**SUPEREXPRESSÃO DO GENE *nia-2* EM PLANTAS
TRANSGÊNICAS DE TABACO (*Nicotiana tabacum* L. cv.
PETITE HAVANA SR1) QUE EXPRESSAM A PROTEÍNA
Lhcb1*2 CONSTITUTIVAMENTE: EFEITOS NO
METABOLISMO DO CARBONO E O NITROGÊNIO**

GUILLERMO RAFAEL SALVATIERRA
Licenciatura em Genética

Orientador: Prof. Dr. **CARLOS ALBERTO LABATE**

Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura “Luiz de Queiroz”,
Universidade de São Paulo, para a obtenção
do título de Mestre em Agronomia, Área de
concentração: Genética e Melhoramento de
Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo – Brasil
Novembro – 2001

GUILLERMO RAFAEL SALVATIERRA. Superexpressão do gene *nia-2* em plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petite Havana SR1) que expressam a proteína Lhcb 1*2 constitutivamente: efeitos no metabolismo do carbono e nitrogênio.

p.	item	linha	onde se lê	leia-se
26	3.2.6	segunda	...foram selecionadas em higromicina: 29 plantas...	...foram selecionadas em higromicina desde: 29 plantas...
		terceira	...denominadas: TR1 1, TR1 2,..., TR2 9 e...	...denominadas: TR1 1, TR1 2,..., TR1 29 e...
43	4.3	primeira	... <i>in vivo</i> (+Mg ²⁺)...	... <i>in vivo</i> , em presença de Mg ⁺² , CO ₂ atmosférico e 230μmol.m ⁻² .s ⁻¹ ...
		segunda	...o (Pr>F) e o coeficiente de variação (CV) das análises de variância.	...teste F, coeficiente de variação e agrupamentos de Tukey.
44	4.3	primeira	...(EDTA)...	...em presença de EDTA, CO ₂ atmosférico e 230μmol.m ⁻² .s ⁻¹ ...
		segunda	...(Pr>F) e o coeficiente de variação (CV) das análises de variância.	...teste F, coeficiente de variação e agrupamentos de Tukey.
45	4.3	primeira	...os dados...	...em presença de CO ₂ atmosférico e 230μmol.m ⁻² .s ⁻¹ os dados...
		segunda	...(Pr>F) e o coeficiente de variação (CV) das análises de variância.	...teste F, coeficiente de variação e agrupamentos de Tukey.
46	4.3	primeira	... <i>in vivo</i> (+Mg ²⁺)...	... <i>in vivo</i> , em presença de Mg ⁺² , 180 ppm de CO ₂ e 1200μmol.m ⁻² .s ⁻¹ ...
		segunda	...o (Pr>F) e o coeficiente de variação (CV) das análises de variância.	...teste F, coeficiente de variação e agrupamentos de Tukey.
47	4.3	primeira	...(EDTA)...	...em presença de EDTA, 180 ppm de CO ₂ e 1200μmol.m ⁻² .s ⁻¹ ...
		segunda	...(Pr>F) e o coeficiente de variação (CV) das análises de variância.	...teste F, coeficiente de variação e agrupamentos de Tukey.
48	4.3	primeira	...os dados...	...em presença de EDTA, 180 ppm de CO ₂ e 1200μmol.m ⁻² .s ⁻¹ os dados...
		segunda	...(Pr>F) e o coeficiente de variação (CV) das análises de variância.	...teste F, coeficiente de variação e agrupamentos de Tukey.
51	4.4	primeira	...eficiente de variação..	...coeficiente de variação...
		segunda	...submetidas a 320...	...submetidas a 230...
		segunda	...e em baixas concentrações...	...e em concentrações...
53	4.4	primeira	...desvios dos aminoácidos, eficiente de variação e teste F...	...coeficiente de variação, teste F...
62	4.7	terceira quarta quinta sesta	...Este PIB deve ser estudado em mais detalhe, ou com o auxílio de novas técnicas, se possível mais diretas, e as análises ao igual como foi feito nos aminoácidos deveriam ser repetidos em condições de fotorrespiração.	

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Salvatierra, Guillermo Rafael

Superexpressão do gene *nia-2* em plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv Petite Havana SR1) que expressam a proteína *Lhcb1*2* constitutivamente : efeitos no metabolismo do carbono e nitrogênio / Guillermo Rafael Salvatierra. - - Piracicaba, 2001.

73 p. : il.

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

1. Fotossíntese 2. Fumo transgênico 3. Melhoramento genético 4. Metabolismo vegetal 5. Proteína I. Título

CDD 633.71

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

Dedico a meus amados pais Norma e Diego
Pelo amor, o incansável desvelo e o esforço
de cada dia.

AGRADECIMENTOS

Os caminhos transitados sempre mostraram em cada jornada uma mão amiga, aberta, para ajudar. Estas jornadas nos levam até portos distantes, onde encontramos companheiros dispostos a compartilhar parte de nossa existência, parte de nossa viagem, por todo isto um agradecimento para todos e cada um dos que participou na presente:

Ao prof. Carlos Alberto Labate, pela força e a presença em cada passo da minha formação no mestrado e a Mônica Teresa Veneziano de Labate, pela incondicional ajuda, e alegria constante.

Não posso esquecer a Lorena Sereno e Paulo Barja que definem a essência da amizade e solidariedade, para eles um MUITO PERO MUITO OBRIGADO, POR ESTAR NO MEU CAMINHO.

Na distancia para você Martín Villordo, primo, irmão e amigo.

Aos amigos de sempre Alejandro e Elizabet (futura esposa), Esteban, Luciana, Alexander, Daniela, posto que todos são responsáveis parciais de esta tese. Não posso esquecer de José Carmenzzini de Paula, pela tolerancia e o humor: Obrigado Zé.

Aos professores e colegas do curso pelos ensinamento e a calidez. Aos amigos do Laboratório pelo incentivo constante

E para fechar desde meu coração e com muito amor, para a luz de meus olhos, Margarete, porque ela sabe que ser enamorada muitas vezes é uma tarefa titânica. Obrigado por existir e ser o lar onde encontro paz, amor e felicidade.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMO	ix
SUMARY	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Fotossíntese: Assimilação de carbono	4
2.2 Pigmentos e captação de luz	4
2.3 O complexo antena	4
2.4 Os fotossistemas e o transporte de elétrons	7
2.5 O ciclo de Calvin e a fotorrespiração.....	9
2.6 Absorção e assimilação.....	13
2.7 A assimilação do nitrato	14
2.8 Interação do metabolismo do carbono e o metabolismo do nitrogênio	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Material Vegetal	23
3.2 Material biológico.....	23
3.2.1 Plasmídeo que contem o gene quimérico da nitrato redutase (NR)	23
3.2.2 Transformação da linhagem de Agrobacterium:.....	24
3.2.3 Transformação das plantas de tabaco:	24
3.2.4 Meio de cultura para germinação de plantas (Murashige T. & Skoog F. 1962).....	24
3.2.5 Esterilização de sementes (Mathis & Hinchey1994)	26
3.2.6 Seleção dos transformantes de tabaco	26
3.2.7 Extração de DNA.....	26
3.3 Análise dos transformantes por PCR.....	28

3.4 “Southern blot”.....	32
3.4.1 Preparação e Marcação da sonda.....	33
3.4.2 Detecção dos pontos de hibridação.....	34
3.5 Análise de fotossíntese.....	34
3.6 Determinação da atividade da enzima nitrato redutase.....	34
3.7 Determinação da clorofila nas amostras de NR.....	35
3.8 Determinação e quantificação de aminoácidos.....	35
3.9 Delineamento estatístico.....	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1 Análise de transformantes por PCR específico.....	38
4.2 Análise de transformação pela técnica de Southern blot.....	40
4.2.1 Linhagem TR1.....	41
4.2.2 Linhagem TR2.....	41
4.3 Estudo da Atividade da Nitrato Redutase (EC 1.6.6.1)	42
4.4 Determinação de aminoácidos folhares.....	50
4.5 Determinação do conteúdo de clorofila.....	58
4.6 Análise de fotossíntese condutividade e concentração interna de CO ₂	61
4.7 Análise de fotossíntese (assimilação de CO ₂) e condutância estomática.....	61
5 CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs.	Absorvância.
Cab	Linhagens que contêm o gene <i>Lhcb1*2</i> .
CAB	Proteínas de união à clorofila a/b
CaMV	Vírus do mosaico da couve-flor
C4	Grupo de plantas que não apresentam atividade do PS II.
CR	Centro de reação.
FBPase	Frutose bifosfatase
LHC	Complexo coletor de luz.
<i>Lhcb1*2</i>	Gene quimérico que reúne: gene de resistência à canamicina, promotor 35S, e o gene <i>Lhcb1</i> .
MAS	Promotor da manopina sintase.
MOPS	ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfônico.
MS	Meio de cultivo Murashigue and Skoog.
$\mu\text{M.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	Unidade de medida da intensidade luminosa.
NADPH	
<i>nia-2</i>	Gene da nitrato redutase
NiR	Gene da nitrito redutase.
NO_3^-	Nitrato
NR	Enzima nitrato redutase.
PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilase

PGA	Ácido fosfoglicérico.
Pi	Fosfato inorgânico
PS I	Fotossistema I
PS II	Fotossistema II
RuBisCO	Ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase.
SPS	Sacarose fosfato sintase
35S	Promotor fágico do vírus do mosaico da couve-flor.

**SUPEREXPRESSÃO DO GENE *nia-2* EM PLANTAS TRANSGÊNICAS DE
TABACO (*Nicotiana tabacum* L. cv PETITE HAVANA SR1) QUE EXPRESSAM
A PROTEÍNA Lhcb1*2 CONSTITUTIVAMENTE: EFEITOS NO
METABOLISMO DO CARBONO E O NITROGÊNIO**

Autor: GUILLERMO RAFAEL SALVATIERRA

Orientador: CARLOS ALBERTO LABATE

RESUMO

O complexo antena é um complexo de proteínas associado a pigmentos, como clorofilas e carotenóides. Tem a função de coletar energia luminosa para a fotossíntese (Horton et al., 1996). A luz é um fator importante na produtividade das plantas; no entanto, pode ser um fator de estresse, quando é superior à capacidade fotossintética da planta (Gilmore, 1997). Portanto, as plantas no decorrer da evolução desenvolveram mecanismos de aclimação e dissipação segura, evitando o excesso de energia (Horton et al., 1996); (Niyogi, 1999). As proteínas Cab são as proteínas de maior abundância no complexo antena LHCIb, e estes polipeptídeos são codificados por uma família multigênica: a família *Lhc* em plantas superiores (Anderson & Anderson, 1988); (Bassi & Dainesse, 1992), sendo este complexo fundamental para a resposta das plantas a flutuações de luz (Horton et al., 1994). O metabolismo do carbono encontra-se intimamente relacionado em diversos pontos com o metabolismo do nitrogênio (Geiger et al., 1999); (Stitt & Krapp, 1999); (Huppe & Turpin, 1994). Uma regulação muito precisa entre estes dois metabolismos é necessária para evitar conflitos pela disponibilidade de poder redutor e precursores orgânicos (Champigny, 1995). Este

trabalho tem o objetivo de estudar a regulação dos metabolismos do nitrogênio e carbono, em plantas transgênicas que produzem constitutivamente as proteínas *Lhcb1*2* de ervilha e a enzima nitrato redutase (EC 1.6.6.1). A avaliação do metabolismo do carbono foi feita por estudos de assimilação de CO₂, quantificação da clorofila *a*, clorofila *b* e razão entre as duas. O metabolismo do nitrogênio foi avaliado por análises da ativação da nitrato redutase e quantificação de aminoácidos. Os resultados mostraram que as plantas transgênicas apresentam uma maior quantidade e atividade da nitrato redutase, evidenciadas pela maior atividade total e seletiva dos transformantes. Estes eventos de transformação aparentemente provocaram uma alteração da fotorrespiração dos indivíduos transgênicos, evidenciados pela diminuição do aminoácido serina, também foi detectada uma drástica diminuição de treonina e um aumento no conteúdo total de aminoácidos em relação aos transformantes primários (transformados só com o gene *Lhcb1*2*).

**SUPEREXPRESSION OF THE GENE *nia-2* IN TRANSGENIC PLANTS OF
TOBACCO (*Nicotiana tabacum* L. cv. PETITE HAVANA SR1) THAT EXPRESS
THE PROTEIN Lhcb1*2 CONSTITUTIVELY: CONSEQUENCES IN THE
METABOLISM OF CARBON AND THE NITROGEN**

Author: GUILLERMO RAFAEL SALVATIERRA

Adviser: Prof. CARLOS ALBERTO LABATE

SUMMARY

The antenna complex is a protein complex associated to pigments, as chlorophylls and carotenoids. Its function is to collect light energy for the photosynthesis (Horton et al., 1996). Light is an important factor on plant productivity; however, radiation can be a cause of stress if it is above the photosynthetic capacity of the plant (Gilmore, 1997). Thus, during evolution plants developed mechanisms of acclimation and safe dissipation, avoiding excess energy (Horton et al., 1996); (Niyogi 1999). *Cab* proteins are the more abundant proteins within the antenna complex, and this polipeptides are codified for a multigenic family, the family *Lhc* in superior plants (Anderson & Anderson, 1988); (Bassi & Dainesse, 1992). This complex is essential for the answer of plants to light fluctuation (Horton et al., 1994). Carbon metabolism is related in several points with nitrogen metabolism (Geiger et al., 1999); (Stitt & Krapp, 1999); (Huppe & Turpin, 1994). It is necessary a precise regulation between these two metabolisms to avoid conflicts for the availability of reducing power and organic precursors (Champigny, 1995). This work has the objective of studying the regulation of the

metabolisms of nitrogen and carbon in transgenic plants that produce constitutively the proteins *Lhcb1*2* of pea and the nitrate reductase enzyme (EC 1.6.6.1). The evaluation of the carbon metabolism was made through studies of CO₂ assimilation, quantification of the chlorophylls *a* and *b* and their ratio between both. Nitrogen metabolism was evaluated through analysis of the activation of the nitrate reductase and quantification of aminoacids. Results showed that transgenic plants present more content and activity of the nitrate reductase, evidenced by a higher total and *in vivo* activity of the transformers. These transformation events apparently caused an alteration of the fotorespiration of the transgenic plants, evidenced by the decrease of the serina aminoacid. It also was detected a drastic decrease of threonine and an increase in the total content of aminoacids in relation to the primitive transformers (transformed just with the gene *Lhcb1*2*).

1 INTRODUÇÃO

Desde 1980 o uso de plantas transgênicas tornou-se uma importante ferramenta no estudo da fisiologia vegetal. Nos últimos trinta anos umas das áreas da genética que teve maior crescimento foi a biotecnologia. A tecnologia do DNA recombinante permitiu alterar a expressão de múltiplas enzimas, importantes no metabolismo de uma variedade enorme de organismos. E os limites potenciais desta tecnologia ainda não foram vislumbrados.

Em vegetais, esta técnica levou a um maior entendimento das respostas metabólicas das plantas a distintas condições ambientais (Stitt, 1995); (Hoff et al., 1994); (Ferrario-Mery et al., 1998) através da super-expressão, e mesmo a repressão (Deborne et al., 1994), via DNA “anti-sense” (Goshima et al., 1999) de enzimas chaves que catalisam passos regulatórios importantes para o metabolismo de plantas, ou pela super-expressão de genes exógenos (Harrison et al., 2000); (Heineke et al., 1999); (Caboche & Rouze 1990); (Becker, 1990); (Vaucheret et al., 1992). Uma das vias metabólicas importantes dos vegetais que apresenta o maior potencial de ser alterada é a fotossíntese. A eficiência de conversão da energia nas plantas é muito baixa: em relação ao total de energia solar disponível (Barja, 2000). Assim, a biotecnologia oferece uma boa oportunidade de intervenção, para alterar por exemplo complexos pigmento/proteína das chamadas antenas.

A captação de energia luminosa é realizada pelos sistemas antena (“Light Harvesting Complexes”) LHCII e LHCI, que encontram-se associados aos fotossistemas II e I respectivamente. O tamanho desta antena fotossintética é variável. Os organismos fotossintéticos que crescem sob condições de baixa intensidade luminosa têm geralmente um número maior de pigmentos por complexo antena, por centro de reação, em relação àqueles que crescem em condições de alta intensidade luminosa. As plantas têm a capacidade de adaptar o tamanho de seu sistema antena conforme a

disponibilidade de luz, sendo que estes sistemas têm a função de aumentar a eficiência de absorção da energia eletromagnética nos organismos fotossintéticos (Anderson & Anderson 1985).

A regulação do processo fotossintético em plantas com alterações do tamanho do complexo LHCIIB foi estudada em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR1) transformadas com o gene quimérico *Lhcb1*2* de ervilha, associado ao promotor constitutivo, 35S, do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) e ao peptídeo trânsito da subunidade menor da rubisco (*rbcstp*). Este trabalho vêm sendo realizado em nosso laboratório com a colaboração do Dr. Kenton Ko, do Departamento de Biologia da Universidade Queen's Ontario, Canadá. Como resultado desse trabalho, selecionou-se 2 linhagens, com alto nível de expressão do gene *Lhcb1*2*, de um total de 21 transformantes oriundos de eventos independentes de transformação (Ko et al., 1992). Essas linhagens foram denominadas TR1 e TR2.

Estudos da expressão ectópica desse gene *Lhcb1*2* nestas duas linhagens mostraram vários efeitos pleiotrópicos que resultaram segundo Labate¹ e Barja² em:

1. Aumento do período de desenvolvimento vegetativo; um atraso no florescimento, além de alterações morfológicas e anatômicas das folhas das plantas transgênicas;
2. Alteração do número de cloroplastos por célula;
3. Aumento na síntese de carboidratos (amido e sacarose);
4. Maior conteúdo de amido nas sementes.

Esse conjunto de efeitos levou à uma série de alterações na regulação dos metabolismos fotossintético e fotorrespiratório dessas plantas, resultando numa menor síntese de aminoácidos com conseqüências para o desenvolvimento e produtividade das plantas.^{1, 2}

¹ LABATE et al., Constitutive production of pea LHCII type I protein in tobacco triggers multiple responses I: effects on plant development and the lowering of photorespiration. Plant Science (submetido).

² BARJA et al., Constitutive production of pea LHCII type I protein in tobacco triggers multiple responses. II: photosynthesis in low and high irradiance and the impact of low photorespiration on thermal dissipation.. Plant Science (submetido).

Como o objetivo de estudar as alterações que ocorreram na regulação do metabolismo do carbono e nitrogênio, nessas duas linhagens transgênicas de tabaco uma nova construção foi introduzida contendo o gene *nia-2* que codifica a enzima nitrato redutase (EC 1.6.6.1). Esta nova construção contém o promotor (MAS) da manopina sintase de *Agrobacterium tumefaciens* em *cis* com o gene quimérico *nia-2* da nitrato redutase de *Nicotiana sylvestris* (NR, EC 1.6.6.1) (EC 1.6.6.1) (Vaucheret et al., 1989b). Ambos foram clonados no vector binário pBIB-Higro (Becker, 1990). Este vector contém o gene *hpt*, da higromicina fosfotransferase, permitindo a seleção de transformantes resistentes a este antibiótico (Waldron et al., 1985). Esta parte do trabalho foi conduzida com a colaboração do laboratório de biologia celular do Dr. C. Meyer do INRA-Versailles, França.

Para este estudo foram obtidas plantas transformantes com a construção quimérica do gene *nia-2*, que foram analisadas por:

- I. Caracterização genética dos transformantes: como a resistência à higromicina é um fator dominante, a análise da segregação das sementes resultantes da autofecundação dos transformantes foi realizada em meio seletivo contendo higromicina (Waldron et al., 1985), onde se espera uma segregação de 3:1 de sementes resistentes para sensíveis. A fixação do gene exógeno foi feita via autofecundações sucessivas das gerações subsequentes;
- II. Caracterização molecular das plantas duplamente homozigotas: as linhagens TR1 e TR2 duplamente transformadas serão analisadas para determinação das características gênicas e de organização do gene quimérico *nia-2* por meio de PCR específico e da técnica de *Southern blot* do DNA genômico;
- III. Caracterização fisiológica e metabólica: análise da taxa fotossintética, fluorescência da clorofila, quantificação da atividade da enzima nitrato redutase das plantas homozigotas, detecção e quantificação de aminoácidos foram realizadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fotossíntese: assimilação de carbono

O termo fotossíntese significa, literalmente, síntese usando luz. A vida como a conhecemos depende deste processo importantíssimo. Nas plantas superiores, o tecido fotossinteticamente mais ativo é o mesofilo folhar.

As reações luminosas, ou seja, dependentes da luz acontecem dentro dos cloroplastos, em vesículas denominadas “grana”, formadas pelas membranas dos tilacóides, onde estão os componentes dos fotossistemas (Noctor & Foyer1998). Essas reações geram ATP e NADPH que, por sua vez, serão utilizados na síntese de carboidratos.

2.2 Pigmentos e captação de luz

As células do mesofilo têm muitos cloroplastos, e estes contêm pigmentos verdes especializados na absorção de luz, as clorofilas.

A energia do sol é absorvida por pigmentos nas plantas e todos os pigmentos ativos fotossinteticamente encontram-se nos cloroplastos. A clorofila é o pigmento comum a todos os organismos fotossintéticos. Existem distintos tipos de clorofilas: *a*, *b*, *c*, *d* e *e*. A *clorofila a*, cromóforo primário, é responsável pela absorção de luz e está presente em todos os organismos fotossintéticos (plantas, alguns protistas e cianobactérias). Os pigmentos acessórios absorvem a energia que não é absorvida pela *clorofila a*, ampliando a faixa de absorção (Bassi & Dainese1992). Estes incluem a *clorofila b*, (também *c*, *d* e *e* em algas e protistas), *xantofilas* e *carotenóides* (por ex., o β -caroteno) (Taiz & Zeiger, 1998).

2.3 O complexo antena

A energia é absorvida por pigmentos complexados com proteínas denominadas CAB (“*Chlorophyll a/b* Binding Protein”) (Horton & Ruban, 1994). Estes encontram-se associados aos fotossistemas, formando os denominados complexos antena (LHCs) que se encontram associados aos fotossistemas: o LHC I, ao fotossistema I; o LHC II, ao fotossistema II (Dreyfuss & Thornber1994); (Green & Dunford1996); (Horton & Ruban, 1994). Foram caracterizados ao menos cinco complexos proteína-pigmento: LHC Ila, LHC I Ib, LHC I Ic/c’, LHC I Id, LHC I Id. O mais abundante é o LHC I Ib, que se une a 60% das clorofilas do PSII; os demais são denominados complexos LHC II menores (Bassi & Dainese1992). Os polipeptídeos que formam estes complexos são codificados por uma família multigênica denominada *Lhc*. Os complexos LHCII constituem 50% do conteúdo proteico dos tilacóides, e apresentam a capacidade de adaptar-se a distintas condições ambientais, intensidade luminosa, alta e baixa temperatura (Green & Dunford1996); (Bassi & Dainese1992).

O sistema coletor de luz em plantas superiores evoluiu para maximizar a taxa ou o direcionamento de energia até os centros de reação (Bassi & Dainese1992); (Dreyfuss & Thornber1994). No entanto, em condições de excesso de intensidade luminosa, ocorre (Horton & Ruban, 1994):

1. Aumento da taxa de excitação do centro de reação do fotossistema II, levando à fotoinibição e à formação de radicais livres;
2. Aumento da fotoxidação dentro da antena do fotossistema II.

Portanto, é necessária a ação de mecanismos para dissipar o excesso de energia, por exemplo na forma de calor ou fluorescência (Horton & Ruban, 1994).

O “quenching” ou dissipação não fotoquímica (q_N) da fluorescência da clorofila é o resultado desse processo. *In vivo*, pode separar-se em duas componentes: a primeira abrange a maior parte do q_N , relaxa com cinéticas similares àquelas do ΔpH , é eliminada por agentes desacopladores e denominada q_E . A segunda relaxa por volta dos 10 minutos e se denomina q_I ; esta é problemática, posto que se sobrepõe ao “quenching” produzido quando o fotossistema sofreu dano (Horton & Ruban, 1994). A dissipação resulta de associações específicas clorofila-xantofilas que são promovidas por

protonação de aminoácidos especiais no interior protéico (Verhoeven et al., 1999); (Horton & Ruban, 1994).

O LHCII une-se a uma classe de carotenóides denominados xantofilas, que se diferenciam pela estrutura do seu grupo terminal. Em folhas adaptadas a condições de escuro, as principais xantofilas são: luteína, neoxantina e violaxantina (Horton & Ruban, 1994). Em condições de luz saturante, para o transporte eletrônico, aproximadamente 90% da violaxantina é transformada em zeaxantina, num processo de de-epoxidação reversível, via anteraxantina. Esse processo denomina-se ciclo das xantofilas (Verhoeven et al., 1999) (Ruban & Horton 1999).

As propriedades dos complexos mudam na presença de zeaxantina, e a síntese desta é estimulada pela luz. A extensão da mudança, depois da estimulação da síntese de zeaxantina (quando as folhas são expostas na luz), é diferente em cada um dos componentes do LHC II. LHCIIc é o mais sensível a esta mudança de síntese; isto sugere que o LHCIIc tem uma função importante na dissipação (Ruban & Horton 1999); (Krishna, 1999) (Horton & Ruban, 1994).

Pode-se notar a mudança das propriedades dos complexos relacionada com a indução da síntese de zeaxantina, uma vez que a ativação pela luz, via síntese de zeaxantina, tem efeitos marcantes e diferenciais nos componentes do LHCII (Horton & Ruban, 1994). As xantofilas podem ser vistas como constituintes importantes do LHCII, que adaptam as propriedades destes para a coleta de luz ou dissipação de energia (Ruban & Horton 1999).

A heterogeneidade dos componentes do LHCII pode ser explicada pelos requerimentos fisiológicos das plantas (Bassi & Dainese 1992). Uma série de experimentos sugerem que os dois componentes do q_N (q_I e q_E) ocorrem no LHCII (Ruban & Horton 1999).

Quais seriam os benefícios da divisão de trabalho entre antenas e centros de reação? Sob luz intensa, uma clorofila absorve uns poucos elétrons por segundo; em consequência, se cada clorofila estivesse associada com um centro de reação (RC) individual, este estaria ativo só ocasionalmente. Mas se vários pigmentos podem enviar energia a um RC particular, o sistema será mantido ativo numa porção muito maior do

tempo, o que aumentaria a eficiência do sistema (fig. 7-7). Existem 12 subunidades LHCIIb associadas a cada centro de reação do fotossistema II (Dreyfuss & Thornber, 1994) (Figura 1).

Figura 1- Diagrama que representa a colaboração entre os complexos antena, no seu aporte de elétrons para os seus respectivos centros de reação. Adaptado do hipertexto do Instituto Tecnológico de Massachusetts (MIT): www.mit.edu/~8001

2.4 Os fotossistemas e o transporte de elétrons

Nos cloroplastos, os tilacóides são as unidades estruturais da fotossíntese. Todos os organismos fotossintéticos que produzem oxigênio têm 2 tipos de centros de reação (RC): os centros de reação do fotossistema II (PS II) e os do fotossistema I (PS I) (Dreyfuss & Thornber, 1994). Os modelos estruturais mais aceitos apresentam os fotossistemas como sendo compostos por uma região central denominada “core”, onde

acontecem as reações fotoquímicas, rodeada por grandes complexos, as chamadas antenas. Os RC do PS II estão formados pelas proteínas D1 (PsbA) e D2 (PsbD) (Hankamer et al., 1997)

O PS II permite utilizar a energia do sol captada nas antenas para realizar uma série de reações de transferência de elétrons que vão permitir a quebra da molécula de água produzindo O_2 , prótons e elétrons (Hankamer et al., 1997).

A energia coletada pelas antenas é canalizada para os fotossistemas através dos complexos proteína-clorofila (CP) 47 e 43 denominados PsbB e PsbC para o RC do PSII. Isto permite converter o oxidante primário P680 para $P680^+$, com o elétron sendo doado para uma feofitina. O elétron perdido é restituído por um elétron da tirosina (161) da proteína D1, sendo por sua vez restituído por um elétron da água, num processo mediado por um conjunto de 4 átomos de Mn associados à face lumenal do PS II (Hankamer et al., 1997).

Os elétrons da feofitina são transferidos pelas quinonas A (Q_A) e quinonas B (Q_B) e levados até o citocromo b/f. Esta excitação de elétrons do fotossistema II leva ao acúmulo de prótons da água no lúmen do cloroplasto, e à transferência de elétrons da face luminal para a face estromal. No processo de redução do fotossistema e oxidação da plastoquinona, prótons são transferidos desde o estroma para o lúmen. Assim, o transporte de elétrons contribui com a formação do gradiente eletroquímico para a síntese de ATP, acidificando o lúmen do tilacóide e alcalinizando o estroma (Bryce & Hill, 1993).

A redução de $NADP^+$ e a formação do gradiente eletroquímico de prótons usado na fosforilação oxidativa precisa do transporte de elétrons. Isto requer a ação de 3 complexos multienzimáticos:

O complexo do fotossistema II;

O complexo do citocromo b/f;

O complexo do fotossistema I.

O nexa entre estes 3 complexos multienzimáticos é um conjunto de plastoquinonas e plastocianinas móveis (Noctor & Foyer 1998).

2.5 O ciclo de Calvin e a fotorrespiração

Em algas e plantas superiores, existe um único mecanismo de carboxilação. Entretanto, em plantas C_4 e CAM há mecanismos auxiliares de fixação de carbono. O carbono fixado na biosfera passa pelo ciclo de Calvin que é realizado nos cloroplastos.

Figura 2- Melvin Calvin com alguns dos aparelhos que usou no estudo do CO_2 na fotossíntese. Fotografia pertencente ao Laboratório Nacional de Berkeley: http://www-itg.lbl.gov/ImgLib/COLLECTIONS/BERKELEY-LAB/PEOPLE/INDIVIDUALS/index/BIOCHEM_523.html.

Este ciclo é composto de 13 reações, catalisadas por 11 enzimas; segundo Leegood (1993), possui 4 características principais:

1. A carboxilação da ribulose 1,5-bifosfato (RuBP) produz glicerato 3-fosfato, sendo catalisada pela enzima 1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase (Rubisco);
2. A redução do glicerato 3-fosfato (PGA) para triose fosfato, o gliceraldeído 3-fosfato (G3P), precisa de 2 ATP e 2 NADPH;
3. A regeneração doceptor primário RuBP permite que 5 moléculas de 3 carbonos sejam convertidas em 3 moléculas de 5 carbonos (pentoses fosfato); uma molécula de ATP é necessária para converter a pentose fosfato em RuBP. No total, são necessárias 3 moléculas de ATP e 2 de NADPH para cada molécula de CO_2 fixado;

mais de 65 milhões de toneladas de fertilizantes nitrogenados por ano, e as expectativas eram de quadruplicar estas quantidades a partir do ano 2000 (Pimentel, 1998). A produtividade está relacionada à disponibilidade de nitrogênio. No entanto, excessos de nitrato no solo trazem duas consequências gerais indesejáveis (Nejidat et al., 1996): a primeira é o acúmulo de nitrato na planta, e a outra é a perda de nitrato do solo, pelo arraste da água (lixiviação).

Pesquisas em torno da assimilação de nitrato são necessárias para entender como as plantas respondem e assimilam nutrientes do solo (Nejidat et al., 1997). A questão que surge é: quais são os fatores que determinam o limite de utilização deste recurso? As técnicas de engenharia genética poderiam ter um papel fundamental na exploração destes limites.

Sendo o carbono e o nitrogênio os maiores constituintes da biomassa de plantas, são necessários em abundância nas plantas superiores e inferiores (Tischner, 2000). A disponibilidade do nitrogênio no meio ambiente em formas utilizáveis e a sua incorporação em compostos celulares são os principais fatores limitantes no crescimento de plantas e na produção de biomassa (Temple et al., 1998); (Nejidat et al., 1996), (Nejidat et al., 1997). Como pode ser visto ele encontra-se relacionado com muitos processos metabólicos (figura 4)

Figura 4. Esquema representando a assimilação do nitrato e a incorporação da amônia em compostos orgânicos. Imagem extraída do livro “Plant Biochemistry and Molecular Biology” (Lea & Leegood, 1993)

O nitrato e o amônio são as maiores fontes de nitrogênio inorgânico absorvidas pelas plantas. O amônio está presente em alguns solos anaeróbicos e ácidos. Pode ser absorvido pelas plantas diretamente, mas normalmente é reduzido a nitrato por bactérias nitrificantes (Lea, 1993). O nitrato é a fonte de nitrogênio mais vantajosa para as plantas (Nejidat et al., 1996); (Nejidat et al., 1997), mas a resposta para uma fonte particular varia de uma espécie para outra (Tischner, 2000); (Crawford & Glass 1998). No entanto, as plantas não utilizam todo o nitrato ou toda a fonte de nitrogênio no seu ambiente para produção de biomassa (Crawford & Glass 1998).

2.7 Absorção e assimilação

A absorção inicial de nitrato acontece através da membrana plasmática de células corticais e epidérmicas da raiz. O nitrato pode circular na planta sem problemas ou ser acumulado em vacúolos sem causar danos (Tischner, 2000). O transporte posterior é através da membrana do tonoplasto e através da membrana plasmática de células do sistema vascular (Crawford, 1995).

O sistema de absorção de nitrato em plantas deve ser versátil e robusto porque as plantas devem transportar suficiente nitrato para satisfazer a demanda total de nitrogênio, e a concentração no solo pode variar em 5 ordens de magnitude. O sistema de transporte é ativo, regulado e multifásico. A energia é entregue por um gradiente protônico mantido através da membrana plasmática pela H^+ -ATPase (Lea, 1993); (Crawford, 1995).

As plantas possuem sistemas de transporte de nitrato com distintas afinidades. As raízes possuem pelo menos 3 transportadores de nitrato cineticamente distintos (Crawford & Glass1998): sistemas de transporte constitutivos de alta afinidade (CHATS), com baixos valores de K_m ; sistemas de transporte de alta afinidade (IHATS), com valores de K_m maiores, induzidos durante o dia por exposição a nitrato e por último sistemas de transporte constitutivos de baixa afinidade (LATS), que contribuem significativamente para a absorção de nitrato acima de 250 μM (Tischner, 2000).

A absorção de nitrato vê-se afetada por certas condições ambientais: concentração de CO_2 atmosférico, temperatura da raiz e radiação UV (que tem efeito negativo na assimilação do nitrato). No entanto, quando está dentro da raiz o nitrato tem 4 destinos possíveis:

1. Redução para nitrito pela enzima citoplasmática nitrato redutase (Crawford & Glass1998); (Lea, 1993).
2. Refluxo através da membrana plasmática – existem evidências de que é um transporte saturável e seletivo para nitrato e é induzido por nitrato, mas até agora nada se sabe sobre as proteínas envolvidas nesta via de refluxo (Crawford & Glass1998).
3. Armazenamento dentro de um vacúolo (Crawford & Glass1998).

4. Transporte para o xilema – transporte de longa distância até as folhas (Lea, 1993).

2.8 A assimilação do nitrato

Se o nitrato toma o quarto destino especificado, deve deixar o xilema e entrar nas folhas do mesofilo, onde é absorvido *de novo* e reduzido à nitrito (NO_2^-) ou armazenado nos vacúolos (Crawford & Glass1998); (Lea, 1993). Elevadas concentrações de nitrato no xilema, de 5 a 40 mM, e baixos níveis no floema indicam que o nitrato é absorvido eficientemente pelas folhas (Crawford & Glass1998).

Depois da absorção do nitrato dentro da célula vem a redução de nitrato para nitrito. Este processo compete evidentemente com a saída de nitrato da célula e o transporte de nitrato dentro dos vacúolos (Lea, 1993).

A enzima que catalisa a reação de redução é a nitrato redutase (NR, C 1.6.6.1). Está localizada primariamente no citosol, ou associada debilmente às membranas dos cloroplastos durante a redução (Crawford & Glass1998); (Lea, 1993).

O poder redutor necessário para a redução do nitrato é fornecido na forma de NAD(P)H para a NR (EC 1.6.6.1) e ferredoxina reduzida para a nitrito redutase (NiR, EC 1.7.7.1). A NR (EC 1.6.6.1) transporta 2 elétrons do NAD(P)H para o nitrato, a partir de três centros redox compostos pelos seguintes grupos prostéticos: Um dinucleotídeo de flavina-adenina (FAD), um grupo heme (citocromo b_{557}) e um cofator MoCo, que é um complexo pterina e molibdeno. A enzima funcional é um homodímero composto de duas subunidades de 110 kD (Crawford, 1995); (Crawford & Glass1998). Esta enzima possui 3 domínios funcionais:

De união ao FAD;

De união ao grupo heme;

De união ao grupo pterina molibdeno.

A assimilação do nitrato produz íons hidroxila, portanto ácidos orgânicos são necessários para manter a homeostase do pH. Para coordenar estes passos existe uma rede reguladora responsável pelo processamento dos sinais internos e externos (Crawford, 1995).

A nitrato redutase (NR, EC 1.6.6.1) está fortemente regulada transcricional (Vincentz et al., 1993); (Crawford, 1995); (Galangau et al., 1988); (Matt et al., 1998) e pós-transcricionalmente (Kaiser & Huber 1994); (Huber & Huber 1996); (Kanamaru et al., 1999); (Morcuende et al., 1998).

A resposta universal das plantas e fungos frente ao nitrato é a indução da expressão gênica (Galangau et al., 1988); (Crawford, 1995). Genes que respondem a esta indução codificam os transportadores de nitrato, NR (EC 1.6.6.1), NiR, glutamina sintase e glutamato sintase dependente de ferredoxina (Tischner, 2000); (Crawford & Arst 1993); (Wang et al., 2000). Em plantas, a indução acontece em minutos, respondendo a concentrações muito baixas (menos de 10 μ M) (Crawford, 1995).

A atividade da NR (EC 1.6.6.1) é induzida pelo nitrato e a indução precisa de luz, possivelmente via fitocromo, o sinal é transduzido, nos tecidos verdes (Matt et al., 1998); (Lea, 1993). Embora este efeito não possa ser completamente explicado, a luz pode ser substituída pela glicose, sacarose, acetato ou α -oxoglutarato (Morcuende et al., 1998); (Tischner, 2000); (Muller et al., 2001). No entanto, existe evidência de uma ativação do gene da NR (EC 1.6.6.1) que acontece depois de uma diminuição das fontes de nitrogênio como por exemplo amônia ou compostos nitrogenados (Galangau et al., 1988). Portanto, a presença de nitrato não é um pré-requisito para a expressão do gene da NR (EC 1.6.6.1) (Matt et al., 1998); (Morcuende et al., 1998). Alguns dados mostram que, na realidade, quantidades muito baixas de nitrato são suficientes para a indução e que o fluxo de nitrogênio (ou o estado de nitrogênio na planta) é que controla a expressão da NR (EC 1.6.6.1) (Tischner, 2000).

Os níveis de CO₂, ritmo circadiano, carbono e metabólitos como a sacarose, carboidratos, uma variedade de fatores de crescimento e a glutamina também têm funções muito importantes na regulação (Matt et al., 2001); (Geiger et al., 1999); (Lea, 1993); (Crawford, 1995); (Morcuende et al., 1998); (Matt et al., 1998); (Ogawa et al., 1999). Aparentemente, a indução da NR (EC 1.6.6.1) pela luz ou pelo nitrato tem efeitos aditivos e pode ser estimulada por citoquininas. Em *Arabidopsis*, a aplicação de citoquininas incrementou a expressão de *nir-1* mas não a de *nir-2*, que representa um 90% da atividade da nitrato redutase (Becker, 1990), (Tischner, 2000).

A indução da NR (EC 1.6.6.1) é inibida por compostos nitrogenados reduzidos como a amônia ou aminoácidos como a glutamina e asparagina, sendo estes os mais potentes inibidores dentre os aminoácidos. Mudanças no conjunto total de aminoácidos, usando inibidores da glutamato sintetase ou da GOGAT mostram uma complexa interação destes inibidores com outras partes do processo de assimilação do nitrato. Ainda é incerto se a glutamina afeta a expressão da NR (EC 1.6.6.1) por inibição da absorção do nitrato ou se glutamina e asparagina diretamente afetam a expressão da nitrato redutase e sua atividade (Tischner, 2000). O estímulo da luz na atividade da NR (EC 1.6.6.1) é muito rápido, e quando as plantas são levadas para escuridão a diminuição da atividade também acontece rapidamente. Apresentaram-se evidências mostrando que a fosforilação da NR (EC 1.6.6.1) pode ser o mecanismo pelo qual acontecem estas rápidas variações (Huber et al., 1996); (Kanamaru et al., 1999). Pesquisas posteriores foram focalizadas nas quinases necessárias para esta fosforilação. As quinases podem ser inibidas por metabólitos, dihidroxiacetona fosfato, glucose 6-fosfato e frutose 1,6-bifosfato. No entanto, existe uma regulação mais complexa da nitrato redutase, envolvendo também fosfatases, mas ainda pouco se sabe disto (Tischner, 2000). A fosforilação por si mesma não muda a atividade da NR (EC 1.6.6.1): precisa-se de outra proteína, identificada como uma proteína da família das 14-3-3 (Tischner, 2000), (Huber et al., 1996); (Kanamaru et al., 1999). A modulação da fosforilação pode ser influenciada pelo pH: em pH baixo, a NR (EC 1.6.6.1) é ativada. Pode também ser afetada pelo nitrato: o corte de raízes dispara a degradação proteolítica da NR (EC 1.6.6.1), sendo o melhor substrato a NR (EC 1.6.6.1) fosforilada unida a proteínas 14-3-3 (Tischner, 2000).

O próximo passo na via de assimilação do nitrato é a redução do nitrito para amônio pela nitrito redutase dependente de ferredoxina (NiR, EC 1.7.7.1) (Lea, 1993); (Crawford, 1995). Consequentemente, a forma mais reduzida de nitrogênio inorgânico nas plantas superiores na assimilação é o NH_4^+ , independentemente da fonte de nitrogênio (Temple et al., 1998). A nitrito redutase (NiR) é uma enzima codificada no núcleo e transportada para o cloroplasto. Possui uma seqüência de direcionamento com

cerca de 30 aminoácidos. A holoenzima é um monômero de 70 kD (Crawford, 1995); (Lea, 1993).

O nitrito que entra nos cloroplastos é reduzido até amônia pela *nitrito redutase* (NiR) (Lea, 1993); (Temple et al., 1998). O amônio não pode ficar livre nas células nem nos tecidos porque sofre uma reação com grupos OH⁻ da água convertendo-se em amônia, que é tóxica para a planta mesmo em baixas concentrações. A amônia pode provocar o desacoplamento dos processos de fosforilação. Como as membranas mitocondriais e cloroplásticas são sumamente permeáveis à amônia, ela deve ser rapidamente assimilada em compostos orgânicos não tóxicos, e precisa de um rigoroso controle da assimilação. A assimilação da amônia absorvida pelas raízes precisa de uma quantidade grande de esqueletos de carbono, principalmente oxoglutarato, elemento do ciclo de Krebs na respiração. A NiR é regulada pela luz, mas os seus efeitos não são tão marcados como no caso da NR (EC 1.6.6.1). No entanto, a glutamina não tem efeito na NiR (Ogawa et al., 1999) e ainda não se sabe se o nitrato ou o nitrito é a molécula ativa na regulação da transcrição (Lea, 1993).

Existem muitos mutantes para a NR (EC 1.6.6.1), mas os mutantes para a NiR são quase inexistentes – possivelmente, pela natureza tóxica do nitrito: a falta desta enzima provocaria a acumulação deste composto, com efeitos seriamente deletérios ao metabolismo (Lea, 1993); (Crawford, 1995).

Estudos usando isótopos de nitrogênio marcados radiativamente, inibidores de enzimas e mutantes do metabolismo do nitrogênio indicam que a porta de entrada da amônia nos aminoácidos, em plantas superiores, acontece pela ação conjunta da glutamina sintase e da glutamato sintase, também denominadas 2-oxoglutarato aminotransferase (GOGAT) (Temple et al., 1998); (Lea, 1993); (Fuentes et al., 2001).

Em plantas superiores, GOGAT pode ser encontrada em duas isoformas – NADH-GOGAT e GOGAT dependente de ferredoxina – que diferem em massa, cinética, especificidade de anticorpos e funções metabólicas. A Fd-GOGAT, em combinação com as isoformas de glutamina sintetase localizadas nos plastídios, catalisa a assimilação do amônio (NH₄⁺) derivado da assimilação do NO₃⁻ dependente da luz e do NH₄⁺ gerado durante a fotorrespiração (Temple et al., 1998).

A reação catalisada pela glutamina sintetase (GS) envolve a aminação dependente de ATP do glutamato, para produzir glutamina (Fuentes et al., 2001). O glutamato apresenta um esqueleto de carbono para gerar glutamina. GOGAT então catalisa a transferência do grupo amino da glutamina para um α -cetoglutarato (oxoglutarato), proveniente do ciclo de Krebs, produzindo 2 moléculas de glutamato. Uma das moléculas de glutamato é necessária para a manutenção da assimilação da amônia, enquanto a outra molécula poderá ser exportada. Estas duas reações são denominadas coletivamente como: ciclo **glutamina sintase/GOGAT** (Crawford & Glass 1998); (Temple et al., 1998).

2.9 Interação do metabolismo do carbono e o metabolismo do nitrogênio

O glutamato produzido pode ser usado para repor o conjunto de glutamato ou pode doar o seu grupo amino para outras amidas como a asparagina; para ureídeos como a ornitina, para outros aminoácidos ou outros compostos contendo nitrogênio, utilizando os compostos intermediários da fotossíntese, glicólise ou ciclo de Krebs. Um importante destino de glutamato e glutamina é a síntese de aspartato e asparagina, reação catalisada pela aspartato aminotransferase e a asparagina sintetase. Estes aminoácidos são importantes compostos nitrogenados de transporte (Temple et al., 1998); (Lea, 1993). Existe evidência de que as aminotransferases são promíscuas, utilizando uma ampla faixa de substratos, aminoácidos e oxoácidos. Das aminotransferases, a aspartato-aminotransferase possui múltiplas isoformas em plantas superiores e há evidências de que o citoplasma, mitocôndrias, cloroplastos e peroxisomas contêm as suas próprias isoenzimas. Estas podem estar envolvidas no transporte de poder redutor desde as organelas, como os cloroplastos e mitocôndrias, até o citoplasma (Lea, 1993).

A glutamina sintetase e a glutamato sintetase têm a função de reassimilar a amônia derivada da fotorrespiração em plantas C_3 (Temple et al., 1998). Para a assimilação da amônia, como foi exposto, precisa-se de ATP, NADPH e ácidos orgânicos que são produzidos no metabolismo do carbono. Deste modo, qualquer alteração que seja produzida neste metabolismo terá conseqüências na assimilação do nitrogênio. NADPH e ATP são gerados nos fotossistemas e podem ser utilizados na síntese de muitos

compostos, desde aminoácidos até lipídeos. Evidências destas interações são as seguintes (Lea, 1993) (figura 5):

Figura 5- Esquema apresentando as relações entre o metabolismo do carbono e o nitrogênio. Imagem extraída do livro “Plant Biochemistry and Molecular Biology” (Lea & Leegood, 1993)

1. Em plantas no escuro, com fontes de nitrogênio limitadas, a adição de nitrogênio incrementa a liberação de CO_2 respiratório, para a assimilação do nitrogênio inorgânico (Huppe & Turpin 1994);

2. A estimulação do crescimento em elevadas concentrações de CO_2 é diminuída quando há deficiência em nutrientes nitrogenados (Foyer & Ferrario 1994).

Sob alto CO_2 , a atividade da NR (EC 1.6.6.1) é diminuída; este efeito só é evitado quando a planta é alimentada com concentrações elevadas de nitrato (Geiger et al., 1999). O decréscimo acentuado na atividade da NR (EC 1.6.6.1) produz grande efeito na fotossíntese e na distribuição do carbono na folha (Foyer & Ferrario 1994);

3. O processo de aclimação da fotossíntese a elevadas concentrações de CO_2 não acontece quando a fonte de nitrogênio é adequada, e o crescimento é estimulado marcadamente (Stitt & Krapp 1999);

4. A assimilação do nitrato utiliza redutores cloroplásticos e produtos da fotossíntese recém sintetizados para obter esqueletos de carbono que serão utilizados na biossíntese de aminoácidos (Champigny, 1995). No entanto, a presença de nitrato incrementa a fosforilação da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPCase) e da sacarose fosfato sintase (SPS), ativando a PEPCase e inibindo a SPS. Acredita-se que isto permita o direcionamento do fluxo de carbono da síntese de sacarose para a síntese de aminoácidos (Quy et al., 1991); (Quy et al., 1991); (Foyer et al., 1994); (Scheible et al., 1997);

5. As baixas concentrações de nitrato aumentam a relação amido/açúcar. Elevadas concentrações de CO_2 aumentam este efeito (Geiger et al., 1999);

6. O nitrito (mas não o nitrato) pode ser reduzido nos cloroplasto numa reação dependente da luz para produzir glutamina e glutamato (Tischner, 2000);

7. Nitrito redutase, glutamina sintase e glutamato sintase estão localizadas dentro do cloroplasto (Crawford, 1995);

8. A fotorrespiração envolve a síntese de glicina pela transaminação do glioxalato. A amônia liberada da conversão da glicina para serina é reassimilada nos cloroplastos numa taxa 10 vezes superior à da assimilação de nitrato (Temple et al., 1998);

9. Em plantas C_4 , aspartato, alanina e glutamato são extensivamente utilizados no transporte de metabólitos entre células durante a fotossíntese destas plantas (Lea, 1993);

10. A aminotransferase aspartato 2-oxoglutarato está envolvida na transferência de poder redutor produzido nos cloroplastos (Temple et al., 1998);

11. Os cloroplastos podem transformar aspartato em lisina, treonina, isoleucina e homocisteína, em reações dependentes de luz; têm também a capacidade de transformar piruvato em leucina, isoleucina e valina para a síntese de aminoácidos (Lea, 1993);

12. A maior parte das enzimas necessárias para a síntese de aminoácidos essenciais são encontradas nos cloroplastos (lisina, treonina, isoleucina, homocisteína, leucina, valina, triptofano, fenilalanina e tirosina) e algumas das enzimas necessárias para a síntese de arginina e prolina também estão localizadas no cloroplasto (Taiz & Zeiger, 1998);(Lea, 1993)

13. As enzimas encarregadas em reduzir enxofre para a cisteína encontram-se nos cloroplastos (Lea, 1993);

14. Proteínas como a subunidade maior da Rubisco, subunidades da ATP sintase e certos citocromos são codificadas pelo DNA dos cloroplastos, e as reações de síntese destes são dependentes da luz (Lea, 1993);

15. O 3-fosfoglicerato do ciclo de Calvin dá origem à serina, e esta gera cisteína e glicina. O piruvato da glicólise forma triptofano, fenilalanina, tirosina, alanina, valina e leucina. O oxalacetato do ciclo de Krebs forma aspartato que pode, por sua vez, gerar asparagina, metionina, isoleucina e lisina (Azevedo et al., 1997);

16. Uma substancial parcela do transporte fotossintético e respiratório de elétrons gera redutores para a assimilação de nitrato (Bloom et al., 1989).

A regulação destes dois processos é necessária para prevenir a competição potencial entre os metabolismos de carbono e nitrogênio e permitir a distribuição adequada de poder redutor e precursores orgânicos nas vias biossintéticas apropriadas (Champigny, 1995).

As enzimas reguladoras dos metabolismos do carbono e nitrogênio – fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), nitrato redutase (NR, EC 1.6.6.1), e sacarose fosfato sintase (SPS) – são consideradas pontos de interseção importantes entre os metabolismos de nitrogênio e carbono (Champigny, 1995). A PEPC é uma enzima chave no direcionamento do oxalacetato para o ciclo de ácidos tricarboxílicos (CAT) ou para a

síntese de aspartato. Já o fluxo de carbono deve ser direcionado para a síntese de açúcares ou amido, ou para a formação de aminoácidos (Tischner, 2000). É provável que a relação inversa entre PEPC e SPS seja o evento primário na adaptação do metabolismo do carbono às mudanças no fornecimento de nitrogênio (Champigny, 1995). No entanto, como NR (EC 1.6.6.1) e PEPC podem ser reguladas no mesmo sentido? Isto parece ser feito por meio de distintas cascatas de transdução de sinais (Tischner, 2000).

A assimilação de nitrato precisa de 8 elétrons para reduzir NO_3^- para NH_4^+ ; depois da assimilação do carbono, esta é a reação que mais consome energia no metabolismo de plantas. Aproximadamente 26% dos elétrons produzidos na fotossíntese e 25% da respiração mitocondrial são utilizados para a redução do nitrato (Bloom et al., 1989). Assim, na presença de luz, a evolução do oxigênio pode ser mais rápida quando NO_3^- é assimilado pelas folhas (Champigny, 1995).

A partir do que foi exposto, as linhagens TR-1 e TR-2 transformadas com o gene da nitrato redutase apresentam-se como um excelente modelo de estudo para decifrar a intrincada e complexa rede regulatória que apresentam o metabolismo do carbono e o nitrogênio.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

O material vegetal constitui-se de 2 linhagens de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Petit havana SR 1) (TR-1 e TR-2) transformadas com um gene quimérico *Lhcb1*2* de ervilha, sob o controle do promotor constitutivo 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV).

Para estudar as interações do metabolismo do carbono e nitrogênio nessas plantas, foi introduzido o gene quimérico *nia2* que codifica a enzima nitrato redutase (NR, EC 1.6.6.1), sob controle do promotor MAS. A transformação foi feita via *Agrobacterium*, por infecção de discos folhares, de acordo com a metodologia de Horsch et al. (1986).

3.2 Material biológico

3.2.1 Plasmídio que contem o gene quimérico da nitrato redutase (NR)

Construção de um novo gene quimérico da NR: Uma construção contendo o promotor da manopina sintase (MAS) de *Agrobacterium tumefaciens* [Ni et al., 1995], ligado em *cis* com o gene quimérico *nia 2* da NR (EC 1.6.6.1) foi clonada ao vetor binário pBiB-Hygro (Becker, 1990). Esse vetor contém o gene *hpt* da higromicina fosfotransferase, o que permite a seleção das plantas (transformantes putativos) pela resistência à higromicina. As digestões com enzimas de restrições, eletroforeses, eluição de fragmentos, ligação dos mesmos e obtenção de clones transformantes foram feitas de acordo com os protocolos de Sambrook et al. (1989). Para se ter essa construção disponível em *E. Coli*, o vetor pBiB Hygro/MAS/NR foi inserido em células competentes de *E. coli* DH5 α , por transformação, via eletroporação [Lilley, 1993]. Os clones foram selecionados em meio LB (1% Bacto triptona, 0.5% Bacto extrato de

levedura, 0.5% NaCl) contendo 50µg/ml de canamicina, para seleção dos clones transformantes. O DNA plasmidial foi extraído usando-se o kit da Qiagen (cat #10043), segundo recomendações do fabricante. A construção do mapa de clivagem e caracterização dos clones foi feita por digestões simples ou combinadas (Sambrook J. et al., 1989). As enzimas de restrição EcoRI, HindIII e BamHI foram utilizadas conforme recomendação do fabricante (Gibco, BRL).

3.2.2 Transformação da linhagem de *Agrobacterium*:

O plasmídio recombinante pBiBHygro/MAS/NR contendo a construção foi utilizado para a transformação da cepa de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa LBA4404) por eletroporação. Os clones recombinantes foram selecionados em meio seletivo YEP (1% Bacto peptona, 1% Bacto extrato de levedura, 0.5% NaCl), contendo 50µg/ml de canamicina.

3.2.3 Transformação das plantas de tabaco:

Um clone de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa LBA4404) recombinante foi utilizado para a transformação das duas linhagens de tabaco TR1 e TR2, por infecção de discos foliares (Horsch *et. al.*, 1986). Plantas transgênicas foram selecionadas com base na resistência à higromicina.

3.2.4 Meio de cultura para germinação de plantas (Murashige T. & Skoog F. 1962)

Folhas jovens de plantas cultivadas em câmara de crescimento, sob condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade, foram colhidas, lavadas e rapidamente (10 segundos) imersas em etanol 70%, antes de serem esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio (1.0%), contendo Tween 20 (0.05%), por 10 minutos, com agitação. Após esterilização, as folhas foram lavadas 6 vezes com água estéril. Discos foliares de 1 cm de diâmetro foram cortados sobre filtro de papel estéril, transferidos para placas de Petri, contendo 10 ml da cultura de *Agrobacterium*, em fase log (DO_{600nm}= 0.7) e incubados por 5 min com leve agitação manual. Os discos foliares inoculados, foram colocados em placas de Petri contendo meio de cultura (MS

acrescido de B5 vitaminas, 1mg/l BAP, 0.1mg/l NAA (Murashige T. & Skoog F. 1962); (Deroles et al., 1996), por 48h. Após esse período, os discos foram transferidos para esse mesmo meio contendo 500mg/l de carbenicilina, que inibe o desenvolvimento da *Agrobacterium*, e 25mg/l de Higromicina (Wang & Waterhouse, 1997), para seleção dos brotos transformantes. Após 4 semanas, os brotos que regeneraram dos *callus* formados nesse meio seletivo foram transferidos para meio MS contendo 500mg/l de carbenicilina e 50 mg/ml de higromicina, mas sem hormônios, de forma a se estimular o enraizamento. Os brotos que enraizaram foram transferidos para vasos, e mantidos em câmara de crescimento, sob condições controladas de umidade, luminosidade e temperatura.

As sementes, uma vez esterilizadas, eram semeadas em placas de Petri com meio MS. O meio MS possui a seguinte composição:

Macronutrientes:

- NH_4NO_3 (1,65 g/l)
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,44 g/l)
- KNO_3 (1,99 g/l)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,37 g/l)
- KH_2PO_4 (0,17 g/l)
- Fe-EDTA contendo $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,0413 g/l) e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.0278 g/l);

Micronutrientes:

Solução estoque 1000 vezes contendo

- H_3BO_3 (0.62 g/ml)
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1.69 g/ml)
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.86 g/ml)

Constituintes orgânicos como vitaminas:

Solução estoque 10000 vezes contendo

- ácido nicotínico (0.1 g/10ml)

- piroxidina-HCl (0.05 g/10ml)
- tiamina-HCl (0.01 g/10ml)
- D-Ca-pantotenato (0.01 g/10ml)

A quantidade utilizada deste estoque foi 100 µl/l

Outros constituintes:

- agar (1% p/v)
- antibiótico higromicina: 50µg/l (somente para os transformados com o gene *nia-2*)

3.2.5 Esterilização de sementes (Mathis & Hinchey, 1994)

A esterilização foi feita por imersão rápida (15 segundos) em etanol 70% (v/v), seguida de hipoclorito de sódio, 1% (v/v), por 15 segundos. Posteriormente, foram feitas lavagens sucessivas (seis vezes) com água estéril. Deixou-se secar as sementes em papel de filtro, armazenadas em placas de Petri, de forma asséptica em lugar prontas para semeadura.

3.2.6 Seleção dos transformantes de tabaco

Cinquenta e quatro plantas provenientes de eventos independentes de transformação foram selecionadas em higromicina: 29 plantas da linhagem TR1, denominadas: TR1 1, TR1 2,TR2 9 e 29 plantas da linhagem TR2, também denominadas: TR2 1, TR2 2,TR2 29. As plantas TR1 4 e TR1 26 não se desenvolveram bem após o transplante e as plantas TR1 28, TR1 29 e TR2 18 não produziram sementes. Dessa forma ficamos com um total de 49 plantas para serem analisadas por PCR.

3.2.7 Extração de DNA

A extração de DNA genômico total das plantas foi feito pelo método CTAB (Doyle & Doyle, 1987).

Discos folhares de 5 cm² (aproximadamente 100mg) foram maceradas com auxílio de nitrogênio líquido, e transferidos para tubos *eppendorf* contendo 700µl de tampão de extração contendo β-mercaptoetanol, aquecido à temperatura de 55°C e mantido neste por 20 minutos com homogeneizações periódicas. As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm, a temperatura ambiente por 7 minutos. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo e a essa adicionou-se 200µl de tampão de extração (sem β-mercaptoetanol) e um 1 volume de CIA (aproximadamente 600µl) (clorofórmio: álcool isoamílico na proporção de 24:1). A fase aquosa foi transferida novamente para um tubo novo. Esta etapa foi repetida por mais duas vezes. Adicionou-se então 1 volume de isopropanol (aproximadamente 600µl) à fase aquosa final para a precipitação do DNA. As amostras foram homogeneizadas suavemente e centrifugar a 14 000 rpm, a 4°C, por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e o precipitado lavado com etanol 70%. Após centrifugação por 5 minutos, a 4° C, a 14000 rpm, o sobrenadante, foi descartado e o precipitado resultante foi secado sobre papel absorvente, por volta de 30 minutos, até uma evaporação completa do etanol, antes da ressuspensão do mesmo em tampão TE, contendo RNAase (10µl/ml). As amostras foram mantidas à 37°C, por uma hora antes de serem transferidas a 4° C, para total solubilização do precipitado.

Tampão de extração:

NaCl (1,4 M), Tris-HCl (100 mM) pH=8, EDTA (20 mM) pH=8, polivinil pirrolidona (PVP) (1% p/v), CTAB (2%), β-mercaptoetanol (0,5%), água qsq.

Tampão TE:

Tris-HCl (10 mM) pH=8, EDTA (1 mM) pH=8.

Solução estoque de RNAse (1mg/ml): A solução foi fervida por 30 minutos, para eliminação de traços de DNase congelada e armazenada a -20°C. Utilizou-se 1µl da solução estoque para cada 100µl de amostra (concentração final: 10µl/ml).

3.3 Análise dos transformantes por PCR

Discos foliares de 5 cm de diâmetro (0.1g) das plantas (transformantes putativos) que enraizaram em higromicina, foram utilizados para a extração do DNA genômico para análise das plantas por PCR, segundo metodologia descrita por Edwards et.al. (1991) e Larrick (1992). A extração de DNA foi realizada, utilizando-se CTAB (Doyle & Doyle 1987) descrita posteriormente. “Primers” específicos, para se detectar o transgene *nia-2*, foram utilizados; a descrição detalhada das seqüências de nucleotídeos (de 5' para 3') e os respectivos produtos de amplificação estão apresentados na Tabela 1. Os sítios de anelamento dos conjuntos de “primers” utilizados nas reações, estão esquematizados na Figura 6. As condições: 94°C por 2 minutos, seguidos de 30 ciclos de 94°C por 45 seg., 50 °C por 30 seg. e 72 °C por 2 minutos, foram utilizadas para a amplificação. 10 µl de cada reação de PCR, foram analisados em gel de 1.0% de agarose e as bandas visualizadas por coloração com brometo de etídio. (Figuras 13 e 14).

Tabela 1. Conjuntos de “primers” utilizados nas reações de PCR e seus respectivos produtos de amplificação (pares de bases), para os transformantes de tabaco.

Reação de PCR Conjunto de “primers”	Produto de amplificação Transgene
PCR1 (primer 3 + primer 6)	1000
3: CGCGGATCCAATCTATGGCGGCATCTGTC	
6: TGATGATATACTCTGGCTTGT	
PCR 2 (primer 7 + primer 9)	500
7: CCCTCAATACTCAACCCGAGA	
9: GAGTCAGAGGTGTAACCACT

Conjunto de "primers"		Produtos de amplificação (pb)
Primers (3 + 6):	- cDNA transgene	1kb
	- Genes endógenos	1.5 kb <i>nia2</i> e 1.3 kb <i>nia1</i>
Primers (7 + 9):	- cDNA transgene	500pb
	- Genes endógenos	1.3 kb <i>nia2</i> e 1.15kb <i>nia1</i>

Figura 6- Sítios de anelamento dos conjuntos de "primers" utilizados para as reações de PCR, para os transformantes de tabaco (Vaucheret et al., 1989)

As sementes resultantes da autofecundação dessas plantas foram coletadas, e analisadas quanto a segregação da marca de resistência à higromicina, em meio MS seletivo. Como a resistência à higromicina é dominante, se conseguiu rapidamente analisar a segregação do gene quimérico *nia-2* na progênie, uma vez que, normalmente a transformação via *Agrobacterium*, resulta em segregação mendeliana do transgene (Budar et al., 1986). Em base à segregação dos indivíduos, respeito a resistência para higromicina selecionou-se transformantes, a segregação dos mesmo era 3:1 resistentes: sensível. Os transformantes foram os seguintes: TR1 10, TR1 11, TR2 9, TR2 12, TR2 16, TR2 19 (figuras 7 e 8). As sementes coletadas dos controles e transformantes selecionados foram esterilizadas e semeadas em meio de cultura MS (Murashige T. & Skoog F. 1962) e posteriormente transferidas para vaso contendo uma mistura (1:1) de vermiculita e substrato orgânico (Plantmax) e mantidos em câmaras de crescimento (Convicon P6W36) com temperatura de 23°C, umidade e luminosidade ($250\mu\text{Mm}^{-2}\text{s}^{-1}$) controladas. As plantas foram suplementadas diariamente com solução nutritiva de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950). Após 5 ciclos de autofecundação, o caráter resistência não segregava mais. Estas plantas foram consideradas homozigotos para o inserto, e com estas é que se realizaram os estudos metabólicos (figuras 9 e 10).

Figura 7- Fotografia dos indivíduos transformados e selecionados pertencentes a linhagem TR1.

Figura 8- Fotografia dos indivíduos transformados e selecionados pertencentes a linhagem TR2.

Figura 9- Fotografia dos indivíduos transformados e levados a vaso pertencentes a linhagem TR1.

Figura 10- Fotografia dos indivíduos transformados e levados a vaso pertencentes a linhagem TR2.

Figura 11- Estrutura do novo gene quimérico da NR inserido no vetor binário pBiB-Hygro.

■: sequência 3' não traduzida com os sinais de poliadenilação. A seta indica o início da transcrição. BD e BE são as bordas, direita e esquerda, do T-DNA do vetor binário.

Tamanho dos fragmentos de restrição do gene NR: HindIII/BamHI = 500pb; BamHI/EcoRI = 228pb; EcoRI/EcoRI = 283pb; EcoRI/BamHI = 275 pb; BamHI/ HindIII = 580 pb; HindIII/Eco RI = 802 pb; EcoRI/SalI = 2.1Kb.

3.4 "Southern blot"

DNA genômico (10µg) foi digerido com um excesso (50 unidades) da enzima de restrição HindIII (Gibco BRL) de acordo com o fabricante, a 37°C, por 16 horas. Os fragmentos foram separados em gel de agarose (1 %) em tampão TBE, por 15 horas. Após a corrida o gel foi fotografado antes de ser depurinado com HCl (0,25 N) por 10 minutos e desnaturado numa solução de NaOH (0,5 M) e NaCl (1,5M) por 30 minutos, seguida da neutralização com 2 lavagens de uma solução de Tris-HCl (1,0 M) pH=7,5 e

NaCl (1,5 M). A depurinação, desnaturação e neutralização foram intercaladas por enxágües em água “milli-Q” estéril.

A transferência do DNA para a membrana de nylon (Hybond N⁺, Amersham Pharmacia) foi feita por capilaridade por 16 horas, usando-se a solução de transferência 20x SSC, de acordo com Sambrook (1989).

O DNA foi fixado à membrana, por temperatura (80°C) por 2 horas.

Solução 20xSSC:

0,3M citrato de sódio (citrato Na₃) e 3M de cloreto de sódio (ClNa).

3.4.1 Preparação e Marcação da sonda

O fragmento de 1,6Kb correspondente ao cDNA da nitrato redutase, foi obtido a partir da digestão do plasmídeo pBib-Higro-NR com a enzima de restrição EcoRI (Gibco BRL) foi utilizado como sonda para a hibridação da membrana na análise de “Southern blot” (figura 12).

Figura 12- Mapa de clivagem do vetor pBib/Hygro/MAS/NR. Tamanho dos fragmentos em pares de bases

A sonda utilizada foi marcada com fluoresceína com o auxílio do kit (“Gene Image Ranfom Prime Labelling Module”) da Amersham Pharmacia de acordo com as normas do fabricante. A hibridação foi à 60°C, por 16 horas, com agitação lenta (60 rpm) seguida de duas lavagens de adstringência (1x SSC, e 0,5x SSC 0,1 % (w/v) SDS).

3.4.2 Detecção dos pontos de hibridação

A detecção dos pontos de hibridação, foi feita utilizando-se o kit “CDP-star-Gene Image Detection Module”, da Amersham Pharmacia, de forma indireta, via anticorpo. Neste caso, a sensibilização do Raio X ocorre como consequência da reação luminosa, resultante da oxidação do luminol (CDP-star) quando está em contato com a membrana hibridizada.

3.5 Análise de fotossíntese

O aparelho utilizado para avaliação da fotossíntese foi o: LI-6400, um sistema de troca de gases, que analisa a fotossíntese medindo a taxa de troca de CO₂ com respeito ao tempo numa folha mantida dentro de uma câmara de 2cm x 3cm, com um sensor/IRGA, portátil, com temperatura controlada.

3.6 Determinação da atividade da enzima nitrato redutase

Discos foliares (10 cm²) coletados de plantas cultivadas em câmara de crescimento com umidade e temperatura controladas (Convicon PGW 36) foram utilizados para a extração da nitrato redutase. As plantas foram cultivadas em baixa intensidade luminosa (250 µmol m⁻².s⁻¹). As amostras tomadas dessas plantas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido após a coleta. Cada disco foliar foi macerado em almofariz, com nitrogênio líquido. O tampão de extração (1,2 ml), contendo, Hepes (50 mM) pH=7,5, FAD (10 µM), leupeptina (1 µM), β-mercaptoetanol (2mM) e EDTA (5 mM), foi adicionado à amostra, previamente macerada e rapidamente homogeneizado e mantido em gelo. O homogenado foi transferido para tubo *ependorf* e centrifugado por 5 min a 12000 g e 4°C. A atividade *in vivo* da enzima (forma fosforilada) foi determinada na presença de Mg⁺² e a atividade máxima (forma desfosforilada) foi determinada adicionando-se EDTA ao tampão de reação. A reação foi levada a cabo por 5 minutos à temperatura de 30°C, iniciando-se a mesma com a adição de 50µl do extrato ao tampão: Hepes (50 mM) pH=7,5, KNO₃ (10 mM), NADH (0,17 mM) e MgCl₂ (10 mM) para a atividade *in vivo*, ou EDTA (5mM) para a atividade

máxima. A reação foi finalizada pela adição de 100 µl de sulfanilamida (1% w/v em HCl 3N) e em seguida, 100 µl de N-naftiletilenodiamino dehidroclórico (0,02 % w/v). A amostra foi deixada no escuro por pelo menos 15 min, centrifugada a 2000 g e a quantidade de NO₂ formada foi determinada por espectrofotometria na absorbância de $\lambda=540$ nm.

O estado de ativação da NR (EC 1.6.6.1) é definido como a atividade da enzima na presença de 10 mM de MgCl₂ dividida pela atividade na presença de 5 mM de EDTA (expresso em porcentagem).

3.7 Determinação da clorofila nas amostras de NR

Do extrato foliar usado para a determinação da enzima, retiramos 50 µl antes das centrifugações, para determinação da clorofila. A esse volume, adicionamos 950 µl de acetona 80% (v/v) tamponada num pH=8, em carbonato de sódio, e mantivemos em ambiente escuro por 2 horas até conseguir uma extração boa da clorofila. Após centrifugação a 14000 g, por 15 minutos, descarta-se o precipitado. A quantificação foi determinada por espectrofotometria de acordo com o método de Porra *et al.* (1989). As leituras de absorbância foram feitas a 663,6 e 646,6 nm. O branco deste ensaio foi acetona tamponada (80%) (Porra et al., 1989).

A fórmula utilizada para a quantificação da clorofila foi:

$$\text{Clorofila total } (\mu\text{g/ml}) = [(7,93 \times A_{663,6}) + (19,53 \times A_{646,6})]$$

3.8 Determinação e quantificação de aminoácidos

Para a extração de aminoácidos foi utilizado o protocolo de extração (Bieleski & Turner 1966) com algumas modificações. O tecido vegetal foi liofilizado, pesado ou medido e posteriormente foi macerado em nitrogênio líquido. O material foi posto em contato, para a extração, com uma solução de metanol, clorofórmio e água (MCW numa proporção 15:5:3 respectivamente), numa proporção de 20 ml/g de tecido vegetal. O extrato foi incubado por 3 dias e posteriormente foi centrifugado a 2500 rpm, 20

minutos, em temperatura ambiente. Os aminoácidos permanecem solúveis no sobrenadante, o mesmo é coletado e medido. Adicionando 1 ml de clorofórmio e 1,5 ml de água por cada 4 ml de sobrenadante. Posteriormente foi feita uma nova centrifugação a 14000 rpm separando-se esta em duas fases, os aminoácidos permanecem solubilizados na parte superior aquosa. A parte superior aquosa foi levada para outro tubo e incubada a 38°C por duas horas. Posteriormente foi congelado em nitrogênio líquido, liofilizado, ressuspendido num volume conhecido (500 µl) e filtrada em filtro millipore de 0,22 µm.

A quantificação dos aminoácidos utilizou de um padrão de concentração conhecida: "*Amino Acids Standar*" da Sigma. Os aminoácidos foram separados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), num equipamento AKTA da Amersham Pharmacia Biotech, por meio de uma coluna de fase reversa C18 Supercap ODS-2 (4 x 250 mm) Supelco.

As condições da cromatografia foram: temperatura ambiente, fluxo de 0,8 ml.min⁻¹, o eluente foi tampão fosfato (pH=7,25): NaOAc (50 mM), Na₂HPO₄ (50 mM), 20 ml de tetrahydrofurano, 20 ml metanol, este tampão foi degaseificado com ultra-som, bomba de vácuo e filtrado com filtro para solventes orgânicos de 0,45 µm. A solução para formar o gradiente polar de arraste, dos aminoácidos, foi metanol (65%) preparado com água estéril.

Os aminoácidos foram derivatizados com *o*-phthaldialdeído (OPA), para serem detectados mediante fluorescência. Utilizou-se um fluorômetro da Shimatzu, modelo RF-551, com um comprimento de onda de excitação de 250 nm ($E_{ex}=250nm$) e o comprimento da onda da emissão foi de 480 nm ($E_{em}=480nm$).

O reagente OPA deve ser preparado diariamente das seguintes soluções estoque: ácido bórico 2,4% (p/v) pH=9,5 (pH ajustado com NaOH), *o*-phthaldialdeído 5% (p/v) em metanol, misturando estes dois 1 ml da solução de OPA em metanol e 6,5 ml da solução de ácido bórico. Desta última solução foi pego 2,5 ml nos que foi adicionado 20µl de β-mercaptoetanol para formar o reagente OPA.

A amostra a ser quantificada é composta por 20 µl da amostra ou o padrão, conforme o caso, e 60 µl do reagente OPA.

3.9 Delineamento estatístico

O delineamento estatístico utilizado foi o delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos a análises de variância e correlação. O teste das médias que se utilizou foi o teste de Tukey. As análises foram feitas com o *software* Statistical Analysis System (SAS).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise de transformantes por PCR específico

O primeiro passo foi a confirmação primária dos transformados resistentes à higromicina, pertencentes às linhagens transgênicas, TR1 e TR2, pela técnica de PCR. Na análise de PCR, usou-se dois pares de “primers”. As figuras 13 e 14 mostram os resultados dos PCRs.

Figura 13: Separação dos produtos da reação de PCR seguidos de amplificação para o conjunto de “primers” (3 + 6), dos transformantes da linhagem TR1. A ordem das amostras de 1 a 25 é: Padrão de peso molecular (1kb DNA, Gibco BRL), amostra do tampão (“master mix”) usado na reação (sem DNA), controle negativo TR1, controle positivo um transgênico NR (TR NR), TR1

1, TR1 2, TR1 5, TR1 6, TR1 7, TR1 8, TR1 9, TR1 10, TR1 11, TR1 12, TR1 14, TR1 15, TR1 16, TR1 17, TR1 18, TR1 20, TR1 21, TR1 23, TR1 24, TR1 25, TR1 27. O produto de PCR esperado (1 kb), correspondente ao transgene *nia2* está indicado com a seta.

Figura 14: Separação dos produtos da reação de PCR seguidos de amplificação para o conjunto de “primers” (3 +6), dos transformantes da linhagem TR-2. A ordem das amostras de 1 a 18 é: Padrão de peso molecular (1kb DNA, Gibco BRL), amostra do tampão (“master mix”) usado na reação (sem DNA), controle negativo (TR-2), controle positivo (NR), TR2 4, TR2 6, TR2 8, TR2 9, TR2 11, TR2 12, TR2 13, TR2 15, TR2 16, TR2 19, TR2 20, TR2 21, TR2 24, TR2 26. O produto de PCR esperado (1 kb), correspondente ao transgene *nia2* está indicado com a seta.

Obteve-se um total de 14 indivíduos para a linhagem TR2 (TR2 4, TR2 6, TR2 8, TR2 9, TR2 11, TR2 12, TR2 13, TR2 15, TR2 16, TR2 19, TR2 20, TR2 21, TR2 24, TR2 26) e 21 indivíduos para a linhagem TR1 (TR1 1, TR1 2, TR1 5, TR1 6,

TR1 7, TR1 8, TR1 9, TR1 10, TR1 11, TR1 12, TR1 14, TR1 15, TR1 16, TR1 17, TR1 18, TR1 20, TR1 21, TR1 23, TR1 24, TR1 25, TR1 27).

Estes indivíduos, foram analisados posteriormente mediante testes de higromicina e selecionaram-se 6 indivíduos: dois, TR1 10 e TR1 11, por parte da linhagem TR1, e quatro, TR2 9, TR2 12, TR2 16 e TR2 19, por parte da linhagem TR2. Estes indivíduos segregavam a característica de resistência ao antibiótico higromicina, na proporção 3:1, em proporções mendelianas.

Depois de 5 gerações de autofecundação, os indivíduos tinham fixado o inserto posto que não segregavam a sensibilidade para a higromicina. Considerou-se estes indivíduos como homozigotos para o DNA exógeno.

4.2 Análise de transformação pela técnica de Southern blot

A confirmação dos eventos de transformação foi feita mediante a técnica de Southern blot. Revelou um padrão de bandas diferencial, característicos para cada indivíduo, isto é característico de eventos de transformação independentes, como se pode ver na figura 15 e 16.

Figura 15- Southern blot de indivíduos pertencentes às linhagem TR1 transformados com o gene *nia-2*, da nitrato redutase.

4.2.1 Linhagem TR1

O transgênico TR1 10 apresenta um padrão de bandas diferencial, com respeito ao controle na faixa dos 12Kb e 9Kb, apresentando uma banda nas proximidades da banda caraterística das 11Kb.

O transgênico TR1 11 claramente apresenta uma banda inferior à banda caraterística das 11Kb, de intensidade forte, sendo, provável a existência de mais uma cópia do inserto, dispostas em *tandem*.

Figura 16- Southern blot de indivíduos pertencentes às linhagem TR2 transformados com o gene *nia-2*, da nitrato redutase.

4.2.2 Linhagem TR2

O transgênico TR2 9 apresenta uma banda diferencial de aproximadamente 4,36Kb. O transgênico TR2 12 apresenta uma banda diferencial, correspondente a 3.7Kb e outra um pouco maior que 4,36Kb. TR2 16 apresenta a sua banda diferencial na altura de 5,3Kb, imediatamente abaixo das duas bandas caraterísticas da linhagem TR2 e outra numa altura aproximadamente de 4,36Kb. No entanto TR2 19, por último, apresenta

uma banda diferencial por volta também dos 3,7Kb, imediatamente superior à banda característica de 3,4Kb, da linhagem TR2.

Para identificar os indivíduos transformados usou-se neste caso como sonda, uma parte do cDNA da Nitrato Redutase, para correlacionar a resistência da higromicina com novas bandas. Isto determinou múltiplas bandas, como era de esperar, porque, como sabemos, *Nicotiana tabacum*, possui duas enzima nitrato redutase que apresentam homologia entre si. Os genes são *nia-1* e *nia-2*, provenientes de *N. tomentosiformis* e *N. sylvestris*, respectivamente (Vaucheret et al., 1989a). Este híbrido sofreu no decorrer da sua evolução uma duplicação do seu material genético para estabilizar a sua meiose, gerando o autetraploide atual. Portanto, é normal, se usamos uma parte do cDNA da Nitrato Redutase, que um “southern blot” nestas condições apresente múltiplas bandas.

4.3 Estudo da Atividade da Nitrato Redutase (EC 1.6.6.1)

Os dados da atividade da NR (EC 1.6.6.1) são apresentados em $\text{U mg}^{-1} \text{ chl}$ ($\text{nmol min}^{-1} \cdot \text{mg chl}$), na presença de magnésio e EDTA. Avaliaram-se 3 parâmetros da NR (EC 1.6.6.1): a sua atividade *in vivo*, é dizer, a porção de NR que encontra-se livre da proteína 14-3-3 inibidora; a sua atividade total, a somatória das enzimas unidas à proteína inibidora mais as não unidas a este inibidor; e o percentual de ativação, o seja a proporção que está ativa (livre da proteína inibidora 14-3-3) respeito do total. As plantas selvagens, TR1, TR2, TR1 10, TR1 11, TR2 9, TR2 12, TR2 16 e TR2 19 foram cultivadas numa intensidade luminosa de $230 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. O estado de ativação é determinado pela relação que existe entre a atividade em presença de magnésio e a atividade máxima obtida em presença de EDTA. Foram realizados dois experimentos em concentrações normais (Tabela 2, 3 e 4) e baixas de concentrações de CO_2 (180ppm) (Tabela 5,6 e 7) e em uma intensidade luminosa de $230 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e $1200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, respectivamente.

Tabela 2. Atividade da enzima Nitrato Redutase, *in vivo* (+ Mg^{+2}) em U . mg^{-1} chl os dados são médias de 6 plantas, o (Pr>F) e o coeficiente de variação (CV) dos análises de variância.

GENÓTIPOS	Mg+2
TR2 12	3.83 A
TR2 16	3.38 AB
TR2 9	2.57 BC
TR1 11	2.34 CD
TR2 19	2.14 CD
TR1 10	2.03 CD
WT	1.83 CD
TR1	1.63 E
TR2	0.95E
CV	20.93
Pr >F	0.0001**

**Apresenta diferenças significativas pelo teste F entre os genótipos.

Tabela 3. Atividade máxima da enzima Nitrato Redutase (+ EDTA) em U . mg⁻¹ chl os dados são médias de 6 plantas, o (Pr>F) e o coeficiente de variação (CV) dos análises de variância.

GENÓTIPOS	EDTA
TR2 12	6.74 A
TR2 16	4.96 B
TR1 10	4.65 B
TR2 9	4.54 BD
TR1 11	4.01 BD
WT	3.23 FD
TR2 19	3.08 FD
TR1	2.75 F
TR2	2.07 F
CV	20.7
Pr >F	0.0001**

** Apresenta diferença significativas pelo teste F entre os genótipos.

Tabela 4. Porcentagem de ativação da enzima Nitrato Redutase, os dados são médias de 6 plantas, o (Pr>F) e o coeficiente de variação (CV) dos análises de variância.

GENÓTIPOS	PORCENTAGEM
TR2 19	68.74
TR2 16	68.67
TR1 11	59.37
TR1	59.04
WT	56.99
TR2 12	56.81
TR2 9	56.39
TR1 10	44.86
TR2	44.56
CV	9.69
Pr >F	0.0157**

** Apresenta diferenças significativas pelo teste F entre os genótipos.

Tabela 5. Atividade da enzima Nitrato Redutase, *in vivo* (+ Mg^{+2}) em U . mg^{-1} chl os dados são médias de 15 plantas, o (Pr>F) e o coeficiente de variação (CV) dos análises de variância em baixas concentrações de CO_2 .(180ppm) e alta luminosidade.

GENÓTIPOS	Mg^{+2}
TR2 19	1.96
WT	1.87
TR2 9	1.76
TR1	1.65
TR2 12	1.42
TR1 11	1.27
TR2 16	1.25
TR2	1.12
TR1 10	0.97
CV	39.47
Pr >F	0.0014**

**Apresenta diferenças significativas pelo teste F entre os genótipos.

Tabela 6. Atividade máxima da enzima Nitrato Redutase (+ EDTA) em U . mg⁻¹ chl os dados são médias de 15 plantas, o (Pr>F) e o coeficiente de variação (CV) dos análises de variância de plantas com baixo CO₂

GENÓTIPOS	EDTA
TR2 19	3.87
WT	3.7
TR1 11	2.99
TR1	2.95
TR2 9	2.9
TR2 12	2.88
TR2	2.324
TR2 16	2.26
TR1 10	1.96.33
CV	31.4
Pr >F	0.0001**

**Apresenta diferenças significativas pelo teste F entre os genótipos.

Tabela 7. Porcentagem de ativação da enzima Nitrato Redutase, os dados são médias de 15 plantas, o (Pr>F) e o coeficiente de variação (CV) dos análises de variância as plantas estavam submetidas a baixo CO₂ el ala luminosidade.

GENÓTIPOS	PORCENTAGEM
TR2 9	60.4
TR2 16	54.33
TR1	53.67
TR2 12	49
TR2 19	48.36
TR2	46.62
TR1 10	45.34
WT	44.11
TR1 11	39.59
CV	26.94
Pr >F	0.37

**Apresenta diferenças significativas pelo teste F entre os genótipos.

Em condições normais de CO_2 e intensidade luminosa de $230 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ os seis indivíduos transgênicos apresentam uma maior quantidade de enzima ativa, em presença de Mg^{+2} , que os controles (TR1 e TR2) e que o selvagem. O teste de Tukey não encontra diferença entre os controles e o selvagem, mas ele também pode agrupar o selvagem com um grupo de transgênicos intermédio, respeito à quantidade de enzima ativa, ficando fora deste grupo os controles. Formam parte deste grupo intermédio TR1 10, TR1 11, TR2 9 e TR2 19, e WT. Segundo o teste de médias de Tukey, o agrupamento de maior expressão é formado por TR2 12 e TR2 16. Com respeito à atividade total, somatória da enzima ativa (*in vivo*), fosforilada e unida ao inibidor, todos os transgênicos apresentam médias de atividade total maiores que os seus controles (TR1 e TR2), embora o teste de Tukey não encontre diferenças significativas entre TR219 e TR2 (encontram-se agrupados no grupo de menor atividade total). No entanto, TR2 19 também forma parte de um agrupamento intermediário, segundo o teste de Tukey, ao contrário do seu controle. Formam parte deste agrupamento TR2 19, WT, TR1 11 e TR2 9. O segundo agrupamento intermediário é formado por TR1 11, TR2 9, TR1 10 e TR2 16. Sendo o transgênico TR2 12 o único participante do agrupamento que apresenta maior atividade total para a enzima Nitrato Redutase. Por último, com respeito ao percentual de ativação, observa-se dois eventos distintos. Na linhagem TR1, o transgênico de maior expressão (TR1 10) apresenta menor porcentagem de ativação - o que é lógico, posto que esta é uma enzima altamente regulada postranscricionalmente (Kaiser & Huber1994); (Huber et al., 1996); (Morcuende et al., 1998); (Kanamaru et al., 1999). Este transgênico apresenta uma atividade seletiva (*in vivo*) não muito maior que o controle, apesar de produzir muita quantidade da enzima. TR1-11, o outro transgênico, não apresenta, segundo o teste de Tukey, diferenças significativas em relação ao seu controle. No entanto, este transgênico apresenta significativamente, mais atividade que o seu controle e mais que TR1 10. Um fator a ter em conta é que este indivíduo produz menos quantidade de enzima que o seu par TR1 10; possivelmente, por isto é que neste indivíduo a regulação não é tão rigorosa.

O segundo experimento, levado em alta luminosidade, e com baixo CO_2 , apresentou um coeficiente de variação alto para atividade seletiva, portanto tirar

conclusões baseado nestes dados seria um tanto perigoso. O que pode se ver é uma tendência de que o controle para a linhagem TR1 apresentar-se com uma média maior que os seus respectivos transgênicos. No entanto na linhagem TR2 o que melhor se comporta é o TR2 19, justamente aquele que, dos transgênicos desta linhagem, no experimento anterior apresentava menor média. Em atividade total, a linhagem TR2 continua apresentando a mesma tendência: TR2 19 e WT são os indivíduos que mais enzima têm; os que mais sentiram estas condições e que apresentaram menor quantidade de enzima foram os genótipos TR2, TR2 16 e TR1 10. Os agrupamentos não são muito claros, não se encontrando diferenças entre as médias destes indivíduos segundo o teste de Tukey. A tendência é de que os menos afetados nestas condições sejam TR2 19 e WT, e os mais afetados TR2 e TR1 10.

4.4 Determinação de aminoácidos folhares

Estes análises foram feitos em duas condições distintas. A primeira com uma intensidade de luz de $230\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, e concentrações atmosféricas de CO_2 . A segunda, com baixa concentração de CO_2 e $1200\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. A quantificação dos aminoácidos, foi expressa em nanomoles, e em relação à sua massa fresca ($\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}\text{fw}$). No entanto, com o objetivo de obter um maior controle experimental, especialmente sobre a variação do processo de extração, também foram realizados análises do porcentagem de cada aminoácido.

Tabela 8. Valores médios (nmol g⁻¹ de massa fresca), desvios dos aminoácidos, eficiente de variação e teste F e agrupamento de Tukey (5%), a partir de 3 plantas por genótipo,, submetidas à 320μmol.m⁻².s⁻¹ de intensidade luminosa e em baixas concentrações atmosférica de CO₂ (400ppm)

	ASP	GLU	ASN	SER	GLN	GLY	THR	ALA	VAL	TOT.
WT	645.7 A	402.0 A	54.51 A	323.79 A	817.1 A	8.303 A	452 A	366.12 A	13.54 A	3094.2 A
TR1	285.8 A	261.5 A	14.23 A	112.34 A	376.1 A	0 A	29.42 B	117.6 AB	1.173 A	1199 A
TR2	648.6 A	609.9 A	46.84 A	171.94 A	658.6 A	0 A	50.89 B	149.13 AB	7.027 A	2353.3 A
TR1 10	664.7 A	714.8 A	33.81 A	220.37 A	577 A	4.227 A	76.85 B	148.34 AB	6.85 A	2449.8 A
TR1 11	481.5 A	327.5 A	26.44 A	196.52 A	518.5 A	0 A	48.85 B	165.76 AB	3.94 A	1769 A
TR2 9	540.7 A	494.2 A	29.71 A	212.1 A	698.4 A	0.557 A	61.21 B	169.85 AB	1.37 A	2211 A
TR2 12	669.6 A	588.3 A	44.08 A	237.66 A	859.2 A	4.427 A	76.27 B	202.87 AB	13.2 A	2706.4 A
TR2 16	420.4 A	464.3 A	12.88 A	96.44 A	213 A	0 A	30.41 B	49.75 B	0 A	1288.8 A
TR2 19	458.3 A	540.8 A	28.97 A	163.13 A	602 A	0 A	53.38 B	204.81 AB	3.2 A	2054.9 A
CV	54.9	67.06	81.09	52.89	56.33	193.96	87.49	59.03	199.021	55.4
Pr >F	0.74	0.78	0.56	0.28	0.39	0.13	0.0002**	0.0962	0.75 A	0.58

**Apresenta diferencia significativas pelo teste F entre os genótipo.

Tabela 9. Porcentagens dos aminoácidos, coeficiente de variação e agrupamento de Tukey (ao 5%) a partir de 3 plantas por genótipo, cultivadas à 230 μ mol . m⁻² . s⁻¹ e em concentrações atmosféricas de CO₂

	ASP	GLU	ASN	SER	GLN	GLY	THR	ALA	VAL
WT	21.20 B	12.55 B	1.72 A	10.94 A	25.93 A	0.32 A	14.85 A	11.86 A	0.30 A
TR1	23.78 AB	21.71 AB	1.21 A	9.31 A	31.54 A	0 A	2.41 B	9.88 AB	0.1 A
TR2	27.18 AB	25.10 AB	1.88 A	7.83 A	28.58 A	0 A	2.22 B	6.61 AC	0.25 A
TR1 10	26.76 AB	26.27 AB	1.43 A	9.31 A	25.95 A	0.2 A	3.18 B	6.55 AC	0.25 A
TR1 11	27.65 AB	10.28 AB	1.14 A	11.21 A	29.01 A	0 A	2.44 B	9.14 AB	0.12 A
TR2 9	25.17 AB	22.45 AB	1.26 A	9.55 A	31.18 A	0.02 A	2.64 B	7.55 ABC	0.05 A
TR2 12	23.96 AB	21.90 AB	1.27 A	8.77 A	33.33 A	0.08 A	2.44 B	7.673 ABC	0.29 A
TR2 16	33.33 A	37.08 A	0.98 A	7.18 A	15.37 A	0 A	2.36 B	3.55 C	0 A
TR2 19	22.99 B	24.23 AB	1.39 A	8.37 A	30.51 A	0 A	2.67 B	9.72 AB	0.11 A
CV	13.07	28.41	34.04	23.81	23.73	196.37	31.47	19.13	149.00
Pr>F	0.017**	0.0296	0.40	0.40	0.12	0.08	0.0001**	0.0002**	0.76

**Apresenta diferencia significativas pelo teste F entre os genótipos

Tabela 10. Valores médios (nmol g⁻¹ de massa fresca), desvios dos aminoácidos, eficiente de variação e teste F e agrupamento de Tukey (5%), a partir de 5 plantas por genótipo,, submetidas à 1200µmol.m⁻².s⁻¹ de intensidade luminosa e em baixas concentrações de CO₂ (180ppm)

	ASP	GLU	ASN	SER	GLN	GLY	THR	ARG	ALA	TOTAL
WT	1015.2	3489.8 A	705.8 A	4698.5 A	6824 A	735.5 A	1128.6 A	496 A	1705.4 A	20799 A
TR1	849.3	2552.3 A	352.4 A	2737 B	5384 A	475.5 AB	315.4 B	258.2 AB	1000.3 AB	13924 ABC
TR2	657	2350.9 A	101.8 A	1283.9 B	961 B	103 B	344.3 B	1 B	385.7 B	6189 C
TR1 10	1085.7	3546.2 A	373.9 A	2030.4 B	5434 A	526.8 AB	593.3 B	197.2 AB	742.6 AB	14530 AB
TR1 11	1213.7	3470 A	676.0 A	1908.5 B	4876 A	556 AB	479.9 B	113.1 AB	625.2 B	13918 ABC
TR2 9	1249	3362.5 A	410.6 A	1744.2 B	6411 A	533.1 AB	510.8 B	138.9 AB	829.7 AB	15190 AB
TR2 12	1112.1	3122.3 A	330.6 A	1617.3 B	4239 AB	317.9 AB	423.6 B	9.4 B	500.1 B	11673 BC
TR2 16	1550.2	3908.6 A	780 A	2271.7 B	6970 A	509 AB	586.9 B	135.9 AB	783.4 AB	17496 AB
TR2 19	1664.1	4032.2 A	399.7 A	1934.7 B	5177 A	566.3 A	688.1 AB	107.9 AB	1033.8 AB	15604 AB
CV	46.87	32.34	77.7	32.37	34.25	45.33	39.24	0.34	54.80	27.45
Pr >F	0.13	0.25	0.09	0.0001**	0.0002**	0.0059**	0.0001**	0.0406**	0.0046	0.0003**

** Apresenta diferencia significativas pelo teste F entre os genótipos.

Tabela 11. Porcentagens, coeficiente de variação, teste F, dos aminoácidos, a partir de 5 plantas por genótipo, cultivadas à 1200 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa e baixo CO_2 .

	ASP	GLU	ASN	SER	GLN	GLY	THR	ARG	ALA
WT	4.99 B	16.92 C	3.33 A	23.28 A	31.98 A	3.64 A	5.42 AB	2.22 A	8.22 A
TR1	6.51 AB	19.07 BC	2.52 A	20.058 ABC	37.48 A	3.21 A	2.31 D	1.50 A	7.33 A
TR2	10.29 A	38.41 A	1.47 A	21.36 AB	14.74 B	1.70 A	5.71 A	0.02 A	6.3 A
TR1 10	7.61 AB	24 BC	2.51 A	13.48 BC	38.42 A	3.59 A	4.14 ABCD	1.25 A	5 A
TR1 11	8.61 AB	25.19 BC	4.19 A	13.61 BC	35.57 A	3.96 A	3.40 CD	0.86 A	4.61 A
TR2 9	8.402 AB	22.39 BC	2.64 A	11.42 C	41.94 A	3.49 A	3.31 CD	0.83 A	5.58 A
TR2 12	9.60 A	26.71	2.82 A	14.11 ABC	36.01 A	2.67 A	3.65 BCD	0.06 A	4.38 A
TR2 16	8.58 AB	22.12 BC	4.03 A	13.09 BC	40.78 A	3.04 A	3.24 CD	0.75 A	4.36 A
TR2 19	9.97 A	25.7 BC	2.512 A	12.76 BC	34.50 A	3.69 A	4.34 ABC	0.65 A	5.88 A
CV	25.70	18.38	48.08 A	27.70	21.61	37.74	24.54	123.0695	34.66
Pr >F	0.0075**	0.0001**	0.09 A	0.0004**	0.0001**	0.16	0.0001**	0.09	0.0413

**Apresenta diferencia significativas pelo teste F entre os genótipos.

Com relação à concentração dos aminoácidos em condições de $230\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e concentrações atmosféricas de CO_2 a única diferença significativa entre estes aminoácidos segundo o teste F, aparece para a treonina, mas o dado deve ser tomado com cuidado posto que existe muita variação entre os dados como se depreende do coeficiente de variação. Tentando minimizar esta variação, podem ser analisadas as porcentagens dos aminoácidos. Podem-se ver diferenças entre os genótipos na porcentagem de aspartato, glutamato, treonina e alanina, segundo o teste F. As diferenças entre as médias, pelo teste de Tukey mostram: em primeiro lugar, todos os transgênicos pertencentes a linhagem TR1, apresentam maior proporção de aspartato no seu conteúdo total de aminoácidos. Na linhagem TR2 não se vê diferenças pelo teste de Tukey. Só que o transgênico TR2 19 é quem tem menor proporção de aspartato, junto com o selvagem, e o que mais tem é o transgênico TR2 16. Glutamato quase apresenta o mesmo padrão: quem mas proporção de glutamato tem é o TR2 16 e que menos tem é o indivíduo selvagem. Outro aminoácido que apresenta diferença segundo o teste de Tukey é a treonina onde WT aparece como um indivíduo distinto dos demais, enquanto os outro para Tukey não apresentam diferenças respeito às médias. Este comportamento é sumamente interessante posto que a treonina é sintetizada a partir do aspartato mediante 5 reações catalisadas por 5 enzimas, onde a última destas é a treonina sintetase (Azevedo et al., 1997). No entanto os selvagens junto com o transgênico TR2 19 possuem menos proporção de aspartato. É muito provável que nestes indivíduos transgênicos simples e duplos algum passo na cascata metabólica da síntese de treonina encontra-se afetado ou também pode ser que a produção de S-adenosil-metionina, pode estar afetada, posto que a disponibilidade de este composto poderia determinar a quantidade relativa de o-fosfohomoserina que e convertida a treonina ou metionina (Azevedo et al., 1997) seria interessante avaliar os níveis de metionina ou a relação entre treonina:metionina.

Com respeito à alanina, quem mais apresenta é o selvagem e quem menos apresenta é o TR2 16. O agrupamento que apresenta uma posição intermediária é o seguinte: TR2 12 e TR2 9. Outra característica que merece um maior aprofundamento é esta via metabólica posto que o substrato para a produção de alanina é o glutamato que

mediante uma amino-transferase produz 2-oxo-glutarato e alanina (Lea, 1993). No entanto nos genótipos quem produziram mais glutamato é o TR2 16, e ao mesmo tempo é o que tem menos alanina, agora TR2 12 e TR2-16 são indivíduos intermediários tanto na proporção de glutamato como na proporção de alanina. A pergunta que permanece é o porque desta relação inversa? Mas pode ser uma evidencia, que apoia que esta alteração no metabolismo de assimilação do nitrato, troce mudanças em outras regiões do metabolismo do nitrogênio.

Realizou-se também experimentos em baixa concentração de CO₂ e alta luminosidade (condições fotorrespiratórias). Foram vários os aminoácidos que apresentaram diferenças significativas segundo o teste F, eles foram: serina, glutamina, glicina, treonina, arginina, alanina, aminoácidos totais; também em porcentagem, foram os seguintes: glutamato, serina, glutamina, treonina e alanina, Tukey encontra diferenças significativas entre as médias de serina, glutamina, glicina, treonina, arginina, alanina, aminoácidos totais, e entre as porcentagens de glutamato, serina, glutamina e treonina.

O interessante é que a serina é um produto da fotorrespiração produzido pela descarboxilação oxidativa da glicina (Leegood R.C., 1993); (Krömer, 1995) e quem mais possui serina, (em nanomol . g⁻¹ de materia seca) é o indivíduo selvagem, nos restantes genótipos, Tukey não encontra diferenças significativas.

Para glutamina, foi observado a existência de dois agrupamentos, (Tukey 5%), com TR2 apresentando o menor conteúdo de glutamina

Na glicina o maior conteúdo foi observado nos selvagens, apresentando menor conteúdo o TR2 19 e o TR2. Como foi exposto anteriormente na mitocôndria, a glicina sofre uma descarboxilação liberando CO₂, NADH, amônia e serina (Leegood R.C., 1993), coincidindo que o genótipo que produz maior quantidade de glicina e serina é o selvagem.

Respeito a treonina também são 2 grupos: selvagem quem mais produz este aminoácido e o resto, que não tem diferenças significativas. Arginina: quem mais produz este aminoácido é o selvagem, quem menos produz TR2 12 e TR2 o resto não apresenta diferenças significativas. Arginina é produzido da glutamina e o glutamato (Lea, 1993), mas estes últimos praticamente não apresentam diferenças significativas segundo o teste

de Tukey. Alanina o selvagem é que mais produz e para o resto não existem diferenças significativas também para o glutamato, não foram encontradas diferenças significativas, pelo teste de Tukey.

Para aminoácidos totais, sendo um dado muito importante que mais produz é o selvagem. Possivelmente isso este afetando a interpretação dos dados. Os genótipos que são agrupados, no nível inferior de produção são em ordem decrescente: TR1, TR1 11, TR2 12 e TR2.

Aspartato apresentou diferenças significativas tanto no teste F como no teste de Tukey. Para o teste de Tukey os que mais proporção deste aminoácido apresentavam foram: TR2, TR2 19 e TR2 12. Sendo este a origem de distintos aminoácidos como lisina treonina e metionina (Azevedo et al., 1997) a proporção deste foi drasticamente afetada em condições fotorrespiratórias no genótipo TR2 19, que passou de desde uma proporção mínima em condições de baixa luminosidade e CO₂ normal, a ser junto como TR2 os indivíduos que maior proporção de glutamato apresentam.

Analisando o glutamato a proporção dos aminoácidos, quem mais proporção tem é o TR2 e o TR2 12 e quem menos tem é o selvagem, em condições fotorrespiratórias e em condições normais de CO₂ e baixa luminosidade o indivíduo selvagem é quem menor proporção de glutamato apresenta., o glutamato e a glutamina são as portas de entrada do nitrogênio reduzido para serem utilizados na síntese de aminoácidos (Temple et al., 1998).

Serina: analisando este aminoácido, quem mais apresenta este é o selvagem seguido de TR2, TR1 e TR2 12 num mesmo agrupamento, no outro agrupamento, dos que menos tem serina, estão agrupados os seguintes genótipos em ordem decrescente: TR1, TR2 12, TR1 11, TR1 10, TR2 16, TR2 19 e TR2 9, uma hipótese interessante e que estes possam ter uma fotorrespiração menor. Os controles, transformantes simples, neste agrupamento, são os que maior proporção apresentam, e os seus respectivos transformantes apresentam, menor proporção deste aminoácido (serina).

4.5 Determinação do conteúdo de clorofila

Tabela 12. Valores médios de clorofila ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$), coeficiente de variação, teste F, das clorofilas, sua relação e somatória, a partir de 6 medidas de cada genótipo, cultivadas à $230 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e concentrações atmosféricas de CO_2 .

	Clorofila a	Clorofila b	Relação a/b	Total
WT	3.5 D	1.10 CB	3.24 AB	4.61 D
TR1	4. BCD	1.52 AB	2.77 B	5.52 BC
TR2	4.04 BCD	1.32 ABC	3.08 AB	5.37 BCD
TR1 10	3.93 CD	1 C	4.04 A	4.93 CD
TR1 11	3.8 CD	1.11 BC	3.43 AB	4.91 CD
TR2 9	5.03 A	1.75 A	3.09 AB	6.78 A
TR2 12	4.15 CB	1.34 ABC	3.10 AB	5.49 BC
TR2 16	4.58 AB	1.42 ABC	3.26 AB	6 AB
TR2 19	4.86 A	1.63 A	3.02 AB	6.49 A
CV	7.65	18.87	17.01	8.12
Pr >F	0.0001**	0.0001**	0.0244**	0.0001**

**Apresenta diferencia significativas pelo teste F entre os genótipos

Tabela 13. Valores médios de clorofila ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$), coeficiente de variação, teste F, das clorofilas, sua relação e somatória, a partir de 15 medidas de cada genótipo, cultivadas à $1200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e baixa concentração de CO_2 .

	Clorofila a	Clorofila b	Relação a/b	Total
WT	9.42 ABC	2.66 B	3.53 CD	12.09 AB
TR1	7.27 D	1.95 BC	3.72 CD	9.22 CD
TR2	8.91 ABC	2.31 BC	3.86 BCD	11.22 B
TR1 10	9.50 AB	2.64 B	3.60 CD	12.14 AB
TR1 11	7.22 D	1.59 BC	4.56 B	8.80 CD
TR2 9	7.91 BCD	4.57 A	3.19 D	12.49 AB
TR2 12	7.84 CD	1.82 BC	4.33 BC	9.67 C
TR2 16	9.29 ABC	2.51 BC	3.74 CD	11.80 AB
TR2 19	6.91 D	0.94 C	7.64 A	7.85 D
CV	16.32	59.39	16.51	11.04
Pr > F	0.0001**	0.0001**	0.0001	0.0001**

**Apresenta diferencia significativas pelo teste F entre os genótipos

As seguintes análises foram realizadas também nas duas condições: concentrações atmosféricas de CO_2 e $230 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa, e baixo CO_2 e $1200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Segundo o teste F, existem diferenças significativas tanto na quantidade de clorofila *a* e *b* quanto na relação entre as duas e no conteúdo total nas duas condições.

Em relação à clorofila *a*, em CO_2 normal e baixa luminosidade os transgênicos duplos TR2 9, TR2 19 e TR2 16 são o agrupamento que mais apresenta clorofila *a*. Os

duplos transgênicos TR 2 12, TR1 11 e TR1 10, junto com TR1 e TR2, encontram-se num agrupamento intermediário, e o que menor produção de clorofila *a* apresenta é o selvagem. Em condições fotorrespiratórias, no entanto, o agrupamento de maior produção de clorofila *a* agrupa os genótipos TR1 10, WT, TR2 16 e TR2; os genótipos restantes podem ser agrupados em outro conjunto segundo o teste de Tukey.

As diferenças na clorofila *b* não são tão evidentes em CO₂ e luminosidade baixa; TR2 9, TR2 19 e TR1 apresentam maior produção desta clorofila, enquanto TR1 11, WT e TR1 10 produzem menos. Em alta luminosidade, quem mais produz clorofila *b*, segundo o teste de Tukey, foi TR2 9, enquanto o agrupamento de menor produção foi TR2 16, TR2, TR1, TR2 12 TR1 11 e TR2 19. O resto ocupa posições intermediárias.

Na relação de clorofila *a/b*, em condições de CO₂ e baixa luminosidade, TR1 10 apresenta a maior relação e TR1 a menor de todas, mas existe uma tendência com respeito à disposição das médias: que os transformantes simples apresentem uma relação menor em comparação com o selvagem, ao passo que transformantes duplos apresentem maior relação com respeito aos controles (transformantes simples). Alguns dos transformantes duplos também apresentam maior relação *a/b* que o selvagem (TR2 16, TR1 11 e TR1 10). A relação em condições de alta luminosidade e baixo CO₂ apresenta TR2 19 como indivíduo de maior relação; um grupo intermediário contém TR1 11, TR2 12 e TR2, e um agrupamento de menor relação é composto por TR2, TR2 16, TR1, TR1 10, WT e TR2 9.

Na sombra, existe um maior conteúdo de clorofila *b* e nestas condições aumenta o conteúdo de LHCI e LHCII (Anderson & Anderson 1985). A relação entre as duas clorofilas aumenta com a luz (Dunford & Falkowski 1997), sendo esta relação um índice simples de aclimação luminosa (Anderson & Anderson 1985). Dos duplos transformantes, TR2 10 e TR2 12 apresentaram um aumento considerável na relação de clorofilas, destacando-se do resto. Possivelmente estes indivíduos apresentam uma flexibilidade maior às flutuações de luz, maiores ainda que o seu controle, transformante simples. Na linhagem TR1, o transformante que apresenta maior variação na relação *a/b* com a passagem para alta luz é o TR1 11, com uma relação de clorofilas consideravelmente superior a seu transformante simples (controle). No entanto, TR1 10

é similar a seu controle. Os controles apresentaram uma maior variação da relação de clorofilas do que o selvagem. Dos transformantes duplos, só TR2 9 apresentou pequena variação, menor ainda que o selvagem.

Com respeito à produção de clorofilas totais, o maior conteúdo de clorofilas segundo o teste de Tukey é apresentado, em ordem decrescente, por: TR2 9, TR2 19 e TR2 16; um grupo intermediário é composto por TR1 e TR2 12 e o grupo com o menor conteúdo de clorofilas é composto por TR2, TR1 10, TR1 11 e WT. Os 3 agrupados no conjunto de maior produção se apresentam como os indivíduos de maior ativação da nitrato redutases e apresentam níveis *in vivo* intermediários e elevados. Segundo Tukey, estão agrupados no grupo de maior porcentagem de aspartato.

Em condições fotorrespiratórias, o conjunto de maior produção de clorofilas segundo Tukey foram TR2 19 TR1 11 e TR2 12, não existindo diferenças significativas para este teste de médias, com os restantes genótipos. Pode-se ver uma relação interessante em que o TR2 19 apresentou maior atividade da NR (*in vivo*) em condições fotorrespiratórias mas se apresentou como intermediário no porcentagem de glutamato.

4.6 Análise de fotossíntese condutividade e concentração interna de CO₂

Estes dados não apresentaram diferenças significativas no teste F nem no teste Tukey. No entanto podem-se apreciar tendências como a condutividade estomática, mas isto precisa de amostras maiores, posto que podem ser indícios de alterações estruturais nas células.

O “post illumination burst” deveria ser estudado em mais detalhe, ou tentar com novas técnicas, no possível mais diretas com análises em condições de fotorrespiração.

4.7 Análise de fotossíntese (assimilação de CO₂) e condutância estomática

Com relação às análises de taxa de assimilação de CO₂, as medidas não mostraram diferenças significativas no teste F nem no teste Tukey. No entanto, podem-se apreciar tendências. Por exemplo, a condutância estomática tende a ser menor para as

plantas transgênicas; esta tendência pode ser um indício de alterações estruturais nas células (Figuras 18 e 19).

A figura 17 mostra os valores de pico do “post illumination burst” (PIB). Este PIB deve ser estudado em mais detalhe, ou com o auxílio de novas técnicas, se possível mais diretas, e os análises ao igual como foi feito nos aminoácidos deveriam ser repetidos em condições de fotorrespiração.

Figura 17- Média dos valores do “post illumination burst”(PIB) proveniente de 4 amostras por genótipo em condições atmosféricas de CO_2 .

Figura 18- Médias de abertura estomática nos dois linhagens, procedente de amostras de 5 indivíduos.

Figura 19- Médias de assimilação de CO_2 nos dois linhagens, procedente de amostras de 5 indivíduos.

5 CONCLUSÕES

- ✓ Comprovou-se a transformação com o gene *nia-2*, de indivíduos previamente transformados com o gene *Lhcb1*2*, assim como a independência dos eventos e a confirmação de eventos de cópia única. Isso foi evidenciado pela presença de bandas diferenciais simples.
- ✓ Determinou-se uma maior atividade da enzima nitrato redutase. Nos indivíduos duplamente transformados em relação aos seus controles, transformantes simples, e ao selvagem. Também se demonstrou a maior produção de enzima por parte dos transformantes com respeito ao seus respectivos controles.
- ✓ Determinou-se uma alteração no conteúdo de treonina e no total de aminoácidos, também na proporção dos aminoácidos treonina, glutamato, aspartato e alanina.
- ✓ Em condições de fotorrespiração (180 ppm de CO₂) uma iluminação de 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Comprovou-se uma maior proporção de serina nos indivíduos selvagens e controles (transformantes primários), sendo a serina um metabólito da fotorrespiração; isto se tornaria uma evidência de uma diminuição da fotorrespiração nos indivíduos duplamente transformados.
- ✓ Com relação às clorofilas, determinou-se uma maior variação da relação entre as clorofilas *a/b*, como se expus a relação é um índice, da aclimação das plantas, e esta maior flexibilidade pode se entender como uma evidência para uma maior flexibilidade para a aclimação a distintas concentrações de CO₂ e mudanças de luz. Também encontrou-se uma relação em alguns genótipos, entre a atividade da enzima nitrato redutase, porcentagem de glutamato e clorofila total, sendo de interesse o aprofundamento de estudos sobre a via de síntese de clorofila.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, J.F.; ANDERSON, B. The dynamic photosynthetic membrane and regulation of solar energy conversion. **Trends in Biochemical Science**, n.13, p.351-355, 1985.
- AZEVEDO, R.A.; ARRUDA, P.; TURNER, W.L.; LEA, P.J. The biosynthesis and metabolism of the aspartate derived amino acids in higher plants. **Phytochemistry**, v.46, n.3, p.395-419, 1997.
- BARJA, P.R. Produção e difusão de oxigênio: processos biofísicos da fotossíntese investigados com a técnica de fotoacústica. Campinas, 2000. 121p. Tese (Doutorado) - Instituto de Física "Gleb Wataghin", Universidade Estadual de Campinas.
- BASSI, R.; DAINESE, P.A. A supramolecular light-harvesting complex from chloroplast photosystem-II membranes. **European Journal of Biochemistry**, v.204, n.1, p.317-326, 1992.
- BECKER, D. Binary vectors which allow the exchange of plant selectable markers and reporter genes. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.1, p.203, 1990.
- BIELESKI, R.L.; TURNER, N.A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, v.17, n.2, p.278-294, 1966.

- BLOOM, A.J.; CALDWELL, R.M.; FINAZZO, J.; WARNER, R.L.; WEISSBART, J.
Oxygen and carbon-dioxide fluxes from barley shoots depend on nitrate assimilation.
Plant Physiology, v.91, n.1, p.352-356, 1989.
- BRYCE, J. L.; S. A. HILL. Energy production in plant cells. In: LEA, P.J.; LEEGOOD
R.C. **Plant Biochemistry and Molecular Biology**. Chinchester: John Wiley & Sons,
1993. cap.1, p.1-26.
- CABOCHE, M.; ROUZE, P. Nitrate reductase: a target for molecular and cellular
studies in higher-plants. **Trends in Genetics**, v.6, n.6, p.187-192, 1990.
- CHAMPIGNY, M.L. Integration of photosynthetic carbon and nitrogen metabolism in
higher plants. **Photosynthesis Research**, v.46, n.1-2, p.117-127, 1995.
- CRAWFORD, N.M. Nitrate: nutrient and signal for plant-growth. **Plant Cell**, v.7, n.7,
p.859-868, 1995.
- CRAWFORD, N.M.; ARST, H.N. The molecular-genetics of nitrate assimilation in
fungi and plants. **Annual Review of Genetics**, v.27, p.115-146, 1993.
- CRAWFORD, N.M.; GLASS, A.D.M. Molecular and physiological aspects of nitrate
uptake in plants. **Trends in Plant Science**, v.3, n.10, p.389-395, 1998.
- DEBORNE, F.D.; VINCENTZ, M.; CHUPEAU, Y.; VAUCHERET, H. Co-
suppression of nitrate reductase host genes and transgenes in transgenic tobacco
plants. **Molecular & General Genetics**, v.243, n.6, p.613-621, 1994.
- DEROLES, S.C.; GARDNER R.G. Expression and inheritance of kanamycin resistance
in a large number of transgenic petunias generated by agrobacterium-mediated
transformation. **Plant Molecular Biology**, n.11, p.355-364, 1988.

- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid dna isolation prodedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.
- DREYFUSS, B.W.; THORNBUR, J.P. Assembly of the light-harvesting complexes (LHCS) of photosystem-II - monomeric LHC IIB complexes are intermediates in the formation of oligomeric LHC IIB complexes. **Plant Physiology**, v.106, n.3, p.829-839, 1994.
- DUNFORD, D.G.; FALKOWSKI, P.G. Chloroplast redox regulation of nuclear gene transcription during photoacclimation. **Photosynthesis Research**, n.53, p.229-241, 1997.
- FERRARIO-MERY, S.; VALADIER, M.H.; FOYER, C.H. Overexpression of nitrate reductase in tobacco delays drought- induced decreases in nitrate reductase activity and mRNA. **Plant Physiology**, v.117, n.1, p.293-302, 1998.
- FOYER, C.H.; FERRARIO, S. Modulation of carbon and nitrogen-metabolism in transgenic plants with a view to improved biomass production. **Biochemical Society Transactions**, v.22, n.4, p.909-915, 1994.
- FOYER, C.H.; LESCURE, J.C.; LEFEBVRE, C.; MOROTGAUDRY, J.F.; VINCENTZ, M.; VAUCHERET, H. Adaptations of photosynthetic electron-transport, carbon assimilation, and carbon partitioning in transgenic *Nicotiana-plumbaginifolia* plants to changes in nitrate reductase-activity. **Plant Physiology**, v.104, n.1, p.171-178, 1994.
- FUENTES, S.I.; ALLEN, D.J.; ORTIZ-LOPEZ, A.; HERNANDEZ, G. Over-expression of cytosolic glutamine synthetase increases photosynthesis and growth at low nitrogen concentrations. **Journal of Experimental Botany**, v.52, n.358, p.1071-1081, 2001.

GALANGAU, F.; LEYDECKER, M.T.; MOUREAUX, T.; CABOCHE, M. Nitrate regulation of the nitrate reductase and of its messenger-RNA in tobacco. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.26, n.2, p.230-231, 1988.

GEIGER, M.; HAAKE, V.; LUDEWIG, F.; SONNEWALD, U.; STITT, M. The nitrate and ammonium nitrate supply have a major influence on the response of photosynthesis, carbon metabolism, nitrogen metabolism and growth to elevated carbon dioxide in tobacco. **Plant Cell and Environment**, v.22, n.10, p.1177-1199, 1999.

GOSHIMA, N.; MUKAI, T.; SUEMORI, M.; TAKAHASHI, M.; CABOCHE, M.; MORIKAWA, H. Emission of nitrous oxide (N_2O) from transgenic tobacco expressing antisense NiR mRNA. **Plant Journal**, v.19, n.1, p.75-80, 1999.

GREEN, B.R.; DUNFORD, D.G. The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.47, p.685-714, 1996.

HANKAMER, B.; BARBER, J.; BOEKEMA, E.J. Structure and membrane organization of photosystem II in green plants. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.48, p.641-671, 1997.

HARRISON, J.; BRUGIÈRE, N.; PHILLIPSON, B.; FERRARIO-MERY, S.; BECKER, T.; LIMAMI, A.; HIREL, B. Manipulating the pathway of ammonia assimilation through genetic engineering and breeding: consequences to plant physiology and plant development. **Plant and Soil**, n.221, p.81-93, 2000.

HEINEKE, D.; KAUDER, F.; FROMMER, W.; KUHN, C.; GILLISSEN, B.; LUDEWIG, F.; SONNEWALD, U. Application of transgenic plants in understanding responses to atmospheric change. **Plant Cell and Environment**, v.22, n.6, p.623-628, 1999.

- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water culture of growing plants without soil.** Berkeley: University of California Press, 1950. 210p.
- HOFF, T.; TRUONG, H.N.; CABOCHE, M. The use of mutants and transgenic plants to study nitrate assimilation. **Plant Cell and Environment**, v.17, n.5, p.489-506, 1994.
- HORSCH, R.B.; FRY, J.E.; HOFFMANN, N.L.; EICHHOLTZ, D.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T. A simple and general method for transferring genes into plants. **Science**, n.227, p.1229-1231, 1985.
- HORTON, P.; RUBAN, A. The role of lightharvesting complex II in energy quenching. In: BAKER, N.R.; BOWYER, J.R. **Photoinhibition of photosynthesis from molecular mechanisms to the field.** Oxford: BIOS Scientific Publishers, 1994. cap.6, p.111-128.
- HUBER, S.C.; BACHMANN, M.; HUBER, J.L. Post-translational regulation of nitrate reductase activity: a role for Ca^{2+} and 14-3-3 proteins. **Trends in Plant Science**, v.1, n.12, p.432-438, 1996.
- HUBER, S.C.; HUBER, J.L. Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.47, p.431-444, 1996.
- HUPPE, H.C.; TURPIN, D.H. Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, n.45, p.577-607, 1994.
- KAISER, W.M.; HUBER, S.C. Posttranslational regulation of nitrate reductase in higher- plants. **Plant Physiology**, v.106, n.3, p.817-821, 1994.

- KANAMARU, K.; WANG, R.C.; SU, W.P.; CRAWFORD, N.M. Ser-534 in the hinge 1 region of *Arabidopsis* nitrate reductase is conditionally required for binding of 14-3-3 proteins and in vitro inhibition. **Journal of Biological Chemistry**, v.274, n.7, p.4160-4165, 1999.
- 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. **Research in Photosynthesis**, v.3, p.445-448, 1992.
- KRISHNA, K.N. Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.50, p.333-359, 1999.
- KRÖMER, S. Respiration during photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.46, p.45-70, 1995.
- LEA, P. J. Nitrogen metabolism. In: LEA, P.J.; LEEGOOD, R.C. **Plant Biochemistry and Molecular Biology**. Chinchester: John Wiley & Sons., 1993. cap.7, p.155-180.
- LEEGOOD R.C. The Calvin cycle and photorespiration. In: LEA, P.J.; LEEGOOD, R.C. **Plant Biochemistry and Molecular Biology**. Chinchester: John Wiley & Sons., 1993. cap.2, p.27-46.
- MATHIS, N.L.; HINCHEE, M.A.W. *Agrobacterium* inoculation techniques for plant tissues. **Plant Molecular Biology Manual**, n.6, p.1-9, 1994.
- MATT, P.; GEIGER, M.; WALCH-LIU, P.; ENGELS, C.; KRAPP, A.; STITT, M. The immediate cause of the diurnal changes of nitrogen metabolism in leaves of nitrate-replete tobacco: a major imbalance between the rate of nitrate reduction and the rates of nitrate uptake and ammonium metabolism during the first part of the light period. **Plant Cell and Environment**, v.24, n.2, p.177-190, 2001.

- MATT, P.; SCHURR, U.; KLEIN, D.; KRAPP, A.; STITT, M. Growth of tobacco in short-day conditions leads to high starch, low sugars, altered diurnal changes in the Nia transcript and low nitrate reductase activity, and inhibition of amino acid synthesis. **Planta**, v.207, n.1, p.27-41, 1998.
- MORCUENDE, R.; KRAPP, A.; HURRY, V.; STITT, M. Sucrose-feeding leads to increased rates of nitrate assimilation, increased rates of alpha-oxoglutarate synthesis, and increased synthesis of a wide spectrum of amino acids in tobacco leaves. **Planta**, v.206, n.3, p.394-409, 1998.
- MULLER, C.; SCHEIBLE, W.R.; STITT, M.; KRAPP, A. Influence of malate and 2-oxoglutarate on the NIA transcript level and nitrate reductase activity in tobacco leaves. **Plant Cell and Environment**, v.24, n.2, p.191-203, 2001.
- MURASHIGE T.; SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.479-497, 1962.
- NEJIDAT, A.; ZHANG, G.; GRINBERG, M.; HEIMER, Y.M. Over expression of nitrate reductase increases protein content and biomass production in arabidopsis. **Plant Physiology**, v.111, n.2, p.47, 1996.
- NEJIDAT, A.; ZHANG, G.F.; GRINBERG, M.; HEIMER, Y.M. Increased protein content in transgenic arabidopsis thaliana over-expressing nitrate reductase activity. **Plant Science**, v.130, n.1, p.41-49, 1997.
- NI, M.; CUI, D.; EINSTEIN, J.; NARASIMHULU, S.; VERGARA, C.E.; GELVIN, S.B. Strength and tissue specificity of chimeric promoters derived from the octopine and mannopine synthase genes. **Plant Journal**, v.7, n.4, p.661-676, 1995.

- NOCTOR, G.; FOYER, C.H. A re-evaluation of the ATP : NADPH budget during C-3 photosynthesis: a contribution from nitrate assimilation and its associated respiratory activity? **Journal of Experimental Botany**, v.49, n.329, p.1895-1908, 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. **Journal of Plant Physiology**, v.154, n.1, p.46-50, 1999.
- PIMENTEL, C. Metabolismo de carbono na agricultura tropical. 1. ed. Rio de Janeiro. Brazil: Editora Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro - EDUR, 1998. 159p.
- PORRA, R.J.; THOMPSON, W.A.; KRIEDEMANN, P.E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous-equations for assaying chlorophyll-a and chlorophyll-b extracted with 4 different solvents - verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic-absorption spectroscopy. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v.975, n.3, p.384-394, 1989.
- QUY, L.V.; LAMAZE, T.; CHAMPIGNY, M.L. Short-term effects of nitrate on sucrose synthesis in wheat leaves. **Planta**, v.185, n.1, p.53-57, 1991.
- RUBAN, A.V.; HORTON, P. The xanthophyll cycle modulates the kinetics of nonphotochemical energy dissipation in isolated light- harvesting complexes, intact chloroplasts, and leaves of spinach. **Plant Physiology**, v.119, n.2, p.531-542, 1999.
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F., AND MANIATIS T. Analyses of genomic DNA by southern hybridization. SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. cap.9, p.9.31-9.36.

SCHEIBLE, W.R.; GONZALEZFONTES, A.; LAUERER, M.; MULLERROBER, B.; CABOCHE, M.; STITT, M. Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. **Plant Cell**, v.9, n.5, p.783-798, 1997.

STITT, M. The use of transgenic plants to study the regulation of plant carbohydrate-metabolism. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.22, n.4, p.635-646, 1995.

STITT, M.; KRAPP, A. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. **Plant Cell and Environment**, v.22, n.6, p.583-621, 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 2, ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Publishers, 1998. 792p.

TEMPLE, S.J.; VANCE, C.P.; GANTT, J.S. Glutamate synthase and nitrogen assimilation. **Trends in Plant Science**, v.3, n.2, p.51-56, 1998.

TISCHNER, R. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plant. **Plant, Cell and Environment**, n.23, p.1005-1024, 2000.

VAUCHERET, H.; KRONENBERGER, J.; LEPINGLE, A.; VILAINE, F.; BOUTIN, J.P.; CABOCHE, M. Inhibition of tobacco nitrite reductase-activity by expression of antisense RNA. **Plant Journal**, v.2, n.4, p.559-569, 1992.

VAUCHERET, H.; KRONENBERGER, J.; ROUZE, P.; CABOCHE, M. Complete nucleotide-sequence of the 2 homologous tobacco nitrate reductase genes. **Plant Molecular Biology**, v.12, n.5, p.597-600, 1989a.

- VAUCHERET, H.; VINCENTZ, M.; KRONENBERGER, J.; CABOCHE, M.; ROUZE, P. Molecular-cloning and characterization of the 2 homologous genes-coding for nitrate reductase in tobacco. **Molecular & General Genetics**, v.216, n.1, p.10-15, 1989b.
- VERHOEVEN, A.S.; ADAMS, W.W.; DEMMIG-ADAMS, B.; CROCE, R.; BASSI, R. Xanthophyll cycle pigment localization and dynamics during exposure to low temperatures and light stress in *vinca major*. **Plant Physiology**, v.120, n.3, p.727-737, 1999.
- VINCENTZ, M.; MOUREAUX, T.; LEYDECKER, M.T.; VAUCHERET, H.; CABOCHE, M. Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana-plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. **Plant Journal**, v.3, n.2, p.315-324, 1993.
- WALDRON, C.; MURPHY, E.B.; ROBERTS, J.L.; GUSTAFSON, G.D.; ARMOUR, S.L.; MALCOLM, S.K. Resistance to hygromycin B. **Plant Molecular Biology**, n.5, p.103-108, 1985.
- WANG, M.B.; WATERHOUSE, P.M. A rapid and simple method of assaying plants transformed with hygromycin or PPT resistance genes. **Plant Molecular Biology Reporter**, n.15, p.209-215, 1997.
- WANG, R.C.; GUEGLER, K.; LABRIE, S.T.; CRAWFORD, N.M. Genomic analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. **Plant Cell**, v.12, n.8, p.1491-1509, 2000.