quando comparadas as plantas selvagens.

As diferenças demonstradas nas enzimas NR e GS, bem como na disponibilidade final dos aminoácidos nas folhas permitem inferir que a expressão do gene *Lhcb1*2* constitutivamente, nas plantas expostas à baixa luminosidade alterou totalmente a assimilação do nitrato, causando alteração na biossíntese dos aminoácidos primários Glu e Gln. Esta alteração metabólica provavelmente se deve à pode ser explicada pela maior capacidade das plantas transgênicas gerarem NADP e ATP, compostos que funcionam como força assimilatória para as diversas reações celulares.

Estes fatos evidenciam que novas tecnologias, visando a obtenção de transgênicos, com proteínas indiretamente relacionadas a vias metabólicas, como assimilação de nitrato e síntese de amino ácidos, podem ser utilizadas tanto no estudo da Bioquímica e Fisiologia Vegetal, quanto no Melhoramento Genético de Plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D.
Molecular Biology of The Cell. 3ed. New York. Garland Publishing. 1294p, 1994.
- ALLEN, J. F.; ALEXCIEV, K.; HAKANSSON, G. Regulation by redox signalling.
Current Biology v. 5 (8): 869-872. 1995.
- AMIR, J. AND PREISS, J. Kinetic characterization of spinach leaf sucrose-phosphate synthase. **Plant Physiol.** 69: 1027-1030. 1982.
- ANDERSON, J. M. AND ANDERSON, B. The dynamic photosynthetic membrane and regulation of solar energy conversion. **Trends Biochem. Sci.** 13, 351-355. 1988.
- ANDERSON, B. AND SYRING, S. Photosystem II: Molecular organization, function and acclimation. **Current topics in Bioenergetics** In: C. P. LEE (Ed.); Academic Press inc. San Diego 98, 2-70. 1991.
- AYRES, M.; AYRES JR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. **BioEstat Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas**. Manaus: Sociedade Civil Mamirauá, 1998. 193p.
- BACK, E.; BURKHART, W.; MOYER, M.; PRIVALLE, L. AND ROTHSTEIN, S. Isolation of cDNA clones coding for spinach nitrite reductase: complete sequence and nitrate induction. **Mol. Gen. Genet.** 212:20-26. 1988.
- BASSI, R.; DIANESE, P. A supra-molecular light harvesting complex from chloroplast photosystem II membranes. **Eur. J. Biochem.** 204: 317-26. 1992.

- BEVAN, M. Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. **Nucl. Acids.** 12, 8711-8721. 1984.
- BIELESKI, R.L. AND TURNER, N.A. Separation and Estimation of Amino Acids in Crude Plant Extracts by Thin-Layer Electrophoresis and Chromatography. **Analytical Biochemistry.** 17: 278-293. 1966.
- CATALDO, D.A.; HAROON, M.; SCHRADER, L.E.; YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Commun. Soil Science and Plant Analysis.** 6(1): 71-80. 1975.
- CHAMPIGNY, M. L. AND FOYER, C. H. Nitrate activation of cytosolic protein kinases diverts photosynthetic carbon from sucrose to amino acid biosynthesis. Basis for a new concept. **Plant Physiol.** 100: 7-12. 1992.
- CHAMPIGNY, M. L. Integration of photosynthetic carbon and nitrogen metabolism in higher plants. **Photosynthesis Research.** 46: 117-127. 1995.
- CHENG, C.L.; ACEDO, G.N.; CRISTINSIN, M. AND CONKLING, M. A. Sucrose mimics the light induction of Arabidopsis nitrate reductase gene transcription. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 89, 1861-1864. 1992.
- CSÉKE, C.; STITT, M.; BALOGH, A. AND BUCHANAN, B.B. A product regulated fructose 2,6-biphosphate occurs in green leaves. **FEBS Lett.** 162: 103-6. 1983^a.
- CSÉKE, C. AND BUCHANAN, B.B. An enzyme synthesising fructose-2,6-biphosphate occurs in leaves and is regulated by metabolite effectors. **FEBS Lett.** 155: 139-44. 1983^b.
- DENG, X.-W., CASPAR, J. AND QUAIL, P.H. COP1: A regulatory locus involved in light-controlled development and gene expression in Arabidopsis. **Genes Dev.** 5, 1172-1182. 1991^a.
- DENG, M.-D.; MOUREAUX, T.; CHEREL, I.; BOUTIN, J.-P. AND CABOCHE, M. Effects of nitrogen metabolites on the regulation and circadian expression of tobacco nitrate reductase. **Plant Physiol. Biochem.** 29, 239-247. 1991^b.
- DOEHLERT, D.C. AND HUBER, S.C. Regulation of spinach leaf sucrose phosphate synthase by glucose-6-phosphate, inorganic phosphate, and pH. **Plant Physiol.** 73: 989-994. 1983.

- DZUIBANY, C.; HAUPT, S.; FOCK, H.; BIEHLER, K.; MIGGE, A. AND BECKER, T.W. Regulation of nitrate reductase transcript levels by glutamine accumulating in the leaves of a ferredoxin-dependent glutamate synthase-deficient *gluS* mutant of *Arabidopsis thaliana*, and by glutamine provided via the roots. **Planta**. 206: 515-522. 1998.
- FEDOROVA, E.; GREENWOOD, J.S. AND OAKS, A. In-situ localization of nitrate reductase in maize roots. **Planta**. 194: 279-286. 1994.
- FERRARIO-MÉRY, S.; VALADIER, M.H.; FOYER, C.H. Overexpression of Nitrate Reductase in Tobacco Delays Drought-Induced Decreases in Nitrate Reductase Activity and mRNA. **Plant Physiol.** 117: 293-302. 1998.
- FOYER, C.H.; LESCURE, J.-C.; LEFEBVRE, C.; MOROT GAUDRY, J.-F.; VINCENTZ, M. AND VANCHERET, H. Adaptations of photosynthetic electron transport, carbon assimilation, and carbon partitioning in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* plants to changes in Nitrate Reductase activity. **Plant Physiol.** 104: 171-178. 1994.
- FOYER, C.H.; VALADIER, M.H.; MIGGE, A.; BECKER, T.W. Drought-Induced Effects on Nitrate Reductase Activity and mRNA and on the Coordination of Nitrogen and Carbon Metabolism in Maize Leaves. **Plant Physiol.** 117: 283-293. 1998.
- GALNGAU, F.; DANIELE-VEDELE, F.; MOUREAUX, T.; DORBE, M.F.; LEYDECKER, M.T. AND CABOCHE, M. Expression of leaf nitrate reductase genes from tomato and tobacco in relation to light dark regimes and nitrate supply. **Plant Physiol.** 88: 383-388. 1988.
- GOLBECK, J.H. AND BRYANT, D.A. **Photosystem I**. In "Current Topics in Bioenergetics". In: C.P. LEE (Ed.), San Diego, Academic Press INC 98, 83-169. 1991.
- GREEN, B. R.; PICHERSKY, E. AND KLOPPSTECH, K. Chlorophyll a/b binding proteins: an extended family. **Trends Biochem. Sci.** 16, 181-186. 1991.
- GUERRERO, M.G.; VEJA, J.M. AND LOSADA, M. The assimilatory nitrate reducing system and its regulation. **Annu. Ver. Plant Physiol.** 32: 169-204. 1981.

- HANKAMER, B.; BARBER, J.; BOEKEMA, E.J. Structure and Membrane Organization of Photosystem II in green plants. **Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.** 48: 641-671. 1997.
- HORTON, P.; RUBAN, A. V.; WALTERS, R.G., Regulation of light harvesting in green plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 47: 655-84. 1996.
- HUBER, J.L.A.; HUBER, S.C. AND NIELSEN, T.H. Protein phosphorylation as a mechanism for regulation of spinach leaf sucrose-phosphate synthase activity. **Arch Biochem. Biophys.** 270, 681-690. 1989.
- HUBER, S.C.; BACHMANN, M. AND HUBER, J.L. Post-Translational regulation of nitrate reductase activity: a role for Ca^{2+} and 14-3-3 proteins. **Trends in Plant Sciences.** 1(12): 432-438. 1996.
- JANG, J.C. AND SHEEN, J. Sugar sensing in higher plants. **Trends in Plant Sciences.** 2 (6) 208-214. 1997.
- JANSSON, S.; PICHERSKY, E.; BASSI, R.; GREEN, B.R.; IKEUCHI, M.; MELLIS, A.; SIMPSON, D.J.; SPANGFORT, M.; STAEHELIN, L.A. AND THORNER, J.P. A nomenclature for the genes encoding the chlorophyll a/b binding proteins of higher plants. **Plant Mol. Biol. Rep.** 10, 242-253. 1992.
- JANSSON, S. The light harvesting chlorophyll a/b binding proteins. **Biochim. Biophys. Acta** 1184: 1-19. 1994.
- KAISER, W.M. AND SPILL, D. Rapid modulation of spinach leaf nitrate reductase activity by photosynthesis. II in vitro modulation by ATP and AMP. **Plant Physiol.** 96: 368-375. 1991.
- KO, K., KO, Z.W.; TURPIN, D.H.; LABATE, C.A.; MOHANTY, N.; GRANELL, A. Overproduction of chlorophyll a/b binding protein enhances photosynthetic activity in transgenic tobacco. In: Murata, N. (ed) **Research in Photosynthesis**, vol. III, 445-448, Kluwer academic Publishers – Netherlands. 1992.
- KÜHLDBRANDT, W.; WANG, D.N. AND FUJIYOSHI, Y.. Atomic model of plant light-harvesting complex. **Nature** 367, 614-621. 1994.
- LABATE, C.A. AND LEEGOOD, R.C.. Influence of low temperature on respiration and contents of phosphorylated intermediates in darkened barley leaves. **Plant Physiol.** 91, 905-910. 1989.

- LABATE, M. ; KO, K. KO,Z.W.; PINTO,L.S.R.C.; BRITO,G.J.M.; REAL, M.J.U.D.;GRANELL,A. ; BRUGNOLI,E.; AUGUSTI,A. AND LABATE, C. Constitutive production of pea *LHCII* type 1 protein in tobacco and petunia triggers multiple responses in development, morphology, and photosynthetic capacity. Submetido, 2001
- LEA, P. J. AND LEEGOOD, R.C. **Plant Biochemistry and Molecular Biology**. 1ed. Chicester, England. Wiley, 1993. 312p.
- LEA, P.J. AND BLACWELL, R.D. Ammonia assimilation, photorespiration and amino acid biosynthesis. In: HALL, D. O.; SCURLOCK, J.M.O.; BOLHAR-NORDENKAMPF,H.R.; LEEGOOD,R.C. AND LONG, S.P. **Photosynthesis and Production in a Changing enviroment. A Field and Laboratory Manual**. London: Chapman & Hall, 1993. Cap. 20, p.313-336.
- LEEGOOD, R.C. Carbon metabolism. In: HALL, D. O.; SCURLOCK, J.M.O.; BOLHAR-NORDENKAMPF,H.R.; LEEGOOD,R.C. AND LONG, S.P. **Photosynthesis and Production in a Changing enviroment. A Field and Laboratory Manual**. London: Chapman & Hall, 1993. Cap. 16, p.247-267.
- LIN, Y. AND CHENG, C-L. A chlorate-resistant mutant defective in the regulation of nitrate reductase gene expression in Arabidopsis defines a new HY locus. **The Plant Cell** 9: 21-35. 1997.
- LOWRY, O. AND PASSONNEAU, J.V. Aflexible system of enzymatic analysis. **Academic Press**, New York. 1972.
- PINTO, L. S. R. C. Avaliação do Metabolismo Fotossintético de Plantas Transgênicas de Tabaco (*Nicotiana tabacum*) que expressam o gene *Lhcb1**2 constitutivamente em condições de alta luminosidade. Piracicaba, 2000.140p. **Tese de Doutorado**. Departamento de Genética, ESALQ-USP.
- MAN, H.M.; BAKI, G.K.A.E.; STEGMANN, P.; WEINER, H.; KAISER, W.M. The activation state of nitrate reductase is not always correlated with total nitrate reductase activity in leaves. **Planta**. 209: 462-468. 1999.
- MELZER, J.M.; KLEINHOFS, A. AND WARNER, R.L. Nitrate redutase regulation: Effects of nitrate and light on nitrate reductase messenger RNA accumulation. **Mol. Gen. Genet**. 217: 341-346.1989.

- MIGGE, A.; CARRAYOL, E.; KUNZ, C.; HIREL, B.; FOCK, H.; BECKER, T. The expression of the tobacco genes encoding plastidic glutamine synthetase or ferredoxin-dependent glutamate synthase does not depend on the rate of nitrate reduction, and is unaffected by suppression of photorespiration. **Journal of Experimental Botany**. v.48, n.311, p.1175-1184, 1997.
- MORCUENDE, R.; DRAPP, A.; HURRY, V.; STITT, M. Sucrose-feeding leads to increased rates of nitrate assimilation, increased rates of α -oxoglutarato synthesis, and increased synthesis of a wide spectrum of amino acids in tobacco leaves. **Planta**. 206: 394-409. 1998.
- OGAWA, K.; SHIRAISHI, N.; IDA, S; NAKAGAWA, H.; KOMAMINE, A. Effects of Glutamine on the induction of Nitrate Reductase and Nitrite Reductase in Cultured Spinach Cells. **J.Plant. Physiol**. 154: 46-50. 1999.
- PORRA, R.J.; THOMPSON, W. A.; KRIEDEMANN, P. E. Determination of accurate coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochim. Biophys. Acta**, v.975, p. 384-394. 1989.
- PREISS, J. Biosynthesis of starch and its degradation. In: **Biochemistry of Plants**, ed. J.Preiss, 13: 181-254, San Diego, 1988.
- QUILLERE, I.; DUFOSSÉ, C.; ROUX, Y.; FOYER, C.H.; CABOCHE, M. AND MOROT-GAUDRY, J-F. The effects of deregulation of Nurgene expression on groser and nitrogen metabolism of *Nicotiana plumbaginifolia* plants. **J. Exp. Bot.** 45 (278) 1205-1211. 1994.
- REAL, M.J.U.D. Efeito do aumento do complexo proteico clorofila a/b no metabolismo fotossintético de plantas transgênicas tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). Piracicaba, 1997 157p. **Tese de Doutorado**. Departamento de Genética, ESALQ-USP.
- RUFTY, T.W.; THOMAO, J.E.; REMMLER, J.L.; CAMPBELL, W.H. AND VOLK, R.J. Intracellular localization of nitrate reductase in roots. **Plant Physiol**. 82: 675-680. 1986.

- SOLOMONSON, L.P. AND BARBER, M.J. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. *Ann. Ver. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 41, 187-223. 1990.
- STITT, M. Fructose-2, 6-bisphosphate and plant carbohydrate metabolism. *Plant Physiol.* 84: 201-4. 1987.
- STITT, M. Rising CO₂ levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant Cell Environment.* 14, 741-762. 1991.
- STITT, M AND SONNEWALD, U. Regulation of metabolism in transgenic plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 46:341-368, 1995.
- STITT, M. Nitrate regulation of metabolism and growth. *Current Opinion in Plant Biology.* 2: 178-186, 1999.
- VAN QUY, L. AND CHAMPIGNY, M. L. NO₃⁻ enhances the kinase activity for phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase and sucrose phosphate synthase proteins in wheat leaves. evidence from the effects of mannose and okadaic acid. *Plant Physiol.* 99: 344-347. 1992.
- VAN QUY, L.; FOYER, C. AND CHAMPIGNY, M.L. Effect of light and NO₃⁻ on wheat leaf phosphoenolpyruvate carboxylase activity. Evidence for covalent modulation of the C3 enzyme. *Plant Physiol.* 97: 1476-1482. 1991.
- VAUGHN, K.C. AND CAMPBELL, W.H. Immunogold localization of nitrate reductase in maize leaves. *Plant Physiol.* 88:1354- 1357. 1988.
- VINCENTZ, M. AND CABOCHE, M.. Constitutive expression of nitrate reductase allows normal growth and development of *Nicotiana plumbaginifolia* plants. *EMBO J* 10:1027-1035. 1991.
- VINCENTZ, M.; MOUREAUX, T.; LEYDECKER, M.T.; VAUCHERET, H. AND CABOCHE, M. Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. *Plant J.* 3, 315-324. 1993.