**AVALIAÇÃO DO METABOLISMO FOTOSSINTÉTICO DE PLANTAS
TRANSGÊNICAS DE TABACO (*Nicotiana tabacum*) QUE EXPRESSAM O
GENE *Lhcb1*2* CONSTITUTIVAMENTE EM CONDIÇÕES DE ALTA
LUMINOSIDADE**

LUCIANA SANTOS RODRIGUES COSTA PINTO

Engenheira Agrônoma

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

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

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Outubro – 2000

17	10	plântulas	sementes
32	1	figura 10	figura 11
33	11	figura 10	figura 11
51	9	concentrações atmosféricas de CO ₂ ...	340-360
			ppm de CO ₂
		CAB1	TR1
		CAB2	TR2
		ml	mL
		rpm	g
79		*** Significativo...	* Significativo...
80		*** Significativo...	* Significativo...
81		*** Significativo...	* Significativo...
85		*** Significativo...	* Significativo...
86		*** Significativo...	* Significativo...
87		*** Significativo...	* Significativo...
88		*** Significativo...	* Significativo...
79		*** Significativo...	* Significativo...
107	6	Tabela 7	Tabela 18
107	17	anteraxantina	neoxantina
		NPQ	“quenching” não-fotoquímico

As legendas corretas são:

ERRATA

Figura 4: Modelo proposto para as vias de fototransdução e ritmo circadiano que regulam a transcrição do gene *Lhc*. Pr e Prf significam fitocromo vermelho e fitocromo vermelho extremo, respectivamente. Adaptado de Anderson e Kay (1997).

Figura 18: Conteúdo de carotenóides do Ciclo das Xantofilas de plantas transgênicas TR1 (□), TR2 (Δ) e selvagens WTSR1 (○) de experimentos de reiluminação. T₀ = Controle (plantas cultivadas em baixa luminosidade sem o período de escuro)

Na página 97, a tabela 11, correta é:

Cultivadas em Alta Luminosidade						
GENÓTIPO	3-PGA	TP	G6P	F6P	3-PGA/TP	G6P/F6P
WTSR1	235,53±46,41	34,12±2,19	138,27±15,77	94,71±3,52	6,90	1,46
TR1	145,15±20,09	4,81±0,76	106,27±18,48	94,24±2,79	30,18	1.13
TR2	209,94±15,13	11,07±2,56	114,95±27,00	79,66±11,38	18,96	1,44

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

Pinto, Luciana Santos Rodrigues Costa

Avaliação do metabolismo fotossintético de plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que expressam o gene *Lhcb1* *2 constitutivamente, em condições de alta luminosidade / Luciana Santos Rodrigues Costa Pinto. - - Piracicaba, 2000.

140 p. : il.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000.
Bibliografia.

1. Aclimação 2. Fumo transgênico 3. Gene 4. Luz 5. Metabolismo fotossintético 6. Planta transgênica 7 . Regulação genética I. Título

CDD 633.71

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

*Aos meus pais, Agostim e Izaura e
aos meus irmãos Juliana e Gustavo
Com amor*

OFEREÇO

*Ao meu marido Rogério e
ao meu filho Pedro,
razões da minha vida,
com amor*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Carlos Alberto Labate, pela orientação, amizade, atenção e pela minha formação desde o mestrado até a elaboração do presente trabalho.

Ao Dr. Enrico Brugnoli do Instituto de Agrosilvicultura do CNR-Porano, Itália, pela colaboração na obtenção dos resultados das análises de determinação de pigmentos.

À Mônica Teresa Veneziano Labate pelos ensinamentos, amizade e pela participação e obtenção dos resultados.

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa/Microscopia Eletrônica na Pesquisa Agropecuária - NAP/MEPA (ESALQ-USP), pelas facilidades concedidas para utilização dos equipamentos.

Aos professores do Departamento de Genética da ESALQ/USP, pelo apoio e ensinamentos.

Aos amigos e colegas do curso de pós-graduação do Departamento de Genética da ESALQ/USP pelos momentos de amizade e companheirismo. Não citarei nomes, pois foram tantos que demandaria grande número de páginas.

Aos funcionários do Departamento de Genética da ESALQ/USP, em especial ao técnico José Carmezini de Paula.

As bibliotecárias Silvana Oliveira, Silvana Gregório e Elisabeth pelo auxílio e amizade no decorrer do curso.

Aos grandes amigos Wanderlei Pontes, Maria Cristina Falco, Pedro Real, Juliana Decico Real e Maria Aldete Justiniano pela amizade, carinho e grande ajuda que possibilitaram a finalização do presente trabalho.

Aos amigos do laboratório de Genética Fisiológica do Departamento de Genética da ESALQ/USP pela convivência, amizade e incentivo em todos os momentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de estudo (97/06154-5) e auxílio financeiro fornecidos ao projeto de pesquisa.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xvi
SUMMARY	xviii
1 – INTRODUÇÃO	01
2 – REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1 - Fotossíntese - Conceitos Gerais	04
2.2 - Fotossíntese - Aspectos Estruturais	04
2.2.1 – Composição dos Complexos Protéicos da Membrana do Tilacóide	04
2.2.2 - LHCII - Complexo Coletor de luz do PSII	10
2.3 - Regulação da Expressão Gênica das Proteínas LHC do Complexo Coletor de Luz do PSII (LHCII)	16
2.3.1 - Aclimação de Plantas Superiores em Condições de Alta e Baixa Luminosidade	22
2.3.2 - Estratégias de Curto-Prazo e Longo-Prazo para a Aclimação à Alta Luminosidade	25
2.4 - Fluorescência da Clorofila α	30
2.5 - Metabolismo do Carbono e Fotossíntese	35
2.6 - Interceptação da Luz e Arquitetura da Membrana do Tilacóide	40
3 - MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1 - Material Utilizado e Condições de Cultivo	48
3.2 - Caracterização das Plantas Transgênicas e Selvagens Quanto ao Potencial Fotossintético	50
3.2.1 – Análises de Trocas Gasosas	50
3.2.2 – Análise de Fluorescência da Clorofila α	53
3.2.3 – Preparo do Extrato Foliar para a Determinação de Metabólitos e Carboidratos	55

3.2.3.1 – Extração com Ácido Perclórico para a Quantificação dos Metabólitos do Ciclo de Calvin-Benson	57
3.2.3.1.1 – Determinação do Conteúdo de Metabólitos do Ciclo de Calvin-Benson	57
3.2.3.1.1.1 – Determinação do Conteúdo de Ácido 3-Fosfoglicérico (3-PGA)	58
3.2.3.1.1.2 – Determinação do Conteúdo de Triose Fosfato (TP) e Frutose 1,6bisfosfato (FBP)	58
3.2.3.1.1.3 – Determinação do Conteúdo de Hexoses Fosfato	59
3.2.3.2 – Determinação da Feofitina	59
3.2.4. Determinação do Conteúdo de Sacarose	60
3.2.5 – Extração do Amido	60
3.2.5.1 - Determinação do Conteúdo de Amido	61
3.3 - Determinação de Clorofilas <i>a</i> e <i>b</i>	61
3.4 - Estudo Anatômico e Estrutural de Folhas de Tabaco Transgênico e Selvagem	62
3.5 - Experimentos de Estresse de Frio	64
3.6 - Caracterização dos Mecanismos de Ajuste de Curto e Longo Prazo no Metabolismo das Plantas Transgênicas e Selvagens Independente das Taxas Fotossintéticas	65
3.6.1 - Experimentos de Reiluminação	65
3.6.2 - Sistemas de Transferência Baixa Luz-Alta Luz (BL→AL)	66
3.6.3 - Determinação da Composição e Conteúdo de Proteínas das Membranas dos Tilacóides de Cloroplastos	67
3.6.3.1 - Extração de Proteínas das Membranas dos Tilacóides de Cloroplastos	67
3.6.3.2 - Eletroforese das Proteínas de Membranas dos Tilacóides em Gel de Poliacrilamida (PAGE).	68
3.7 - Análise do Conteúdo de Carotenóides do Ciclo das Xantofilas	69
3.8 - Análises de Northern Blot	69
3.9 - Delineamento e Análise Estatística	70
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	71

4.1 - Estudo Anatômico e Estrutural de Folhas de Tabaco Transgênico e Selvagem	71
4.2 - Assimilação de CO ₂ e Fluorescência da Clorofila <i>a</i>	78
4.3 - Experimentos de Estresse de Frio	84
4.4 - Conteúdo de Carboidratos e Metabólitos do Ciclo de Calvin-Benson	92
4.5 - Experimentos de reiluminação	99
4.6 -Sistemas de Transferência Baixa Luz-Alta Luz (BL→AL)	108
4.7 - Determinação da Composição e Conteúdo das Proteínas das Membranas dos Tilacóides em Gel de Poliacrilamida (PAGE)	113
5 – CONCLUSÕES	123
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1: Médias de contagens do número de cloroplastos/célula do parênquima paliçádico, número de células do parênquima paliçádico/extensão foliar (mm) e número de células da epiderme superior/extensão foliar (mm), de plantas selvagens e transgênicas, cultivadas em alta luminosidade. Os valores entre parênteses se referem ao número de células contadas para cada genótipo.	75
Tabela 2: Taxas de assimilação de CO ₂ (A) em $\mu\text{molCO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, P_i (pressão parcial intercelular de CO ₂) em μbar e parâmetros de fluorescência da clorofila (F_v/F_m , q_N , ϕ_{PSII} e $1-q_P$) de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2) $\pm$ o desvio padrão. As plantas foram cultivadas em condições de baixa luminosidade e as análises foram conduzidas em condições atmosféricas de CO ₂ e com intensidade luminosa de 1000-1200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Os valores entre parênteses referem-se ao número de plantas analisadas para cada genótipo.	79
Tabela 3: Taxas de assimilação de CO ₂ (A) em $\mu\text{molCO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, P_i (pressão parcial intercelular de CO ₂) em μbar e parâmetros de fluorescência da clorofila (F_v/F_m , q_N , ϕ_{PSII} e $1-q_P$) de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2) $\pm$ o desvio padrão. As plantas foram cultivadas em condições de alta luminosidade e as análises foram conduzidas em altas concentrações de CO ₂ e com intensidade luminosa de 1000-1200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Os valores entre parênteses referem-se ao número de plantas analisadas para cada genótipo.	80

Tabela 4: Taxas de assimilação de CO ₂ (A) em $\mu\text{molCO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, P_i (pressão parcial intercelular de CO ₂) em μbar e parâmetros de fluorescência da clorofila (F_v/F_m , q_N , ϕ_{PSII} e $1-q_P$) de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2) $\pm$ o desvio padrão. As plantas foram cultivadas em condições de baixa luminosidade e as análises foram conduzidas em altas concentrações de CO ₂ e com intensidade luminosa de 1000-1200 $\mu\text{mol}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Os valores entre parênteses referem-se ao número de plantas analisadas para cada genótipo.	81
Tabela 5: Valores da fração de dissipação térmica (NPQ) do “quenching” não-fotoquímico (q_N) obtidos de plantas analisadas em alta luminosidade (1000-1200 $\mu\text{mol}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e saturação de CO ₂ (800 ppm de CO ₂) tanto para cultivo em baixa quanto alta luminosidade.	83
Tabela 6: Taxas de assimilação de CO ₂ (A) em $\mu\text{molCO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, P_i (pressão parcial intercelular de CO ₂) em μbar e parâmetros de fluorescência da clorofila (F_v/F_m , q_N , ϕ_{PSII} e $1-q_P$) de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2) $\pm$ o desvio padrão de experimentos de estresse de frio. As plantas foram cultivadas em condições de baixa luminosidade e as análises foram conduzidas em altas concentrações de CO ₂ e com intensidade luminosa de 1000-1200 $\mu\text{mol}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Os valores entre parênteses referem-se ao número de plantas analisadas para cada genótipo.	85
Tabela 7: Taxas de assimilação de CO ₂ (A) em $\mu\text{molCO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, P_i (pressão parcial intercelular de CO ₂) em μbar e parâmetros de fluorescência da clorofila (F_v/F_m , q_N , ϕ_{PSII} e $1-q_P$) de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2) $\pm$ o desvio padrão de experimentos de estresse de frio. As plantas foram cultivadas em condições de alta luminosidade e as análises foram conduzidas em altas concentrações de CO ₂ e com intensidade luminosa de 1000-1200 $\mu\text{mol}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Os valores entre parênteses referem-se ao número de plantas analisadas para cada genótipo.	86

- Tabela 8: Taxas de assimilação de CO_2 (A) em $\mu\text{molCO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, P_i (pressão parcial intercelular de CO_2) em μbar e parâmetros de fluorescência da clorofila (F_v/F_m , q_N , ϕ_{PSII} e $1-q_P$) de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2) $\pm$ o desvio padrão de experimentos de estresse de frio. As plantas foram cultivadas em condições de baixa luminosidade e as análises foram conduzidas em concentrações atmosféricas de CO_2 e com intensidade luminosa de 1000-1200 $\mu\text{mol}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Os valores entre parênteses referem-se ao número de plantas analisadas para cada genótipo. 87
- Tabela 9: Taxas de assimilação de CO_2 (A) em $\mu\text{molCO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, P_i (pressão parcial intercelular de CO_2) em μbar e parâmetros de fluorescência da clorofila (F_v/F_m , q_N , ϕ_{PSII} e $1-q_P$) de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2) $\pm$ o desvio padrão de experimentos de estresse de frio. As plantas foram cultivadas em condições de alta luminosidade e as análises foram conduzidas em concentrações atmosféricas de CO_2 e com intensidade luminosa de 1000-1200 $\mu\text{mol}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Os valores entre parênteses referem-se ao número de plantas analisadas para cada genótipo. 88
- Tabela 10: Valores de 3-PGA, G6P, F6P e TP em nmol/mg de clorofila e da relação 3-PGA/TP e G6P/F6P (mol/mol) para plantas transgênicas e selvagens cultivadas em baixa luminosidade e analisadas em alta luminosidade e alta concentração de CO_2 . Os dados são médias de 3 plantas $\pm$ o desvio padrão. 92
- Tabela 11: Valores de 3-PGA, TP, G6P e F6P em $\mu\text{mol/mg}$ de clorofila e da relação 3-PGA/TP e G6P/F6P (mol/mol) para plantas transgênicas (TR1 e TR2) e selvagens (WTSR1) cultivadas em alta luminosidade e analisadas em alta luminosidade e concentração atmosférica de CO_2 . Os dados são médias de 3 plantas $\pm$ o desvio padrão. 97

Tabela 12 Conteúdo de carboidratos totais (amido e sacarose) em μmol hexoses equivalentes. mg^{-1} clorofila de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2). Os valores representam a média de 4 plantas.	98
Tabela 13: Valores da relação F_v/F_M de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2) $\pm$ o desvio padrão, de experimentos de reiluminação. Os valores foram determinados ao final dos 21 dias de escuro (T_0), e às 6h (T_1), 12h (T_2) e 24h (T_3) após a reiluminação. Os valores entre parênteses referem-se ao número de plantas analisadas para cada genótipo.	100

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1:** Modelo da membrana do tilacóide mostrando os polipeptídeos nos respectivos complexos. Os polipeptídeos são identificados pelo gene e/ou nome da proteína. Adaptado de Wettstein et al. (1995). 11
- Figura 2:** Diagrama esquemático da possível sequência de montagem do LHCII com o centro de reação. O CCII corresponde ao “core complex” do fotossistema II (D1 e D2, citocromo *b₅₅₉* e proteínas intrínsecas - CP47 e CP43) Os componentes menores estão representados pelos círculos **a** (CP29), **c** (CP26), **d** (CP24) e **e**, e os componentes maiores do LHCIIb (subunidades de 25, 27 e 28 kDa) estão representados como discos. Adaptado de Dreyfuss e Thornber, 1994. 13
- Figura 3:** Modelo esquemático do LHCII. O esquema apresenta a organização relativa dos complexos pigmento-proteína e as associações com o centro de reação (CCII). As subunidades CP29, CP26 e CP24 estão representadas respectivamente pelas letras **a**, **c** e **d**, enquanto os sub-complexo maior estão indicados como trímeros, com os pesos moleculares de suas subunidades (kDa). Adaptado de Peter & Thornber (1991). 15
- Figura 4:** Modelo proposto para as vias de fototransdução e ritmo circadiano que regulam a transcrição do gene *Lhc*. Adaptado de Anderson e Kay (1997). 21

Figura 5 : Desenho comparativo da distribuição de carotenóides e proteínas do LHCII por unidade do PSII, de plantas adaptadas à sombra e ao sol. Adaptado de Gilmore, 1997.....	24
Figura 6: Esquema simplificado do Ciclo de Calvin-Benson e da síntese de amido e sacarose.	39
Figura 7: Modelo proposto para as interações entre o metabolismo celular e fotossintético no controle da expressão gênica do núcleo e do cloroplasto. Adaptado de Durnford & Falkowski (1997).	41
Figura 8: Representação esquemática da construção do gene quimérico com a indicação do fragmento usado como sonda para hibridização de ácidos nucleicos e os principais sítios de restrição.	49
Figura 9: Câmara de análise da fotossíntese e fluorescência da clorofila α , acoplada ao sistema de congelamento rápido de folhas.	52
Figura 10: Analisadores de gás infra-vermelho usados para medidas de absorção de CO ₂ e transpiração foliar.	53
Figura 11: Princípios da análise de “quenching” de fluorescência da clorofila α pelo método dos pulsos saturantes. A: luz modulada (frequência 1,6 kHz) para a obtenção de F_0 ; B: pulso de luz saturante (aproximadamente $15000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) para a obtenção de F_M ; C: luz actínica contínua ligada simultaneamente com o pulso de luz saturante (a cada 60 segundos). Dependendo das condições de luz, cinco estados diferentes são distinguidos, correspondendo a pontos característicos da produção de fluorescência e coeficientes de “quenching”. <i>Indicadores de intensidade de fluorescência-</i> F_0 : fluorescência mínima (intensidade de fluorescência com todos os centros de reação do PSII abertos enquanto a membrana do tilacóide está no estado não energizado, isto é, adaptada no escuro); F_M : fluorescência máxima (intensidade de fluorescência obtida quando todos os centros de	

reação do PSII estão fechados no estado adaptado no escuro); F_v : fluorescência variável máxima obtida quando todos os processos não fotoquímicos são mínimos ($q_N=0$); F'_M : fluorescência máxima com todos os centros de reação do PSII fechados em qualquer estado adaptado na luz; F_S : fluorescência no estado fixo, isto é, a fluorescência não muda enquanto os fatores externos permanecerem constantes, F'_v : fluorescência variável máxima em qualquer estado adaptado na luz; F'_0 : fluorescência mínima em qualquer estado adaptado na luz. *Parâmetros de fluorescência*- q_P : “quenching” fotoquímico e q_N : “quenching” não fotoquímico. Modificado de van Kooten & Snell (1990).

56

Figura 12: Cortes de seções transversais de plantas selvagens (WTSR1) (A), e transgênicas (TR1 e TR2) (B e C, respectivamente), cultivadas em alta luminosidade e coradas com Azul de Toluidina. Aumentos de 100 x.

72

Figura 13: Conteúdo de sacarose ($\mu\text{mol sacarose.mg}^{-1}$ clorofila) de plantas selvagens (WT) e transgênicas (TR1 e TR2). As plantas foram cultivadas em condições de baixa (BL) e alta (AL) luminosidade e as análises foram conduzidas em condições de saturação de CO_2 e com intensidade luminosa de $1000\text{-}1200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Os resultados representam a média de 4 plantas.

94

Figura 14: Conteúdo de amido ($\mu\text{mol amido.mg}^{-1}$ clorofila) de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2). As plantas foram cultivadas em condições de baixa (BL) e alta (AL) luminosidade e as análises foram conduzidas em condições de saturação de CO_2 e com intensidade luminosa de $1000\text{-}1200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Os resultados representam a média de 4 plantas.

96

Figura 15: Folhas mantidas no escuro por 21 dias. WTSR1 ao centro, TR2 à esquerda e TR1 à direita.

101

- Figura 16:** Conteúdo de clorofila total (mg de clorofila/m²) de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas TR1 (CAB1) e TR2 (CAB2), de experimentos de reiluminação. Os dados foram coletados ao final dos 21 dias de escuro (T0), às 6 horas (T1), às 12 horas (T2) e às 24 horas (T3) após a reiluminação e representam a média de 3 plantas. 103
- Figura 17:** Análise de Northern Blot de plantas de experimentos de reiluminação. A análise foi realizada ao final dos 21 dias de escuro e, 24 horas após a reiluminação. Em cada tempo as canaletas obedecem sempre a seguinte ordem: TR1, WTSR1 e TR2. 104
- Figura 18:** Conteúdo de carotenóides do Ciclo das Xantofilas de plantas transgênicas TR1 (□), TR2 (Δ) e selvagens WTSR1 (○) de experimentos de reiluminação. 106
- Figura 19:** Conteúdo de clorofila total (μg de clorofila/ml amostra) de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas TR1 (CAB1) e TR2 (CAB2), de experimentos de transferência de baixa luminosidade para alta luminosidade (BL→AL). Os valores foram coletados do 0° (BL) ao 12° dia em alta luminosidade (AL) e representam a média de 3 plantas. 110
- Figura 20:** Valores da relação clorofila *a/b* de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas TR1 (CAB1) e TR2 (CAB2), de experimentos de transferência de baixa luminosidade para alta luminosidade (BL→AL). Os valores foram coletados do 0° (BL) ao 12° dia em alta luminosidade (AL) e representam a média de 3 plantas. 112
- Figura 21:** Perfil eletroforético de proteínas da membrana do tilacóide de plantas selvagens (WT), TR1 (T1) e TR2 (T2) de experimentos de transferência de plantas cultivadas em baixa luminosidade para alta

luminosidade (BL→AL), corados com Coomassie Brilliant Blue 0,4%. O gel mostra o perfil dos genótipos em alta luminosidade (AL), aos cinco (5d), aos sete (7d) e aos 9 dias (9d) após a transferência para alta luminosidade. A 1ª canaleta corresponde ao marcador de peso molecular (M).	114
Figura 22: Perfil eletroforético de proteínas da membrana do tilacóide de plantas selvagens (WT), TR1 (T1) e TR2 (T2) de experimentos de estresse de frio, corados com Coomassie Brilliant Blue 0,4%. O gel mostra o perfil dos genótipos em baixa luminosidade e submetidos ao estresse de frio (canaletas 1-3), em baixa luminosidade (canaletas 4-6), em alta luminosidade e submetidos ao estresse de frio (canaletas 7-9) e em alta luminosidade (canaletas 10-12). A 1ª canaleta corresponde ao marcador de peso molecular (M).	115
Figura 23: Perfil eletroforético de proteínas da membrana do tilacóide de plantas selvagens (WT), TR1 (T1) e TR2 (T2) de experimentos de reiluminação, corados com Coomassie Brilliant Blue 0,4%. O gel mostra o perfil dos genótipos onde, T0 se refere ao final dos 21 dias de escuro e, T1, T2 e T3 se referem às 6, 12 e 24 horas após a reiluminação. A 1ª canaleta corresponde ao marcador de peso molecular (M).	116
Figura 24: Valores das relações LHCII/CP29, LHCII/OEE e LHCII/CFI α , para plantas transgênicas e selvagens de experimentos de transferência BL→AL.	118
Figura 25: Valores das relações LHCII/CP29, LHCII/OEE e LHCII/CFI α , para plantas transgênicas e selvagens de experimentos de estresse de frio. ..	119
Figura 26: Valores das relações LHCII/CP29, LHCII/OEE e LHCII/CFI α , para plantas transgênicas e selvagens de experimentos de reiluminação.	120

**AVALIAÇÃO DO METABOLISMO FOTOSSINTÉTICO DE
PLANTAS TRANSGÊNICAS DE TABACO (*Nicotiana tabacum*) QUE
EXPRESSAM O GENE *Lhcb1*2* CONSTITUTIVAMENTE EM
CONDIÇÕES DE ALTA LUMINOSIDADE**

Autora: Luciana Santos Rodrigues Costa Pinto

Orientador: Carlos Alberto Labate

RESUMO

A luz é um fator determinante da produtividade das plantas. Entretanto, pode também ser limitante ao funcionamento do aparato fotossintético. Assim, as plantas precisam adaptar-se aos níveis de luz em seu ambiente para preservar e otimizar a funcionalidade do aparato fotossintético. Tais adaptações tornam-se cruciais sob condições onde o fluxo de energia absorvida excede ou limita a capacidade fotossintética. A adaptação do aparato fotossintético à luz requer um delicado e preciso balanço entre a necessidade do uso da luz absorvida para a fotossíntese e a dissipação segura do potencialmente danoso excesso de energia luminosa (Gilmore, 1997).

Apesar da capacidade de aclimação das plantas às condições de luz em seu ambiente ser bastante conhecida e extensivamente descrita, os mecanismos que governam esse processo são ainda desconhecidos (Lindahl et al., 1995; Yang et al., 1997).

A conversão da energia solar em energia química durante a fotossíntese é um evento de membrana, pois os componentes envolvidos na captação de luz, transporte de elétrons e reações enzimáticas, necessárias para a produção de compostos ricos em energia (ATP e NADPH), estão todos ligados à membrana dos tilacóides nos cloroplastos (Anderson & Styring, 1991). As proteínas (Cab) são as mais abundantes proteínas, associadas ao LHCIIb da membrana dos tilacóides de plantas superiores. Esse complexo não é apenas um componente-chave para a captação e transferência de energia luminosa, mas também é essencial para a regulação e distribuição da energia de

excitação dentro do aparato fotossintético em resposta às flutuações de curto e longo prazo na intensidade e qualidade da luz (Anderson & Andersson, 1988). Os polipeptídeos que formam o LHCII são codificados por famílias de multigenes nucleares, os genes *Lhc* (Jansson et al., 1992).

Plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que expressam constitutivamente o gene quimérico *Lhcb1*2* de ervilha (Ko et al., 1992) foram usadas como modelo para estudos de ajustes do metabolismo a curto e longo prazo e mecanismos de aclimação em resposta à alta luminosidade, comumente encontrada em condições de campo. A avaliação do metabolismo fotossintético foi feito através de estudos de assimilação de CO₂, fluorescência da clorofila *a*, fluxo de metabólitos do Ciclo de Calvin-Benson e síntese de açúcares (amido e sacarose), além de estudos de quantificação de pigmentos e carotenóides do Ciclo das Xantofilas, composição de proteínas do LHCII e PSII e alterações anatômicas e estruturais de folhas de tabaco transgênicas (TR1 e TR2) e selvagens (WTSR1).

Os resultados obtidos mostraram que as plantas transgênicas apesar da superexpressão do gene *Lhcb1*2*, são capazes de se adaptar e se desenvolver em condições de alta luminosidade. Isso se deve principalmente, a mecanismos eficientes de fotoproteção via dissipação do excesso de energia absorvida, confirmado pelos maiores valores de NPQ, e também por alterações tanto na estrutura foliar quanto dos fotossistemas na membrana dos tilacóides, que pode ter levado inclusive, a mudanças na biogênese dos cloroplastos.

**ANALYSIS OF THE PHOTOSYNTETIC METABOLISM IN
TRANSGENIC LINES OF TOBACO (*Nicotiana tabacum*) OVER
EXPRESSING THE *Llcb1*2* GENE CONSTITUTIVELY, UNDER
SATURATING LIGHT IRRADIANCE.**

Author: Luciana Santos Rodrigues Costa Pinto

Adviser: Carlos Alberto Labate

SUMMARY

Light is an important component in a plant's productivity. However, it may also be a limiting factor for photosynthesis. Therefore, the plant's capacity to adapt to different light conditions in their environment, is an important adaptive characteristic. The capacity to adjust the photosynthetic machinery is essential under conditions where the flux of absorbed energy exceeds or limits the photosynthetic capacity. The adaptation of the photosynthetic apparatus to the light is dependent upon a precise balance between the necessity for use of the absorbed light and the dissipation of the excess energy (Gilmore. 1997).

Although the capacity of higher plants acclimates to light intensity in their environment is well known and extensively described, the mechanisms which lead this process are still not clear (Lindahl et al., 1995; Yang et al., 1997).

The conversion of solar energy into chemical energy during photosynthesis is a membrane event; the components involved in the absorption of light, electron transport and enzymatic reactions, needed for the production of compounds rich in energy (ATP and ADP), are all linked to the thylakoid membranes in the chloroplasts. (Anderson & Styring, 1991). The cab proteins are the major proteins, associated to the LHCIIB of the thylakoid membrane in higher plants. This complex is not solely a key-compound for the absorption and transfer of light energy, it is also essential for the regulation and distribution of the excitation energy inside the photosynthetic apparatus in response to the short or long term variations in the intensity and quality of light (Anderson & Anderson, 1988). The LHCII polypeptides are coded by nuclear multigene families, the *Lhc* genes (Jansson et al., 1992).

Transgenic tobacco lines (*Nicotiana tabacum*) which overexpress constitutively the chimeric pea gene *Lhcb1*2* (Ko et al., 1992) were used as a model system for the study of the metabolism involved in the mechanism of acclimation in response to high irradiance. The evaluation of the photosynthetic metabolism was done by measurements of CO₂ assimilation, chlorophyll *a* fluorescence, metabolite flux and sugar synthesis (starch and sucrose), along with the determination of pigments and carotenoids of the Xanthophyll Cycle, protein composition of the LHCII and PSII, and alterations in the structure and anatomy of the transgenic tobacco leaves (TR1 and TR2) and wild type (WTSR1).

The results show that although the transgenic plants were able to adapt and develop under high light, mainly due to an efficient mechanisms of photoprotection via dissipation of the excess of absorbed energy, confirmed by the higher values of NPQ and also by the alterations either in foliar structure and in the protein complexes of the thylakoid membranes, leading to changes in the chloroplast biogenesis.

1 - INTRODUÇÃO

A importância do processo fotossintético na produção de alimentos e fibras, além de servir como fonte de energia e esqueletos carbônicos para processos metabólicos celulares, como assimilação do nitrogênio e síntese de proteínas, é incontestável. Contudo, tradicionalmente, o principal objetivo em pesquisas na área de fotossíntese, nos últimos anos, tem sido destinado ao estudo de aspectos funcionais e estruturais de processos de transdução de energia envolvendo a coleta de energia e o transporte de elétrons. Neste sentido, o progresso tem sido significativo e, o processo fotossintético e os complexos protéicos supra-moleculares envolvidos, podem atualmente ser descritos de maneira bastante refinada ao nível molecular, como mostram os trabalhos de Barber et al. (1997 e 1999); Bassi et al. (1997), Dreyfuss & Thornber (1994); Hooper & Eggink (1999); Kühlbrandt et al. (1994); e Peter & Thornber (1991).

Entretanto, pouco se conhece dos processos de aclimação, regulação e de proteção que mantém a eficiência fotossintética alta, mesmo sob flutuações ambientais e condições ambientais estressantes (Lindahl et al., 1997). Desse modo, é importante o estudo dos mecanismos de regulação da expressão de genes que codificam proteínas fotossintéticas associados aos estudos do metabolismo fotossintético e de desenvolvimento de plantas, cultivadas em diferentes condições ambientais (cultivo em baixa e alta luminosidade, transições de baixa para alta luminosidade e vice-versa e transições luz-escuro).

A fotossíntese compreende uma série de reações que se iniciam nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos com a captação da energia solar por um grupo de pigmentos (clorofila *a* e *b*, e carotenóides) complexados às proteínas CAB (“Chlorophyll *a/b* Binding Protein”) e associados ao fotossistema II, formando antenas que são denominadas de LHCII (LHC - “Light Harvesting Complex”) (Andersson & Styring,

1991; Green et al., 1991). O LHCII é a proteína mais abundante da membrana do tilacóide de plantas superiores e não é apenas um componente-chave para a coleta e transferência de energia luminosa mas também é essencial para a regulação e distribuição da energia de excitação dentro do aparato fotossintético em resposta às flutuações de curto e longo prazo na intensidade e qualidade da luz (Anderson & Andersson, 1988). Os polipeptídeos que formam o LHCII são codificados por famílias de multigenes nucleares, os genes *Lhc* (Jansson et al., 1992). Eles são sintetizados no citoplasma e depois importados pelo cloroplasto onde sofrem processamento para serem integrados às membranas dos tilacóides (Green et al., 1991). Como o processo fotossintético e a expressão de proteínas LHC são diretamente afetados por alterações nas condições ambientais, é importante o conhecimento tanto dos mecanismos de aclimação das plantas às constantes variações no ambiente, quanto dos mecanismos de transdução de sinais entre o núcleo e o cloroplasto, para coordenar a síntese e manutenção de proteínas e produtos gênicos secundários que constituem o aparato fotossintético e que estão envolvidos nessa aclimação, de forma que o desenvolvimento e a reprodução das plantas sejam pouco alterados.

Este sistema de coleta e transferência de energia envolve uma série de genes, cujo modelo de herança e herdabilidade são ainda pouco conhecidos, dificultando assim a obtenção de plantas com alterações no conteúdo dos componentes do LHCII por métodos convencionais de seleção e melhoramento (Green et al., 1991). Contudo, o surgimento das técnicas de transformação de plantas e genética molecular tornou possível a modificação do processo fotossintético, através da alteração de um dos seus componentes e, também, permitiu a caracterização dos efeitos desta modificação em plantas consideradas “sistemas modelo” para a sua posterior aplicação em espécies de interesse comercial, em diferentes sistemas de cultivo. Utilizando-se destas técnicas, Ko et al. (1992) obtiveram plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que superexpressam o gene quimérico *Lhcb1*2* de ervilha. A partir destas plantas transgênicas, Real (1997) realizou vários estudos, que mostraram alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas quando comparadas às plantas selvagens. Como os resultados obtidos até o momento, são de plantas que foram cultivadas somente em baixa e média intensidade luminosa, o que propusemos no presente trabalho foi

averiguar se estes efeitos são mantidos quando estas plantas são cultivadas em alta luminosidade, comumente encontrada em campo. Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram:

1) Caracterizar o comportamento de plantas cultivadas em baixa luminosidade e analisadas em alta luz e estudar o efeito do cultivo em alta luminosidade, verificando-se como estas plantas se adaptam e desenvolvem, quais são as alterações na capacidade fotossintética, fluxo de metabólitos do Ciclo de Calvin-Benson e síntese de açúcares: amido e sacarose, produtos finais da fotossíntese. Convém aqui ressaltar que, quando transferimos as plantas cultivadas em baixa luminosidade para a condição de alta luminosidade estamos ainda interessados em conhecer os mecanismos de ajuste do metabolismo a curto prazo, aos quais estão envolvidos o “quenching” da fluorescência da clorofila a , transição de estado (estado 1 - estado2), aumento no estado de redução dos componentes do transporte de elétrons nos tilacóides e Ciclo das Xantofilas. Por outro lado, quando testamos as plantas cultivadas em alta luminosidade, nas mesmas condições, estamos interessados nos mecanismos de aclimação de longa duração que envolvem alterações na expressão gênica e, portanto, complementam o estudo anterior;

2) Caracterizar os efeitos do cultivo em alta luminosidade sobre a morfologia e anatomia foliar, número de cloroplastos por célula e tamanho das células, através de técnicas de microscopia;

3) Considerando-se que o gene quimérico está associado a um promotor forte (35S) (Ko et al., 1992) e que a expressão dos genes *Lhc* seguem um ritmo circadiano, objetivou-se avaliar ainda, de que forma a expressão constitutiva do gene *Lhcb1*2* alterou a expressão de outros genes fotossintéticos através de comparações, por densitometria de géis PAGE-SDS, na composição de pigmentos e proteínas do LHCII e PSII.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Fotossíntese - Conceitos Gerais

Etimologicamente, fotossíntese significa síntese pela luz. A fotossíntese é um dos processos fisiológicos mais importantes na natureza e consiste basicamente da produção de carboidratos a partir de CO_2 , água e energia luminosa (Foyer, 1984).

A capacidade para absorver, controlar e utilizar a energia contida na luz é um pré-requisito primário para a fotossíntese. Os componentes envolvidos na captação da luz, transporte de elétrons e reações enzimáticas, necessárias à produção de compostos ricos em energia (ATP e NADPH), estão todos ligados às membranas dos tilacóides nos cloroplastos e compõem a fase dependente da luz ou fase fotoquímica do processo fotossintético. Nos vegetais superiores, os cloroplastos estão envoltos por uma dupla membrana, conhecida como envelope e no seu interior, os tilacóides estão dispostos em regiões de alta densidade, chamada de grana (membranas empilhadas) e uma outra de baixa densidade conhecida como lamela (membranas desempilhadas do estroma) (Anderson & Styring, 1991). É no estroma que ocorre a síntese de compostos orgânicos que compreende a fase química da fotossíntese a qual é independente da luz solar.

2.2 - Fotossíntese - Aspectos Estruturais

2.2.1 – Composição dos Complexos Protéicos da Membrana do Tilacóide

A membrana fotossintética é provavelmente a mais complexa e engenhosamente construída de todas as membranas biológicas (Albertsson, 1995). As proteínas das

membranas internas do cloroplasto (tilacóides) são constituídas por mais de cinquenta tipos de polipeptídeos (Westhoff et al., 1988) e estão organizadas em quatro complexos supra-moleculares: fotossistema I (PSI), fotossistema II (PSII), citocromo *b₆f* e ATP sintase. Estes complexos apresentam uma assimetria definida ao longo da membrana para realizar adequadamente a coleta de luz e sua distribuição, o transporte de elétrons e prótons e a formação de ATP e NADPH (Foyer, 1984; Anderson & Styring, 1991).

a) Fotossistemas: As plantas superiores possuem dois fotossistemas diferentes, o fotossistema I e fotossistema II (Malkin, 1980). Somente nas últimas décadas começaram a surgir modelos da estrutura dos fotossistemas, e o melhor modelo parece ser o formado por uma região central “core”, onde ocorrem as reações fotoquímicas, envolvido por um complexo pigmento-proteína, formando antenas específicas. Cada fotossistema tem seu próprio complexo de antena que absorve luz em diferentes comprimentos de ondas e ambos são essenciais para a fotossíntese. O fotossistema I (PSI) recebe luz com comprimento de onda de 700nm ou menos, e o fotossistema II (PSII) apenas de comprimento de onda menor que 680nm (Cogdell, 1983). Todas as clorofilas e provavelmente todos os carotenóides que são ativamente envolvidos na fotossíntese estão ligados às proteínas da membrana do tilacóide. As proteínas do aparato fotossintético podem ser classificadas naquelas do "core complex", que são codificadas no plastoma e se ligam aos carotenóides e clorofila *a* (não clorofila *b*) e àquelas da antena periférica que são codificadas pelo núcleo e pós-traducionalmente transportadas para o plastídio, onde se ligam tanto à clorofila *a* quanto à clorofila *b* e carotenóides (Paulsen, 1997). Apesar das centenas de moléculas de clorofilas dos fotossistemas, somente duas moléculas especializadas de clorofila *a*, denominadas P700 e P680, dos centros de reação do PSI e PSII, respectivamente, são capazes de transferir elétrons em cada complexo (Ghanotakis & Yocum, 1990; Anderson & Styring, 1991).

O PSI está localizado principalmente nas regiões não empilhadas da membrana dos tilacóides (Gounaris et al., 1986; Staehelin, 1986; Golbeck, 1988). Ele catalisa a transferência de elétrons da plastocianina à ferredoxina e é formado por vários polipeptídeos entre eles o dímero PSI-A/PSI-B, que é o centro de reação do PSI. O PSI

contém ainda clorofila *a*, quinona e três centros Ferro-enxofre que atuam como receptores de elétrons e são denominados de F_X , F_A e F_B (Hoshina & Itoh, 1993). Bengis & Nelson (1975) mostraram que o “core” do PSI preparado de plantas superiores, contém oito diferentes polipeptídeos, denominados de I a VII. Preparações similares, de uma grande variedade de plantas foram feitas por Munch et al. (1988) e, com base em géis SDS-PAGE mostraram ser compostas de dois grandes polipeptídeos, cujos pesos moleculares variam entre 60-70 kDa e pelo menos nove polipeptídeos menores com massas moleculares aparente entre 1.5 e 22 kDa. Essas proteínas são produto de genes denominados *psa*. Há uma considerável variação no número e tamanho desses pequenos polipeptídeos em diferentes preparações de diferentes espécies (Hoshina & Itoh, 1993). Para a antena coletora de luz do PSI (LHCI) quatro tipos distintos de proteínas foram identificados e os seus genes foram designados *Lhca1* a *Lhca4*. Essas proteínas representam as proteínas CAB ou LHC do fotossistema I (PSI).

O fotossistema II (PSII) é atualmente um dos melhores caracterizados complexos de proteína da membrana (Ghanotakis & Yocum, 1990; Anderson & Styring, 1991). O PSII está localizado preferencialmente nas membranas empilhadas do tilacóide. Apenas uma pequena quantidade do complexo PSII se encontra nas membranas não empilhadas do estroma (Bassi et al., 1997). O PSII é responsável não apenas pela captação da luz e separação de cargas, mas também, cria força redutora pela sua capacidade de oxidar a água. É responsável por muitos dos mecanismos de adaptação e proteção do aparato fotossintético em resposta às variações das condições ambientais, cujas respostas envolvem o rearranjo das membranas dos tilacóides (Ghanotakis & Yocum, 1990; Anderson & Styring, 1991) e que serão discutidos adiante.

Sua estrutura é formada por um complexo multiprotéico com mais de 25 polipeptídeos (Barber et al., 1997), incluindo subunidades estruturais, catalíticas e regulatórias, bem como, muitas proteínas que ligam clorofila, sendo produto de dois genomas, pois contém subunidades codificadas pelo cloroplasto e pelo núcleo (Anderson & Styring, 1991). Em plantas superiores, o PSII é composto de um aparato para a quebra da molécula da água ou evolução de oxigênio, e do “core complex” formando o centro de reação, além do complexo coletor de luz (LHCII). Enquanto todas as proteínas do

sistema de evolução de oxigênio e do LHCII, representado pelas proteínas LHC são codificadas pelo núcleo, todos os outros polipeptídeos do “core complex” são codificados pelo genoma do cloroplasto (Barber et al., 1997).

O “core complex” do PSII é formado pelos seguintes componentes: centro de reação (desprovido do complexo de oxidação da água), citocromo b_{559} e proteínas intrínsecas. O centro de reação é formado de um heterodímero de duas proteínas integrais de membrana, denominadas D1 e D2. A subunidade D1, produto do gene *psbA* do cloroplasto, é rapidamente sintetizada na luz e possui um peso molecular de 38 kDa. A subunidade D2 é produto do gene cloroplastidial *psbD*, possui peso molecular de 39,5 kDa e, como a proteína D1 é altamente conservada. O heterodímero D1/D2 contém todos os componentes redutores necessários para as reações fotoquímicas primárias como os “clusters” de manganês, catalisando a fotoxidação da água, além dos doadores primários (P680) e secundários (Tir Z, Tir D) de elétrons e os receptores primários (Feo) e secundários, as quinonas Q_A e Q_B , que funcionam na reação de estabilização de cargas, no lado redutor do PSII (Ghanotakis & Yocum, 1990; Anderson & Styring, 1991; Barber et al. 1997). A proteína D1 possui como característica bastante marcante uma reciclagem mais rápida do que qualquer outra proteína da membrana do tilacóide. Esta característica está associada ao fato de que o PSII é bastante suscetível ao fotodano e esse pode levar à fotoinibição e redução da eficiência fotossintética (Barber & Anderson, 1992). A degradação, síntese e reinserção da proteína D1 no “core complex” representa um aspecto muito importante na dinâmica do PSII e tem sido bastante estudado pois, esta única propriedade é muito importante na organização estrutural do PSII (Anderson & Aro, 1997). Normalmente a proteína D2 não é rapidamente reciclada e sim apenas sob condições excepcionais de fotoinibição (Barber et al., 1997).

O citocromo b_{559} é composto de dois polipeptídeos de 9 e 4 kDa codificados pelos genes *psbE* e *psbF* que constituem as subunidades α e β do citocromo b_{559} , respectivamente (Ghanotakis & Yocum, 1990; Anderson & Styring, 1991; Christopher & Mullet, 1994) e estão intimamente associadas com as proteínas D1 e D2. Segundo Barber et al. (1997), há muitas especulações sobre a função do citocromo b_{559} mas, a

mais aceita é a de proteção por atuar tanto como receptor quanto doador de elétrons sob condições em que o fluxo de elétrons através do PSII não está otimizado.

As proteínas intrínsecas são conhecidas como CP47 e CP43. Elas são codificadas por genes cloroplastidiais, *psbB* e *psbC*, respectivamente, ligando, cada uma, de 20 a 25 moléculas de clorofila *a* ao “core” do PSII e, participando na captação de luz e transferência de energia ao centro de reação. Também ligam β -caroteno e contém luteína, cuja presença foi confirmada pela análise de preparações do “core” do PSII a partir de gradiente de sacarose (Anderson & Styring, 1991; Bassi et al., 1993; Christopher & Mullet, 1994; Kühlbrandt et al., 1994).

Deleções do gene *psbB* e vários estudos de mutação sítio-dirigida têm enfatizado a importância desta proteína na montagem e funcionamento do PSII. Todas as evidências indicam que a proteína PsbB (CP47) é essencial para o crescimento fotoautotrófico (Barber et al., 1997). As proteínas CP43 e CP47 atuam como antena para o “core” do PSII e ambas mostram-se necessárias para manter a atividade de quebra da molécula da água. Deleções do gene *psbC* (CP43) e suas modificações têm um sério impacto tanto na função de oxidação da molécula de água quanto da montagem do PSII. Todavia, este impacto é menos severo que o causado pela proteína PsbB (Barber et al., 1997).

Associado ao centro de reação do PSII encontramos ainda as proteínas extrínsecas, representadas pelas proteínas de 33kDa, 23 kDa e 16 kDa, produto dos genes nucleares *psbO*, *psbP* e *psbQ*, respectivamente e, localizadas na superfície interna da membrana do tilacóide. Estas proteínas formam o complexo de oxidação da água que é o componente mais termolábil do PSII, cuja função é fornecer elétrons para o $P680^+$, utilizando a molécula de água como doadora de elétrons.

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

b) Citocromo b_6/f : Este complexo se localiza tanto nas membranas empilhadas do grana quanto nas lamelas do estroma dos cloroplastos (Willey & Gray, 1988). O complexo citocromo b_6/f transfere elétrons do “pool” de plastoquinona para a plastocianina e então para o PSI (P700) tendo, portanto uma posição estratégica para a transferência de elétrons entre os dois fotossistemas. Este complexo é composto de citocromo f (33-34 kDa), citocromo b_6 (23 kDa), da proteína ferro-enxofre de Rieske (20 kDa) e uma subunidade IV (17kDa), com função desconhecida. Os genes para a proteína Fe-S de Rieske (*petC*) juntamente com outras três proteínas da cadeia de transporte de elétrons, chamadas plastocianina (*petE*), ferredoxina (*petF*) e FNR (*petH*), estão presentes no genoma nuclear. O complexo citocromo b_6/f é desprovido de pigmentos e além de catalisar a transferência de elétrons entre os fotossistemas, participa da transferência de H^+ do estroma para o interior dos tilacóides. Atualmente, tem sido proposto que o complexo citocromo b_6/f está envolvido no sistema de transdução de sinal que regula a fosforilação de proteínas do tilacóide (Gal et al., 1997).

c) ATPase: O complexo enzimático associado à membrana que é responsável pela síntese de ATP é chamado de fator de acoplamento ou ATPase. O conceito de que a síntese de ATP está “associada” ao fluxo de elétrons através da cadeia de transporte eletrônico é a base da teoria da fotofosforilação. A taxa de síntese de ATP e o transporte de elétrons são portanto interdependentes. Os cloroplastos apresentam um fator de acoplamento que consiste de dois componentes distintos, um complexo proteico hidrofílico chamado CF_1 , e um complexo proteico hidrofóbico chamado CF_0 , formado por quatro diferentes polipeptídeos denominados de subunidades I, II, III e IV. O CF_0 é um componente intrínseco à membrana, formando canais, cuja função está relacionada ao bombeamento de prótons, enquanto a CF_1 localiza-se fora da membrana, em contato com o estroma e é composto por cinco diferentes polipeptídeos, designados de α , β , γ , δ , e ϵ em ordem decrescente de peso molecular (Foyer, 1984; Wettstein et al., 1995). As subunidades α , β e ϵ são codificadas pelo genoma do cloroplasto, bem como as subunidades I, III e IV do canal de prótons. As subunidades γ , δ e II são codificadas pelo núcleo (Wettstein et al., 1995)

A fosforilação está acoplada ao transporte de elétrons via um intermediário comum, o gradiente eletroquímico de prótons. O potencial eletroquímico do gradiente de prótons tem aproximadamente pH 5.0 na base do canal de prótons CF_0 e pH 8.0 no lado da CF_1 em contato com o estroma. A formação deste gradiente de prótons através da CF_1 causa a ativação do fator de acoplamento e síntese de ATP através de mudanças conformacionais no complexo CF_1 - CF_0 o qual converte CF_1 em um sistema ATP sintetisante (Foyer, 1984).

d) Complexo coletor de luz do PSII (LHCII): O LHCII foi descoberto na década de 60 e aparecia como uma banda verde em eletroforese suave de gel de acrilamida com SDS (SDS-PAGE) e foi a base experimental para a descoberta das associações proteínas-clorofilas (Anderson & Styring, 1991). Foram inicialmente denominados de CPII e considerados como entidade funcional do PSII. No entanto, com a descoberta de que não possuíam atividade de transporte de elétrons e que as plantas sem CPII mantinham atividade fotossintética normal, este complexo foi reconhecido como sendo somente coletor de luz e recebeu o nome de LHCII. Atualmente é o componente mais estudado do fotossistema II e sua composição e organização serão descritos à seguir. A Figura 1 mostra um modelo de distribuição topográfica dos quatro complexos supra-moleculares nas membranas dos tilacóides.

2.2.2 - LHCII - Complexo Coletor de luz do PSII

A conversão da energia luminosa em energia química durante a fotossíntese é um evento de membrana pois, como já discutido, os componentes envolvidos na captação da luz, transporte de elétrons e reações enzimáticas, necessárias à produção de compostos ricos em energia (ATP e NADPH), estão todos ligados às membranas dos tilacóides nos cloroplastos (Anderson & Styring, 1991).

A luz é inicialmente absorvida pelo sistema antena associado ao PSII nos tilacóides dos cloroplastos.

O atual conhecimento da estrutura das proteínas do LHC provêm do modelo atômico do complexo LHCII de plantas superiores, determinado a uma resolução de 3,4 angstrôms, realizado por Kühlbrandt et al. (1994) e de conclusões de que esta estrutura fornece um modelo geral do “folding” de todas as proteínas do LHC uma vez que elas possuem várias regiões de seqüências conservadas (Green et al., 1991; Kühlbrandt et al., 1994).

A biogênese deste complexo envolve diferentes compartimentos celulares (Cashmore, 1984; Kuttkat et al., 1995) pois, a apoproteína LHC é codificada no núcleo e transcrita por ribossomos do citoplasma em uma forma precursora. Esta proteína precursora é transportada através da membrana externa e interna do cloroplasto, e o peptídeo trânsito ligado ao terminal amino deste precursor facilita este transporte. Durante ou após a translocação, este precursor é clivado proteoliticamente para originar o polipeptídeo maduro, que é inserido na membrana do tilacóide, onde vai se associar com as clorofilas *a* e *b* e xantofilas. Finalmente os complexos monoméricos proteína-pigmento formam trimeros e são reunidos no fotossistema II. O mesmo procedimento ocorre para o fotossistema I. Muitos destes passos podem ser estudados em sistema *in vitro*, facilitando a análise dos eventos moleculares envolvidos.

Em plantas superiores e algas verdes, o LHCII completo apresenta 5 complexos pigmento-proteína sendo, quatro complexos distintos menores, compostos de proteínas monoméricas, e um sub-complexo LHC maior, formando trimeros com subunidades de 28, 27 e 25 kDa (Peter & Thornber, 1991; Dreyfuss & Thornber, 1994). A Figura 2 mostra um diagrama da biogênese do LHCII, que estão organizados da seguinte forma:

* Complexos menores: LHCIIa conhecido como CP29

(monômeros) LHCIIc conhecido como CP26

LHCII d conhecido como CP24

LHCII e pouco estudado

* Sub-complexo maior: LHCIIb: 28 kDa produto do gene *Lhcb1* – tipo I

(trimeros) 27 kDa produto do gene *Lhcb2* – tipo II

25 kDa produto do gene *Lhcb3* – tipo III

Figura 2: Diagrama esquemático da possível sequência de montagem do LHCII com o centro de reação. O CCII corresponde ao “core complex” do fotossistema II (D1 e D2, citocromo b_{559} e proteínas intrínsecas - CP47 e CP43). Os componentes menores estão representados pelos círculos **a** (CP29), **c** (CP26), **d** (CP24) e **e**, e os componentes maiores do LHCIIb (subunidades de 25, 27 e 28 kDa) estão representados como discos. Adaptado de Dreyfuss e Thornber, 1994.

A CP29 é um polipeptídeo de 257 aminoácidos, ligado a 6 moléculas de clorofila α , duas de clorofila b e 2 a 3 carotenóides, sendo produto do gene *Lhcb4* (a letra b neste caso indica que o gene é relativo ao PSII). A CP29 possui peso molecular 29 e 31 kDa e está diretamente ligada ao centro de reação (Giuffra et al., 1996; Bassi et al., 1997). A CP24, produto do gene *Lhcb6*, é um polipeptídeo de 247 aminoácidos, com peso molecular de 21 kDa, que se associa a 6 moléculas de clorofila α e 3 de clorofila b além de 1 a 2 moléculas de carotenóides (Bassi & Dainese, 1992). Já o complexo CP26

(*Lhcb5*) é uma cadeia polipeptídica de 210 aminoácidos que se liga a 6 moléculas de clorofila *a*, 4 de clorofila *b*, e 3 carotenóides por molécula (Peter & Thornber, 1991; Bassi et al., 1993 e 1997).

Segundo Bassi et al. (1997) a função de regulação da transferência da energia de excitação para o centro de reação do PSII têm sido atribuída a esses três membros (CP29, CP26 e CP24), da família *Lhc*, os quais foram recentemente caracterizadas e mostraram reassociar-se a muitos carotenóides do Ciclo das Xantofilas, sugerindo que os mecanismos de “quenching” não-fotoquímico atuam nessas proteínas.

O sub-complexo maior (LHCIIb) contém metade das clorofilas presentes nos tilacóides: 13 a 15 moléculas de clorofila associadas a cada cadeia polipeptídica, apresentando uma relação clorofila *a/b* de 1,0 a 1,33 (Peter & Thornber, 1991; Bassi et al., 1997) e uma razão clorofila/carotenóide de 5-6. Portanto, sua composição mais provável de pigmentos compreende 8 moléculas de clorofila *a*, 6 de clorofila *b*, 2 de luteínas e 1 de neoxantina. Segundo Bassi et al. (1993), o sub-complexo não contém β -caroteno, e contém baixos níveis de violaxantina. Os trimeros do sub-complexo maior são formados por duas subunidades de 28 kDa e uma de 25 kDa e também por duas subunidades de 28 kDa e uma de 27 kDa. Os genes do tipo I não contém introns e têm um alto grau de homologia; enquanto os do tipo II e III contém introns e codificam proteínas com maiores divergências (Jansson, 1992).

Segundo Barber et al. (1997) o LHCII completo é denominado de antena externa ou móvel e as subunidades menores (monômeros) constituem a antena primária ou interna e o sub-complexo maior (trimeros) a antena secundária ou periférica. As proteínas CP43 e CP47, que estão associadas às proteínas D1 e D2, podem funcionar como um sistema antena mais interno do LHCII (Bassi et al., 1997; Barber et al., 1997; Gilmore, 1997).

Segundo Peter & Thornber (1991), o modelo para a formação do LHCII é o seguinte: os complexos menores CP29 (LHCIIa), CP26 (LHCIIc) e CP24 (LHCIIId), estão muito perto do centro de reação, e ligam diferentes trimeros do sub-complexo maior (LHCIIb), compostos de duas subunidades de 28 kDa e uma de 25 kDa (população proximal) e duas subunidades de 28 kDa e uma de 27 kDa (população

distal). O trimero que contém apenas as subunidades de 27 kDa e 28 kDa estão localizados mais distantes do centro de reação, e são as subunidades mais fortemente fosforiladas. Este modelo é mostrado a seguir:

Figura 3: Modelo esquemático do LHCII. O esquema apresenta a organização relativa dos complexos pigmento-proteína e as associações com o centro de reação (CCII). As subunidades CP29, CP26 e CP24 estão representadas respectivamente pelas letras **a**, **c** e **d**, enquanto os sub-complexo maior estão indicados como trimeros, com os pesos moleculares de suas subunidades (kDa). Adaptado de Peter & Thornber (1991).

A montagem do LHCII também necessita de aproximadamente 7 moléculas de clorofila *a*, 6 de clorofila *b*, 2 de luteína e conteúdos não estequiométricos de violaxantina e neoxantina (Kühlbrandt et al., 1994), e o mecanismo que coordena esta síntese e acúmulo é bastante complexo. Sabe-se no entanto que nem clorofila nem xantofilas seriam necessárias para a síntese do LHCII, mas os pigmentos ligantes,

principalmente a clorofila *b*, seriam responsáveis pela estabilização das apoproteínas e montagem do complexo (Plumley & Schmidt, 1995). A análise de mutantes-nucleares de *Chlamydomonas* incapazes de sintetizar clorofilas ou xantofilas, revelaram que as proteínas LHCII tem um papel importante na síntese dos pigmentos, sendo que a síntese e acúmulo de neoxantina estão ligadas aos passos finais da integração das proteínas LHCII no tilacóide, e mutantes deficientes na síntese de clorofila *b*, apresentaram inserção incorreta destas proteínas no tilacóide, indicando que a biogênese do LHCII inclui eventos interdependentes da síntese e montagem dos pigmentos, que ocorre durante a integração das proteínas nas membranas do tilacóide.

2.3 - Regulação da Expressão Gênica das Proteínas LHC do Complexo Coletor de Luz do PSII (LHCII)

O cloroplasto de plantas superiores contém várias centenas de proteínas que são direta ou indiretamente envolvidas nos processos de conversão fotossintética de energia (Andersson & Barber, 1994). Todavia, a natureza complexa deste processo fundamental requer que o cloroplasto, como uma organela celular dinâmica, possa sofrer mudanças estruturais e também na sua composição para propiciar uma flexibilidade funcional. Os níveis de equilíbrio para todas as diversas proteínas do cloroplasto pode portanto ser visto como um balanço entre sua biosíntese/montagem e degradação. Todavia, as taxas de “turnover” de diferentes proteínas pode ser marcadamente diferente, e pode também variar consideravelmente dependendo do estágio ou condição fisiológica de uma planta em particular (Andersson & Aro, 1997). A compreensão de como todo esse mecanismo dinâmico é regulado é importante para que possamos estabelecer as bases do processo de aclimação das plantas.

Com relação à expressão dos genes fotossintéticos, os genes da família *Lhc*, que codificam proteínas do sistema antena do PSII, são os mais estudados e a sua expressão é bastante complexa. Esses genes têm expressão célula-específica (Edwards & Coruzzi, 1990), regulada por ciclo-circadiano (Anderson & Kay, 1997; Piechulla, 1993), regulada

pelo estágio de desenvolvimento (Brusslan & Tobin, 1992), por hormônios (Chang & Walling, 1991), açúcares (Jang & Sheen, 1994), fotorregulada por luz azul (Marrs & Kaufman, 1991) e fitocromo (Karlin-Neumann et al., 1988).

A luz é o principal estímulo para organismos fotossintetizantes e, portanto, é nela que enfocaremos a regulação da expressão gênica. Ela é um fator primordial para o crescimento normal das plantas não só por fornecer energia para a fotossíntese, mas também por fornecer sinais que regulam o desenvolvimento das plantas. Mudanças induzidas pela luz proporcionam a base para grandes mudanças em diferentes fases do desenvolvimento da planta (Carré & Kay, 1995). Esta idéia é melhor ilustrada utilizando-se o exemplo de plântulas previamente germinadas no escuro e que são em seguida expostas à uma condição de luminosidade. As folhas iniciam a produção de clorofila, convertendo plastídios precursores conhecidos como etioplastos em cloroplastos fotossinteticamente ativos, ao mesmo tempo em que se incrementa a produção de proteínas codificadas pelo núcleo (Anderson & Kay, 1997; Carré & Kay, 1995).

A regulação dos genes *Lhc* do fotossistema II tem sido muito estudada em plantas superiores e sabe-se que é regulada pela luz tanto na transcrição como pós-transcrição. O primeiro passo em todos os processos fotocontrolados é a absorção da luz por um fotorreceptor. Segundo Anderson & Kay (1997), as plantas possuem pelo menos três sistemas fotorreceptores para percepção e resposta às mudanças no comprimento de onda e na fluência da luz em seu ambiente, que são definidos pelos comprimentos de onda absorvidos por esse fotorreceptor: (1) a família de fotorreceptores que absorvem luz vermelha ou vermelho-longo, os fitocromos (Furuya, 1993); (2) fotorreceptores azuis/UV-A, também chamados de criptocromo (Ahmad & Cashmore, 1993); e (3) fotorreceptores UV-B (Senger & Schmidt, 1994).

Apesar do conhecimento da estrutura e composição dos fitocromos, pouco se sabe a respeito de como o sinal luminoso é manipulado para dar origem às mudanças na expressão de determinados genes, após sua efetiva absorção pelo fotorreceptor (Nagy et al., 1988). Entretanto, parece pouco provável que o fotorreceptor module diretamente a transcrição do DNA ou estabilidade do mRNA, pois não há evidências da

existência de um sítio de ligação específico para o fitocromo no DNA, sugerindo, então, que os caminhos para a transdução de sinais contém passos iniciais comuns e a subsequente amplificação destes, levando a diferentes respostas. Os fotorreceptores interagem entre si de uma maneira complexa, e a fotoconversão de dois ou mais é necessária para a obtenção do nível máximo de expressão (Anderson et al., 1995; Anderson & Kay, 1997).

O modelo geral adotado para o papel da luz na regulação da transcrição é que os fotorreceptores geram sinais, que são transduzidos via um intermediário para ativar os fatores de transcrição ligados às suas seqüências dentro de regiões regulatórias dos genes. Muitas revisões têm sido feitas sobre as seqüências responsáveis pela resposta à luz nos promotores destes genes, principalmente os *Lhcs*, e entre elas as de Nagy et al. (1988); Anderson et al. (1994) e Anderson & Kay (1997), e foram identificados vários elementos que agem em *cis*, que são reconhecidos por seqüências específicas de fatores protéicos que agem em *trans*, indicando uma interação complexa através de vários mecanismos.

Além da regulação pela luz da transcrição e pós-transcrição do gene *Lhc*, as proteínas LHC também sofrem esta regulação na pós-tradução. Os principais passos da pós-tradução na biossíntese destas proteínas são a importação do cloroplasto, o processamento após a importação, a inserção na membrana do tilacóide, formação de complexos com os pigmentos, processamento proteolítico e montagem correta no fotossistema. Vários destes passos são regulados direta ou indiretamente pela luz, através dos fitocromos, dos protoclorofilídeos e dos fotorreceptores azul/UV-A. Os protoclorofilídeos possuem absorção máxima na região tanto do azul quanto do vermelho. O critério para distinguir entre ação de fitocromo ou protoclorofilídeo é a resposta reversível do fitocromo ao vermelho-longo. A fotoconversão do protoclorofilídeo leva à síntese de clorofila e formação de cloroplastos verdes contendo fotossistema I e II. Então o protoclorofilídeo pode ser considerado um receptor de luz pois, sua fotoconversão, além de alterar drasticamente o metabolismo da planta, também é necessária para a formação do aparato fotossintético (Terzaghi & Cashmore, 1995).

O primeiro passo que necessita indiretamente de luz é a importação da proteína pelo cloroplasto, pois este processo necessita de ATP. Após entrar no cloroplasto o polipeptídeo precisa ser transportado até as membranas dos tilacóides e isto depende da atividade do estroma, que é induzida durante o desenvolvimento dependente de luz do plastídio. A inserção do polipeptídeo precursor do LHCII no tilacóide é precedida de um processamento proteolítico. A inserção dos polipeptídeos LHC nos tilacóides também é acompanhada pela ligação com pigmentos, cuja síntese e acúmulo são regulados pela luz. A clorofila não é só importante para a estabilidade, organização correta e integração das proteínas LHC no fotossistema, como também para o acúmulo de outras proteínas envolvidas na estrutura do fotossistema II como a CP47 e a D1 (Mullet et al., 1990). Desse modo, os cofatores necessários para a organização do LHCII são clorofila *a*, clorofila *b* e xantofilas, onde o processo de acúmulo de clorofila *b*, que é fortemente dependente da luz, tem um papel fundamental para determinar qual polipeptídeo LHC será acumulado e qual será degradado (Real, 1997).

A regulação pela luz dos genes *Lhc* não se restringe apenas a intensidade e fluência luminosa. Os ciclos luz/escuro também são bastante importantes para a compreensão dos mecanismos de coordenação da expressão de genes regulados pela luz.

A regulação temporal de funções biológicas é de particular importância em plantas que têm que responder ao seu ambiente *in situ*. Assim, muitas funções de plantas exibem ritmos de atividade em resposta às mudanças diárias no seu ambiente. Funções celulares e fisiológicas que continuam a oscilar ritmicamente sob condições ambientais constantes, em um período de aproximadamente 24 horas, são chamadas de ritmos circadianos e estão sob o controle de um relógio circadiano endógeno (Anderson e Kay, 1997). A regulação através do relógio circadiano serve para sincronizar e otimizar processos celulares e fisiológicos em antecipação às mudanças periódicas no ambiente da planta.

Mavian (1729) citado por Anderson & Kay (1997), foi o primeiro a demonstrar a natureza endógena dos ritmos circadianos quando observou que os movimentos rítmicos de *Mimosa* persistiam mesmo na ausência de ciclos de luz/escuro. Os genes *Lhc* também exibem um ritmo (ou ciclo) circadiano, ou seja, sofrem alterações independente da

indução do ambiente em um período de 24 horas que é manifestado na transcrição e pós-transcrição (Piechulla, 1993). Assim, quando as plantas são expostas a regimes alternados de luz/escuro, o padrão de expressão dos genes *Lhc* oscilam até a adaptação ao novo ambiente. Segundo Anderson & Kay (1997), o estudo da regulação dos genes *Lhc* serve como excelente sistema modelo para a investigação das rotas de fototransdução e ciclo circadiano regulando a transcrição gênica.

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

Segundo Kay (1993) o paradigma proposto para as rotas de fototransdução e ciclo circadiano que regulam a transcrição dos genes *Lhc* envolvem os fotorreceptoreses como pode ser visto na Figura 4, e estão assim estabelecidos: sinais luminosos mediados por fitocromo e receptores de luz azul regulam os vários aspectos do desenvolvimento fotomorfogênico de plântulas de dicotiledôneas, incluindo inibição da elongação do hipocótilo, expansão foliar e diferenciação do cloroplasto. Rotas de sinais partindo desses fotorreceptoreses para o relógio também devem existir regulando a fase e o período de oscilação circadiana na expressão dos genes *Lhc*. Além disso, as vias de sinais mediadas pelo fitocromo e fotorreceptoreses de luz azul regulariam positivamente a expressão do gene *Lhc* via controle da transcrição. O relógio circadiano subsequentemente regula o momento oportuno da expressão do gene *Lhc*, gerando um oscilador circadiano na transcrição do gene. O relógio circadiano funciona desse modo como um regulador permissivo da transcrição do gene *Lhc*, permitindo a indução da transcrição do gene *Lhc*, pelo fitocromo durante um certo período do dia.

Apesar do ritmo circadiano estar bem estabelecido para muitas espécies da divisão Angiosperma, esta oscilação não está presente nas Gimnospermas, subdivisão Coniferofitina, onde a maquinaria para a expressão circadiana parece ter sido perdida

Figura 4: Modelo proposto para as vias de fototransdução e ritmo circadiano que regulam a transcrição do gene *Lhc*. Adaptado de Anderson e Kay (1997).

durante a evolução. Ao contrário das Angiospermas, as Coniferofitinas são capazes de sintetizar clorofila independentemente da luz, e estas são fundamentais para a organização do complexo LHC. Desse modo, a expressão dos genes *Lhc*, regulada pelo ritmo circadiano seria desnecessária. O mesmo argumento é usado para algumas espécies de Briófitas que também sintetizam clorofila no escuro e não apresentam ritmo circadiano para o gene *Lhc*. A partir destes resultados, Oberschmid et al. (1995), propuseram que em espécies de plantas que possuem a síntese de clorofila dependente da luz, é necessário o controle circadiano dos genes *Lhc* para otimizar a formação do complexo antena (LHC) e, plantas capazes de sintetizar clorofila no escuro, não precisam do controle circadiano para a expressão dos genes *Lhc*.

As condições luminosas no ambiente da planta mudam constantemente. Organismos fotossintetizantes compensam as mudanças na intensidade de luz alterando a abundância de componentes específicos do aparato fotossintético (Escoubas et al., 1995). Este fenômeno de fotoaclimação requer do organismo a capacidade de sentir

diferenças na intensidade luminosa, converter o sinal à informação bioquímica, e transferir a informação para elementos regulatórios responsáveis pela expressão gênica. Fotoaclimação leva especificamente a mudanças na abundância dos complexos antena (LHCs) e distintamente difere de processos do desenvolvimento induzidos pela luz, como, por exemplo, o aparecimento da coloração verde de cloroplastos, em que as mudanças são repetidamente reversíveis e ocorre em células completamente diferenciadas (Escoubas et al., 1995).

Algumas evidências sugerem que as respostas de fotoaclimação são transduzidas via sinais metabólicos que se originam do aparato fotossintético e são referidas como “redox control” da transcrição gênica. Recentemente foi demonstrado que o estado de redução do “pool” de plastoquinona, que é governado pela taxa de excitação dos centros de reação fotossintética, regula a expressão de genes fotossintéticos (Dunford & Falkowski, 1997; Anderson et al., 1995; Escoubas et al., 1995). Com esse propósito, segundo Herrera-Estrella & Simpson (1990), estudos dos mecanismos de regulação da expressão de genes que codificam proteínas fotossintéticas associados aos estudos do metabolismo fotossintético, tem-se ampliado nos últimos anos.

2.3.1 - Aclimação de Plantas Superiores em Condições de Alta e Baixa Luminosidade

O potencial produtivo de uma cultura está associado ao aproveitamento da energia luminosa e sua eficiência fotossintética. Como o processo fotossintético e a expressão de proteínas LHC são diretamente afetados por alterações nas condições ambientais, o conhecimento dos mecanismos de aclimação das plantas a constantes variações na intensidade de luz, temperatura, disponibilidade hídrica, entre outros, de tal forma que o desenvolvimento e a reprodução das plantas sejam pouco alterados, é de extrema importância.

Falkowski e LaRoche (1991), definiram a fotoaclimação como mudanças fenotípicas reversíveis na atividade e/ou concentração de enzimas ou outras moléculas

biossintéticas, tais como complexos proteína-pigmento e componentes do transporte fotossintético de elétrons, para compensar mudanças na irradiância espectral, independente dos processos de desenvolvimento da planta.

Plantas de sombra ou plantas de baixa luz têm mais clorofila *b* e maior número de complexos antenas do PSII e PSI para maximizar a captura de luz. Este aumento nos componentes da antena coletora de luz ocorre às custas do transporte de elétrons, fotofosforilação e componentes da fixação do carbono, particularmente Rubisco, resultando em menores taxas fotossintéticas que saturam à baixas irradiâncias (Anderson et al., 1995). Contrariamente, sob sol ou alta luz, as plantas são limitadas no transporte de elétrons ao invés de captura de luz e conversão: elas possuem grande quantidade do complexo citocromo *b₆f*, ATP sintase, plastoquinona, plastocianina, ferredoxina, e mais enzimas da fixação do carbono, para suportar altas taxas fotossintéticas as quais saturam a altas irradiâncias (Anderson & Osmond, 1987). Essas modulações na composição, organização e funcionamento do aparato fotossintético são tão bem reguladas que, as taxas da relação clorofila *a/b* de folhas servem como índice simples da intensidade de luz de aclimação: elas são linearmente relacionados aos conteúdos do complexo citocromo *b₆f*, ATP sintase e Rubisco, e inversamente relacionadas com conteúdos de LHCII e LHCI (Anderson et al., 1988) e membranas empilhadas (Anderson & Aro, 1994). Apenas P680 e P700 não são proporcionais às taxas de clorofila *a/b*. A Figura 5 mostra as comparações do tamanho da antena e conteúdo de carotenóides do ciclo das xantofilas por unidade do PSII, de plantas adaptadas à sombra e ao sol.

Todos os organismos têm, em vários graus, a capacidade de ajustar os fluxos metabólicos em resposta às variações ambientais. A aclimação fisiológica requer rotas de transdução de sinais e mecanismos de “feedback” que ligam a expressão gênica às mudanças no ambiente (Durnford e Falkowski, 1997). Como a luz é um dos fatores ambientais mais importantes para organismos fotossintéticos, as plantas superiores precisam adaptar-se aos níveis de luz em seu ambiente para otimizar e preservar a função do aparato fotossintético. Tais adaptações tornam-se cruciais sob condições onde o fluxo de luz absorvida excede grandemente ou limita a capacidade fotossintética. Isto porque a adaptação do aparato fotossintético para ambientes com luz requer um delicado

e preciso balanço entre a necessidade do uso da luz absorvida para a fotossíntese e a dissipação segura do potencialmente danoso excesso de energia luminosa (Gilmore, 1997).

Figura 5 : Desenho comparativo da distribuição de carotenóides e proteínas do LHCII por unidade do PSII, de plantas adaptadas à sombra e ao sol. Adaptado de Gilmore, 1997

As plantas possuem mecanismos fotoprotetores e fotoadaptativos em vários níveis (Björkman e Demmig-Adams, 1994). Segundo (Kloppstech, 1997) plantas de carvalho crescendo em áreas abertas, podem desenvolver uma forma que é notavelmente diferente de uma crescendo em uma densa população de outras árvores de mesma altura. Enquanto essa mudança fotomorfogênica, regulada via fitocromo (Smith, 1993), é manifestada apenas após longo tempo, outras podem ocorrer dentro de minutos à horas. Consequentemente, uma distinção deve ser feita entre a adaptação e respostas de curto-prazo. Assim, investigações do efeito da luz na expressão de genes fotossintéticos que promovem respostas rápidas são de grande interesse; todavia, a adaptação também se reflete no efeito da luz na maquinaria de expressão gênica (Kloppstech, 1997) e, portanto, são também de extrema importância.

Isso permite reforçar que, plantas superiores têm a capacidade de ajustar a composição e organização da membrana do tilacóide em resposta às mudanças de curto

e longo prazo na intensidade e qualidade da luz incidente (Anderson & Andersson, 1988; Andersson & Barber, 1994) e que, a exposição de plantas à intensidades luminosas que são maiores do que aquelas requeridas para saturar a fotossíntese levam à fotoinibição do PSII e conseqüente diminuição da eficiência fotossintética (Prasil et al., 1992). Nesse sentido, as plantas têm evoluído mecanismos de curto e longo prazo para minimizar estes efeitos e se proteger contra os danos oxidativos foto-induzidos. As estratégias de curto-prazo envolvem: síntese e substituição de proteínas danificadas do centro de reação (Aro et al., 1993); decomposição enzimática de espécies de oxigênio reativo (Asada, 1994); efeitos protetores dos carotenóides e eventos associados com a ativação do ciclo das xantofilas (Demmig-Adams, 1990); envolvimento do citocromo b_{559} na transferência de elétrons dentro do centro de reação do PSII (Andersson & Barber, 1994) e fosforilação e desassociação da subpopulação externa da antena do PSII (LHCII) (Anderson & Andersson, 1988).

As respostas de aclimação de longo-prazo requerem a síntese e o acoplamento de novos componentes da membrana e a degradação de outros. Estes eventos envolvem: variação no conteúdo de tilacóide por cloroplasto (Anderson, 1986); diferentes proporções entre grana e lamelas do estroma (Anderson, 1986); mudanças na estequiometria entre os dois fotossistemas e variação no tamanho da antena do PSII (Anderson & Andersson, 1988).

2.3.2 - Estratégias de Curto-Prazo e Longo-Prazo para a Aclimação à Alta Luminosidade

Exposição de plantas às altas intensidades luminosas levam à redução da capacidade fotossintética seguida pela liberação de pigmentos como clorofilas e carotenóides e pode ainda levar a aumentos na peroxidação de lipídios devido a danos causados pelo acúmulo de oxigênio. O aumento na concentração do oxigênio em cloroplastos sob alta luz ocorre devido à sua produção pelo PSII (quebra da molécula de água). Isto pode resultar na liberação de intermediários reativos como radicais

superóxido, radicais de hidroxila, peróxido de hidrogênio e oxigênio no estado metaestável (Adamska, 1997). Para manter o seu funcionamento normal, sob condições de estresse de luz, os cloroplastos possuem sistemas múltiplos de proteção e reparo (Andersson e Aro, 1997).

Os carotenóides do ciclo das xantofilas presentes no LHCII, como mostrado na Figura 5, representam um mecanismo de proteção contra a foto-oxidação induzida em condições de alta luminosidade. A conversão de xantofilas dependente da luz, que ocorre em plantas superiores, é conhecida como ciclo das xantofilas (Eskling & Akerlund, 1998). Sob condições de alta luminosidade violaxantina é convertida em zeaxantina, via uma intermediário, a anteraxantina. Em condições de baixa intensidade luminosa a reação é revertida. A ausência de função estava associada a este ciclo até que Demmig et al. (1987) encontrou uma correlação entre formação de zeaxantina e o decréscimo na reemissão de luz absorvida pela clorofila, isto é, “quenching” não-fotoquímico da fluorescência.

Os carotenóides funcionam como pigmentos acessórios para a coleta de luz além de desempenharem o importante papel na proteção dos cloroplastos (Sharma & Hall, 1993). Segundo Bjorkman (1987a), a zeaxantina atua como um competidor para a energia de excitação sob excessiva luz, uma vez que um aumento na dissipação da radiação de baixa energia, à qual Demmig-Adams et al. (1990) sugeriram estar associada à zeaxantina, resultou em um decréscimo na eficiência fotoquímica. A capacidade para a rápida remoção desse competidor (zeaxantina) para a energia de excitação facilita o rápido aumento na eficiência fotoquímica de conversão de energia, quando ocorre o retorno às condições sob as quais a luz não é mais excessiva. Evidências para a função fotoprotetora da zeaxantina são baseadas em experimentos realizados usando um inibidor da formação de zeaxantina ou um organismo desprovido do Ciclo das Xantofilas (Sharma & Hall, 1993). Outras funções que estão sendo sugeridas para zeaxantina são, proteção contra estresse oxidativo de lipídeos; participação em respostas de receptores de luz azul; afetar a fluidez da membrana do tilacóide e, atuar como um intermediário na rota biossintética do hormônio vegetal ABA, o qual desempenha

funções no desenvolvimento de sementes e em resposta à estresses ambientais (Havaux et al., 1998).

Sharma (1990) observou que pode haver uma certa limitação no papel do ciclo das xantofilas como um mecanismo de proteção contra a fotoinibição. Tal conclusão foi devido ao fato de que, apesar de ter ocorrido um aumento no conteúdo de zeaxantina após o tratamento de fotoinibição a $1600 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 5°C , este aumento não foi verificado quando as plantas foram mantidas a $2500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, apesar da fotoinibição por si só ter aumentado. O aumento no conteúdo de zeaxantina e decréscimo em violaxantina foi observado a 20°C onde a fotoinibição observada não foi tão grande como a 5°C . Isto sugere que: (1) mudanças no ciclo das xantofilas são dependentes da temperatura. Sob condições de resfriamento a dissipação do excedente de energia pelos carotenóides é menor do que a 20°C resultando em grande dano para a fotossíntese a 5°C ; (2) Com altas irradiâncias (maior do que $1600 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), não há aumentos adicionais no conteúdo de zeaxantina sugerindo uma limitação na dissipação da energia excedente pelas xantofilas.

A indução de proteínas específicas de estresse de luz, as ELIPs (“Early Light Induced Proteins”) também pode ser considerada como parte dessas respostas protetoras (Adamska, 1997). As ELIPs são membros da família de genes *Lhc* e compartilham propriedades comuns com as proteínas LHC (Andersson e Aro, 1997). Como discutido acima, a degradação do LHCII, induzida em condições de alta luz, pode levar à liberação de clorofilas (Asada, 1996). A proteção contra os danos induzidos por clorofilas livres acredita-se, envolver a participação de ELIPs (Lindahl et al., 1997). Foi proposto que estas proteínas podem estar envolvidas na associação transiente com pigmentos durante a biogênese ou desmontagem de complexos clorofila-proteína (Adamska et al., 1993; Lindahl et al., 1997).

Recentemente, tem se discutido a natureza fotoprotetora dos carotenóides livres (Havaux et al., 1998). Sob condições de estresse de luz e temperatura, observa-se um aumento no conteúdo de carotenóides que são fracamente ou não associados ao LHCII e diminuição no tamanho funcional da antena do PSII. Desse modo, segundo Havaux et al. (1998) em plantas adaptadas à alta luminosidade, alguns carotenóides perderiam

permanentemente sua função normal de pigmentos acessórios que se refletiria em uma nova organização espacial dos pigmentos da antena à extrema luz e temperatura. A longo prazo, os pigmentos da antena seriam rearranjados com proteínas ELIPs, que teriam seu acúmulo induzido pela luz. As ELIPs, por terem homologia com polipeptídeos do LHC (Green e Kühlbrandt, 1995), funcionariam como substitutos dessas proteínas, quando as plantas estivessem crescendo sob condições de luz potencialmente danosas (Adamska e Kloppstech, 1994). Possivelmente a fotofísica de associações ELIPs-xantofilas difeririam de associações LHC-xantofilas (Havaux et al., 1998).

Outro mecanismo de adaptação às condições de luminosidade envolve a redistribuição da energia de excitação absorvida, entre os dois fotossistemas. Fosforilações do LHCII, induzidas pela alta luminosidade, causam o redirecionamento da função de coleta de luz do PSII para o PSI (Allen & Nillson, 1997) da seguinte forma: No estado não fosforilado, o LHCII é encontrado associado ao PSII. Essa situação, denominada estado I (Allen et al., 1981 e Allen & Nillson, 1997), ocorre quando o “pool” de plastoquinona está largamente oxidado devido à baixa taxa de atividade do PSII relativo ao fluxo de elétrons via PSI para a fixação do carbono ou em tilacóides adaptados ao escuro. Com o aumento da relação plastoquinona reduzida/plastoquinona oxidada (PQH_2/PQ), quinases associadas ao tilacóide são ativadas e os polipeptídeos do LHCII são fosforilados em seus segmentos N-terminais do estroma e parte da antena móvel do LHCII se dissocia do PSII diminuindo a absorção de luz (Larsson et al., 1987). Essa situação é chamada de estado II.

Além dos mecanismos de transição de estado, há um mecanismo funcionalmente semelhante, porém mais lento, cuja regulação ocorre pelo estado de redução das quantidades relativas de PSI e PSII. Este mecanismo à longo-prazo compensando para uma utilização desigual da luz pelos dois fotossistemas envolve um aumento na quantidade relativa de PSII sob iluminação favorecendo o PSI, e um aumento na quantidade relativa de PSI sob iluminação, favorecendo o PSII (Allen & Nillson, 1997). Portanto, a estequiometria dos fotossistemas é alterada. Plantas adaptadas à sombra ou baixa luminosidade tem valores da relação PSII/PSI menores (1.0-1.3) devido às poucas

unidades do PSII com largas antenas coletoras de luz, enquanto plantas adaptadas ao sol ou alta luminosidade têm valores da relação PSII/PSI maiores (1.8-2.4) e mais unidades do PSII com antenas menores, em relação ao PSI (Anderson et al., 1995).

A quantidade de LHCII e de grana aumentam nas plantas cultivadas em condições subsaturantes de luz para compensar a sua limitação e possibilitar que as plantas mantenham fluxos eficientes de elétrons nas membranas dos tilacóides (Andersson e Styring, 1991; Andersson et al., 1995). A exposição destas plantas à luz excessiva promove, tanto a fosforilação de determinadas proteínas do sistema antena do PSII (LHCII), levando à transições de estado (estado 1-estado 2) (Gal et al., 1997; Durnford e Falkowski, 1997), quanto à expressão de proteínas nucleares que degradam especificamente componentes móveis do LHCII, reduzindo o tamanho da antena do PSII (Lindahl e Andersson, 1992). A degradação dos polipeptídeos do LHCII após a transferência de plantas aclimatadas em baixa luminosidade para alta luminosidade, parece ser mediada pela atividade de proteases, induzidas por fosforilações controladas pelo estado de redução (“redox control”) da antena móvel, e mais especificamente da subunidade de 25 kDa da antena externa (Lindahl et al., 1995; Yang et al., 1995; Andersson e Aro, 1997; Lindahl et al., 1997). Convém aqui ressaltar que segundo Andersson e Aro (1997), a degradação de proteínas é um processo biológico complicado e altamente específico que mostra um alto grau de regulação. A maquinaria para a biodegradação requer várias enzimas combinadas com componentes e reações enzimáticas regulatórias adicionais. A descoberta de proteases do cloroplasto homólogas à proteases bacterianas, tais como ClpAP e FtsH, tem fornecido informações para caracterização dos mecanismos de reciclagem de proteínas (Lindahl et al., 1995 e 1997; Andersson e Aro, 1997).

O “redox control” da expressão gênica da transcrição e tradução também tem sido proposto para a síntese do LHCII (Escoubas et al., 1995) e para a tradução do mRNA do gene *psbA* que codifica para a proteína D1 do centro de reação do PSII (Danon e Mayfield, 1994; Mayfield et al., 1995). No primeiro caso, o estado reduzido do “pool” de plastoquinona e a fosforilação do LHCII, que ocorrem no cloroplasto, são considerados sinais na expressão dos genes *Lhc* codificados pelo núcleo (Escoubas et al.,

1995). No segundo caso, parece que a tioredoxina pode atuar na associação entre as reações de luz da fotossíntese (de ambos PSII e PSI) e na tradução *in vivo* de mRNAs do gene *psbA*. A tioredoxina reduzida ou a associação tioredoxina-proteínas direciona a redução de proteínas associadas aos mRNAs de *psbA* promovendo a subsequente tradução da proteína D1. Esta regulação parece envolver ainda a fosforilação de um componente ativador da tradução por uma proteína quinase solúvel (Mayfield et al., 1995).

Assim, considerando que a luz é o principal estímulo fotossintético e que a qualidade e a quantidade de luz influenciam a expressão dos genes *Lhc*, pesquisas direcionadas para o entendimento dos mecanismos de transdução de sinais entre o núcleo e o cloroplasto, envolvidos na aclimação das plantas à ambientes com diferenças na luminosidade (transições alta-baixa luz e vice-versa) bem como outros estímulos ambientais, são essenciais para entender como a planta integra esses estímulos múltiplos simultaneamente para coordenar a síntese e manutenção de milhares de proteínas e produtos gênicos secundários que constituem o aparato fotossintético.

2. 4 - Fluorescência da Clorofila *a*

A energia luminosa que é absorvida pelas moléculas que compõem o sistema coletor de luz dos fotossistemas I e II (LHCI e LHCII- “Light Harvesting Complex”) é, em parte, transferida aos centros de reação dos fotossistemas, onde ocorrem as primeiras reações fotoquímicas e, em parte é perdida como calor ou por emissão de fluorescência (Krause & Weis, 1991).

À temperatura ambiente, a fluorescência da clorofila é originada das moléculas de clorofila *a* associadas ao fotossistema II (PSII). Estudos de quantificação da fluorescência da clorofila *a*, fornecem uma série de informações sobre o funcionamento do aparato fotossintético bem como os mecanismos de regulação do transporte de elétrons nos tilacóides e da fixação do CO₂ no estroma. Quando um quanta de luz atinge a superfície foliar, é captado pelo sistema antena associado ao PSII, composto de

proteínas (LHC) associadas às clorofilas *a*, *b*, xantofilas e carotenos. A energia transferida para o PSII é utilizada na excitação das moléculas de clorofila *a* que perdem um elétron para a Quinona A (Q_A). Com a perda desses elétrons tem-se a formação de um forte agente oxidante que promove a quebra da molécula de água, liberando elétrons que serão transferidos do PSII para o PSI, gerando ATP e NADPH. O fluxo contínuo de elétrons nas membranas dos tilacóides promove uma diminuição da fluorescência da clorofila. Caso ocorra alguma restrição no transporte de elétrons, a Q_A permanece no estado reduzido (Q_A^-) não sendo capaz de promover qualquer reação fotoquímica. Assim, a Q_A^- fica impossibilitada de transferir ou receber elétrons da clorofila *a* e, como consequência, tem-se a dissipação do excesso de energia na forma de fluorescência (685 nm) (Krause & Weis, 1991). Dessa forma, pode-se concluir que, em condições ótimas para a realização da fotossíntese, a proporção de energia luminosa absorvida que é emitida na forma de calor ou como fluorescência é baixa. Já em condições ambientais desfavoráveis, aumenta a emissão de energia na forma de calor e/ou fluorescência, provocando de-excitação da energia luminosa absorvida.

A relação inversa entre fluorescência da clorofila *in vivo* e atividade fotossintética, foi primeiramente observada e descrita por Kautsky e pode ser usada para estudar a atividade fotossintética potencial das folhas e para detectar os efeitos de estresses em plantas. Um sinal típico de indução da fluorescência em luz contínua é conhecido como “Efeito Kautsky”, onde após um pico ou um máximo de fluorescência, acontece um declínio, denominado “quenching”. Normalmente a extensão do “quenching” é expressa por coeficientes que variam de 0 a 1, indicando a proporção diminuída da fluorescência máxima (Krause & Weis, 1991). Vários mecanismos contribuem para esta diminuição da fluorescência e a compreensão dos componentes do mesmo fornece informações importantes sobre o estado funcional do aparato fotossintético.

A produção de fluorescência *in vivo* é diminuída por dois mecanismos diferentes denominados mecanismos de “quenching” (Krause & Weis, 1991). A metodologia de análise desenvolvida por Schreiber et al. (1986) permite analisar a diminuição (“quenching”) da intensidade da fluorescência da clorofila em componentes

fotoquímicos (q_P) e não fotoquímicos (q_N) (Figura 10). O componente fotoquímico ocorre devido à competição com as reações fotoquímicas, e depende da presença da Q_A no estado oxidado. O q_P indica então a proporção de energia de excitação transferida da antena para o centro de reação do PSII, ou seja, reflete o estado de oxidação da Q_A (Schreiber et al., 1986). A reoxidação da Q_A^- causa o “quenching” fotoquímico (Krause & Weis, 1991). Por outro lado, $1-q_P$ representa a extensão relativa de redução da Q_A . Todavia, a fluorescência pode ser diminuída por mecanismos não diretamente relacionados com o estado de redução da Q_A . Tais mecanismos, são denominados de “quenching” não fotoquímico ou q_N .

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

O “quenching” não fotoquímico ou q_N pode ser causado *in vivo*, sob condições fisiológicas, por vários fatores (Bilger & Schreiber, 1986; Quick & Stitt, 1989; Genty et al., 1989; Krause & Weis, 1991 e Buschmann, 1995):

- a) “Quenching” dependente de energia (q_E): O q_E está relacionado com a acidificação do lúmen do tilacóide que ocorre na luz e à formação de ΔpH entre o lúmen do tilacóide e o estroma.
- b) “Quenching” de transição (q_T): ocorre devido à perda de energia na transição do estado 1-estado 2. É regulado pela fosforilação do LHC-II.
- c) “Quenching” fotoinibitório (q_I): Está relacionado com a inibição da fotossíntese por iluminação com extremas intensidades de luz.
- d) “Quenching” de F_0 : Considera a diminuição da fluorescência de F_0 atribuída às mudanças de transferência de energia no sistema da antena coletora de luz.

O “quenching” não fotoquímico representa a perda de energia por outros meios do que por fluorescência da clorofila ou por processos fotoquímicos, resultando num

aumento da produção de calor (Buschmann, 1995). Como consequência, o aumento do q_N produz uma redução na capacidade de transferência de energia do PSII para os demais componentes do sistema de transporte de elétrons.

A eficiência quântica do transporte de elétrons do PSII (ϕ_{PSII}), é determinada pela eficiência com que um quantum absorvido pode alcançar um centro de reação e a proporção de centros de reação que são capazes de transferir um elétron para um receptor num determinado momento (Genty et al., 1989). Assim, de acordo com a metodologia proposta por Genty et al. (1989), a eficiência de transferência de elétrons do PSII, ϕ_{PSII} pode ser estimada pelo produto: $q_P \times F'_V/F'_M$, onde F'_V/F'_M representa a eficiência de captura da energia de excitação pelos centros de reação do PSII em folhas adaptadas na luz (Figura 10).

A exposição prolongada de folhas à intensidades de luz onde a energia de excitação excede a capacidade de dissipação ordenada pelo sistema fotossintético pode levar à fotoinibição (Bjorkman, 1987a; Krause et al., 1990). A fotoinibição é caracterizada pelo decréscimo na eficiência de utilização de fótons pelo PSII e é observada quando (i) folhas adaptadas à sombra ou crescendo em baixa luminosidade são expostas à alta luminosidade (Bjorkman, 1987a; Sharma & Hall, 1993) e (ii) folhas de plantas de sol são expostas a estresses ambientais adicionais como uma desfavorável alta ou baixa temperatura (Mishra et al., 1991), déficit de água (Genty et al., 1987) e estresse salino (Sharma & Hall, 1993). Sob essas condições um nível de luz qualquer, o qual foi previamente considerado não excessivo torna-se inibitório porque a utilização de energia pela fotossíntese decresce pela condição adicional de estresse (Genty et al., 1987; Sharma & Hall, 1993).

Segundo Crofts & Yerkes (1994), a diminuição da fluorescência é uma estratégia fisiológica para ‘descarregar’ a energia de excitação como calor antes que cheguem ao centro de reação do PSII. Dessa forma, as plantas podem proteger a si próprias contra o excesso de luz através de mudanças nas rotas de dissipação através de um mecanismo que leva à diminuição da fluorescência e é geralmente chamado de quenching não-fotoquímico ou q_E .

Há duas hipóteses diferentes a respeito do mecanismo de q_E , relacionado principalmente ao local onde ocorre a dissipação de energia, no centro de reação ou na antena. A hipótese relacionada ao centro de reação propõe que o efeito da diminuição do pH causa a liberação da ligação do Ca^{2+} , e isto inibe o lado doador e também aumenta o potencial de redução do lado receptor, promovendo a recombinação de cargas entre o P_{680}^{+} e a Q_A^{-} . A energia liberada pelo PSII é dissipada como calor. Há poucas dúvidas de que este mecanismo possa ocorrer no PSII, mas permanece a questão se este é realmente o mecanismo do q_E , ou se é apenas outra forma de inativação ou dano do PSII sob condições de estresse. A outra hipótese, relativa à antena, está baseada na associação do LHCII aos carotenóides conhecidos como xantofilas, em particular à violaxantina. A violaxantina é importante com relação ao q_E , pois condições que induzem o q_E também causam a sua de-epoxidação, formando a zeaxantina, e há fortes correlações entre a formação da zeaxantina e a extensão do “quenching” (Horton et al., 1991).

Como já mencionado, sob excesso de luz a violaxantina é convertida à zeaxantina através da via intermediária da anteraxantina, e esta reação é revertida em condições de baixa luminosidade. Esta sequência reversível é denominada de ciclo das xantofilas e os carotenóides que participam são apenas os presentes na membrana fotossintética, e sofrem mudanças rápidas induzidas pela luz (Król et al., 1995; Demmig-Adams & Adams, 1996). Segundo Ruban et al. (1997), a zeaxantina também tem sido encontrada estimulando a agregação de isolados maiores de LHCII, acompanhado por diminuição (“quenching”) de fluorescência, enquanto violaxantina inibiu a agregação e causou elevada fluorescência. O baixo pH no lúmen dos tilacóides, promoveria ainda mudanças estruturais nas proteínas do sistema antena. O papel dessas mudanças na organização do LHCII seria manter próximas a zeaxantina e a clorofila para uma eficiente transferência de energia entre essas duas moléculas. Alternativamente, a presença de zeaxantina (e anteraxantina) poderia induzir mudanças estruturais necessárias para a perda de energia, na forma de calor, diretamente da clorofila (Crofts & Yerkes, 1994; Demmig-Adams & Adams, 1996).

2.5 - Metabolismo do Carbono e Fotossíntese

Conceitos de controle dentro de sistemas fotossintéticos têm sido discutidos em termos de regulação de duas seqüências de reações independentes e espacialmente separadas. Há os processos de transporte de elétrons e ciclo de redução do carbono, ocorrendo na membrana do tilacóide e no estroma, respectivamente. O primeiro é composto de dois fotossistemas operando seqüencialmente para realizar a redução do NADP^+ , dirigida pela luz, com a concomitante produção de um gradiente de prótons. Este é usado para gerar ATP. NADPH e ATP produzidos dessa forma são consumidos durante a assimilação e redução do CO_2 à açúcares. A relação produtor-consumidor entre o transporte de elétrons e a assimilação de CO_2 garante o seu acoplamento seguro em virtude da ciclagem de intermediários. Todavia, a regulação *in vivo* é complicada pela necessidade de conciliar os conflitantes requerimentos das reações dos tilacóides e as enzimas do estroma (Foyer, 1993).

Em termos de regulação metabólica, o processo fotossintético pode ser considerado consistindo de dois conjuntos de reações distintas que colaboram para que o processo como um todo permaneça eficiente e estável. No contexto do cloroplasto, o processo fotossintético pode ser dividido em (1) reações de membrana, que convertem a energia luminosa em energia química, temporariamente armazenada na forma de ATP e NADPH e, (2) reações do estroma que usam este ATP e NADPH para direcionar a redução do CO_2 a açúcar-fosfato. Essas últimas reações são denominadas de Ciclo de Calvin-Benson (Foyer, 1993). O Ciclo de Calvin-Benson pode ser dividido em três fases e a primeira consiste da carboxilação catalisada pela enzima ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco). Esta enzima está localizada no cloroplasto, sendo formada por oito subunidades menores, codificadas por uma pequena família de multigenes nucleares, os genes *rbcS*, e oito subunidades maiores, codificadas por genes cloroplastidiais, *rbcL*. A enzima catalisa o primeiro passo da competição entre a redução fotossintética do carbono e o ciclo de fotorrespiração. A segunda fase é a redutora, onde o ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA) é convertido à triose fosfato (TP), catalisado pela fosfoglicerato quinase e pela gliceraldeído fosfato desidrogenase dependente de NADP^+

(NADP-GAPDH). A terceira fase é a de regeneração da RuBP que é catalisada por uma série de enzimas: triose fosfato isomerase, aldolase, frutose 1,6-bifosfatase, sedoheptulose 1,7-bifosfatase, transquetolase, ribose 5-fosfato isomerase, ribose 5-fosfato 3-epimerase e ribose 5-fosfato quinase (Leegood, 1990).

Várias interações ocorrem entre as reações de assimilação e os processos fotoquímicos e ambos participam da reciclagem dos “pools” de ATP e NADPH. Além disso, as reações de luz alteram grandemente o ambiente estromal em termos de pH, estado iônico e potenciais de oxido-redução. Todos esses exercem influência sobre as vias de redução do carbono, através da modulação de componentes enzimáticos. O principal objetivo da regulação metabólica dentro do cloroplasto é garantir o fornecimento de ATP e NADPH, numa correta estequiometria, para direcionar a assimilação do carbono. Por essa razão, a taxa de reciclagem de NADPH e ATP para a via de redução do CO₂, tem efeito retroinibitório no Δ pH e no estado de redução dos componentes do sistema de transporte de elétrons. Estes por sua vez, controlam a fotoquímica do PSII, a taxa de transferência de elétrons entre os fotossistemas e a atividade de enzimas associadas à membrana tais como a ATPase, Ferredoxina-NADP redutase e proteínas quinase do tilacóide (Foyer, 1993; Mitra et al., 1993).

A estratégia de construção de plantas transgênicas com decréscimos progressivos na quantidade de certas enzimas, para se estudar sua regulação e influência no processo fotossintético, tem sido usada para várias enzimas do Ciclo de Calvin, como por exemplo: Rubisco, NADP-GAPDH, aldolase plastidial e frutose 1,6-bifosfato plastidial. Com relação à Rubisco, plantas transgênicas de tabaco contendo diferentes quantidades de Rubisco foram cultivadas em intensidade de luz moderada ($300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), medindo-se a taxa fotossintética. Os resultados mostraram que não houve redução significativa da fotossíntese quando a Rubisco diminuiu até 40% do conteúdo de plantas selvagens pois, esta diminuição foi compensada por um aumento na ativação da Rubisco, que passou de 60 para 100%. Este aumento na ativação pode ser explicado da seguinte maneira: o decréscimo no nível da Rubisco altera o balanço entre o fornecimento e uso de 3-PGA e a diminuição desta aumentaria a relação ATP/ADP. Como a ativação da enzima necessitaria da ação de outra enzima, a Rubisco ativase, cujo

processo é estimulado pelo ATP, o aumento da relação ATP/ADP é o responsável direto pelo aumento da ativação da Rubisco. Um decréscimo maior da quantidade da enzima inibiu fortemente a assimilação de CO_2 e foi acompanhado pela diminuição da atividade de outras enzimas como a frutose 1,6-bifosfatase (Quick et al., 1991). Quando estas plantas foram cultivadas em alta intensidade luminosa ($1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), a taxa de assimilação de CO_2 foi reduzida em 63% nas plantas transgênicas, independente da pressão parcial intercelular de CO_2 (Hudson et al., 1992). Foi proposto então que a quantidade da Rubisco nas plantas é cerca de 40% acima do necessário para impedir a limitação da fotossíntese, o que representa um investimento da planta em cerca de 15% do total das proteínas da folha, e este “excesso” estaria desativado pela descarbamilação, com uma menor contribuição do decréscimo do carbono inorgânico, Ci , ou da relação RuBP/PGA (Quick et al., 1991; Stitt & Sonnewald, 1995).

Com relação às outras enzimas, os estudos mostraram que a fotossíntese em condições ambientais não é afetada com uma diminuição de duas vezes na NADP-GAPDH e apresenta pouca inibição com uma redução cerca de três vezes da FBPase plastidial. Estes resultados mostram que os passos enzimáticos irreversíveis da regeneração da RuBP, não exercem um controle maior na taxa de fotossíntese, e apesar da enzima pFBPase ser bem regulada, esta regulação destina-se a manter o Ciclo de Calvin mais do que controlar a fotossíntese (Stitt & Sonnewald, 1995).

Durante a fotossíntese, a maioria do carbono fixado é exportado para o citosol como triose-fosfato (TP) e convertido à sacarose, liberando fosfato inorgânico (Pi). Este Pi retorna ao cloroplasto em troca por mais TP que deve ser precisa. A taxa de síntese de sacarose deve estar ajustada de maneira que quantidade suficiente de Pi seja liberada para manter sua concentração no estroma e permitir que as reações ocorram eficientemente no estroma e tilacóide, caso contrário a fotossíntese pode ser inibida. A fotossíntese será também inibida se houver uma retirada muito rápida de TP, pois isto leva a uma diminuição dos metabólitos do Ciclo de Calvin-Benson (Stitt, 1987; Stitt et al., 1988). A regulação da síntese de sacarose também pode interferir no fracionamento dos fotossintatos permitindo que a síntese de amido seja maior. A Figura 6 relaciona o Ciclo de Calvin-Benson e a síntese de amido e sacarose.

A influência do acúmulo de carboidratos na taxa de fotossíntese sempre teve um grande interesse, pois uma demanda inadequada pode diminuir a assimilação de CO₂. A curto prazo sabe-se que o acúmulo de sacarose leva a uma desativação da enzima SPS (sacarose-fosfato sintase) e aumento de Fru 2,6-P₂ (frutose 2,6-bisfosfato), resultando em uma diminuição da sacarose, menor reciclagem de Pi no cloroplasto, e mais metabólitos armazenados como amido no cloroplasto (Stitt, 1987; Stitt & Quick, 1989). Isto se processa da seguinte maneira: durante o acúmulo de sacarose ocorre um aumento de Fru 2,6-P₂ de cerca de duas vezes e este aumento leva a uma restrição na síntese de sacarose, pois diminui a atividade da enzima Fru 1,6-bisPase (frutose 1,6-bisfosfatase), elevando o nível de triose-fosfato no citosol e mais fotossintatos são retidos no cloroplasto e convertidos em amido. O mecanismo que causa o aumento da Fru 2,6-P₂ pode envolver outros fatores como, o aumento da relação Fru 6P,2-Kinase/Fru 2,6-Pase e também a participação de outra enzima, a SPS (sacarose-fosfato sintase) que, catalisa a penúltima reação da síntese de açúcar e apresenta um papel central na formação da sacarose. Então, esse controle preciso da Fru 1,6-bisPase só é eficiente se existir um mecanismo análogo nas reações subsequentes, onde a hexose fosfato é convertida à sacarose (Figura 6) (Stitt, 1987; Stitt & Quick, 1989). Esta regulação a curto prazo da partição durante o fotoperíodo ocorre sem que a fotossíntese seja inibida, mas uma inibição mais severa da síntese de sacarose pode levar à uma limitação da fotossíntese por Pi.

Desse modo, a coordenação precisa das taxas de reações previne oscilações contínuas no fluxo de metabólitos, permitindo a otimização de recursos, e já conferindo um grau de flexibilidade que é essencial para evitar o efeito prejudicial da luz em perigosas e constantes variações ambientais (Foyer, 1993).

Como já mencionado, a fotoaclimação requer a coordenação da expressão gênica do núcleo e cloroplasto de modo que se possa sintetizar centros de reação (produto de genes do cloroplasto) e complexos antena (produto de genes nucleares). Nos últimos anos, com o acúmulo de evidências sugerindo que os componentes do transporte de elétrons do cloroplasto regulam a expressão gênica do núcleo e do plastídio (Escoubas et al., 1995; Durnford & Falkowski, 1997; Anderson et al., 1995), toda

alteração no metabolismo da planta entre eles a fixação do carbono, o metabolismo de carboidratos e a assimilação de nutrientes influenciam o “feedback” fotossintético e pode alterar o estado de redução dos componentes da cadeia de transporte de elétrons e dessa forma, alterar a expressão dos genes *Lhc*. Nesse sentido, segundo Champigny & Foyer (1992), a assimilação do NO_3^- , em milho, favorece a desfosforilação de proteínas LHC da membrana do tilacóide.

Figura 6: Esquema simplificado do Ciclo de Calvin-Benson e da síntese de amido e sacarose

Em *Dunaliella* as mudanças nos níveis de RNAm do gene *Lhc* codificado pelo núcleo em resposta a inibidores específicos do transporte de elétrons no cloroplasto demonstram que deve existir um sinal entre o plastídio e o núcleo (Durnford & Falkowski, 1997).

O papel do estado de redução da ferredoxina/tioredoxina dentro do cloroplasto está bem estabelecido para a regulação da atividade de enzimas do Ciclo de Calvin-Benson (Buchanan, 1991). Atualmente, segundo Danon & Mayfield (1994), a Tioredoxina tem sido implicada na regulação traducional do transcrito *psbA* (proteína D1) codificado pelo núcleo, em *Chlamydomonas*. Neste estudo, um complexo protéico reduzido pode ser induzido a se associar à região 5' não-transcrita do mRNA de *psbA* por redução do extrato com DTT ou com preparações de tioredoxina reduzida.

Portanto, o transporte de elétrons fotossintético é sensível à muitos estímulos metabólicos celulares e ambientais além da luz. Desse modo, o entendimento das interações entre o “feedback” regulatório e as diversas rotas de transdução de sinais envolvidas na aclimação à luz e outros fatores ambientais é essencial para a completa compreensão dos processos celulares como um todo e, segundo Durnford & Falkowski (1997), estão apenas na sua infância. A Figura 7 mostra um modelo resumido que está sendo proposto para a interação entre o metabolismo celular e fotossintético no controle da expressão gênica do núcleo e do cloroplasto.

2.6 - Intercepção da Luz e Arquitetura da Membrana do Tilacóide

Os plastídios de plantas superiores existem em uma variedade de formas, estrutura e função. Eles estão envolvidos no metabolismo energético, atividades de armazenamento e reprodução de plantas. Os cloroplastos contendo clorofila são uma forma especializada para a coleta de luz e habilitam as plantas a utilizar a energia solar para a fixação do carbono e para a produção de moléculas altamente energéticas envolvidas no metabolismo celular (Possingham, 1980).

Figura 7: Modelo proposto para as interações entre o metabolismo celular e fotossintético no controle da expressão gênica do núcleo e do cloroplasto. Adaptado de Durnford & Falkowski (1997).

Como já mencionado, a luz é o mais importante estímulo para o desenvolvimento das plantas não só por fornecer energia para o processo fotossintético mas também sinais que regulam o desenvolvimento das plantas. Neste sentido, as plantas superiores adotam várias estratégias para maximizar a interceptação desse estímulo tão importante - a luz solar.

Segundo Loomis & Gerakis (1975), estudos em sistemas agrícolas, tais como o milho e a soja, mostram que as taxas de produção, pelo menos nos estádios iniciais do

cultivo, são uma função linear da interceptação da energia luminosa. Nos estádios de desenvolvimento posteriores, esta interceptação torna-se mais complexa devido ao aumento da densidade foliar. Assim, é possível aumentar a produtividade das culturas através do melhor uso da energia solar pelas folhas.

As plantas superiores adotam várias estratégias para maximizar a interceptação da luz, que é dependente da disposição do tecido fotossintético, ou seja, da orientação e morfologia foliar, em relação à radiação incidente. Segundo Critchley & Russell (1993), a interceptação luminosa pode ser influenciada de diferentes formas em quatro níveis de organização da planta. O primeiro nível de organização é a copa foliar, onde o hábito da planta e a estrutura da copa em termos de orientação da folha em direção à luz incidente, espaço ocupado pelas folhas e sombreamento são os mais importantes. O segundo nível refere-se à estrutura e anatomia da folha, as camadas do tecido foliar e a disposição dos cloroplastos nas camadas celulares. O terceiro nível seria representado por células individuais do tecido, nos seus aspectos estruturais e funcionais. Segundo os autores, vários estudos evidenciam a possibilidade de auto-sombreamento por cloroplastos em células individuais. E, o quarto nível de organização é representado pela adaptação às diferentes intensidades e qualidades luminosas em termos de dinâmica e heterogeneidade da membrana do tilacóide.

Gradientes luminosos, tanto em termos de quantidade como qualidade, são muito importantes pois sua existência sugere a ocorrência de auto-sombreamento. É bastante reconhecida a ocorrência de sombreamento em árvores e outras espécies com extensas copas. Estas apresentam várias camadas de folhas, inclusive com diferenças na coloração, que tornam-se conhecidas por suas propriedades de sol ou de sombra. Carter et al. (1990), estudando espécies de mangue mostraram que cerca de 85% da densidade de fluxo de fótons (PPFD) incidente no topo da copa foi atenuada dentro do primeiro metro e várias características fotossintéticas tais como saturação luminosa, máxima taxa fotossintética e ponto de compensação luminoso foi alterado nas folhas, de acordo com o decréscimo na irradiância. Este sombreamento, a localização da folha e sua orientação com respeito à radiação incidente além da ocorrência de ventos que mudam o posicionamento espacial das folhas, exige da planta o que vários autores chamam de

flexibilidade (Pearcy, 1990; Carter et al., 1990; Critchley & Russell, 1993). A flexibilidade é requerida para maximizar a interceptação de fótons e manter efetiva habilidade para a utilização destes.

Em termos de planta como um todo, os cloroplastos sofrem variações diárias, sazonais e climáticas na irradiância. Entretanto, em termos de folha existem alguns trabalhos que mostram a ocorrência de gradientes de luz (Terashima & Saeki, 1983 e 1985; Vogelmann et al., 1989). Terashima & Inoue (1984 e 1985a e b) mostraram que em espécies tais como *Camellia japonica* L., *Spinacia oleracea* L. e *Glycine max* L., os cloroplastos em diferentes tecidos da folha tem características fotossintéticas e morfológicas distintamente diferentes. Estas características e as diferenças entre elas são semelhantes àquelas encontradas em plantas de sol e de sombra. As células do parênquima paliçádico, na parte superior, contém cloroplastos semelhantes aos de plantas adaptadas à alta luminosidade (tipo-sol) e às células do mesófilo esponjoso, na parte inferior, contém cloroplastos semelhantes aos de plantas adaptadas a baixa luminosidade, ou seja, do tipo-sombra. Leverenz (1988), sugeriu que o sombreamento mútuo de cloroplastos nas folhas não decresce apenas o conteúdo de luz absorvida mas também altera respostas de determinações de curvas de luz. Estes experimentos também mostraram que, pelo menos nas espécies analisadas, o tempo mínimo para a reaclimação à nova irradiância foi de 24 horas. Segundo os autores, o movimento dos cloroplastos nas células e/ou alterações na ultra-estrutura dos cloroplastos podem ser responsáveis por estas mudanças.

Em algas tem-se sugerido que o número e o arranjo dos cloroplastos pode levar a um grau de auto-sombreamento que é efetivo na prevenção da fotoinibição (Sealey et al., 1990). Além disso, a possibilidade de síntese de amido diferenciada em regiões do tecido foliar podem (Walker, 1976; Edwards & Walker, 1983) indicar uma heterogeneidade do ambiente luminoso, dentro da célula. Por outro lado, é claramente evidente em algumas espécies que as respostas a luminosidade pelos cloroplastos levam a um posicionamento específico dos cloroplastos dentro das células. Por exemplo, em *Alocasia*, a alta luminosidade leva os cloroplastos a se posicionarem linearmente nas paredes anticlinais (paralelas ao sentido de incidência dos raios luminosos) das células

do parênquima paliçádico e do mesófilo enquanto, sob condições de baixa luminosidade os cloroplastos acumularam-se ao longo das paredes periclinais das células (Chow et al., 1988b). Mais recentemente, Park et al. (1996) trabalhando com plantas de ervilha e *Tradescantia albiflora* também encontraram características anatômicas semelhantes após tratamentos com alta luminosidade, e demonstraram que o movimento dos cloroplastos induzidos por alta luminosidade realmente ajudou a proteger o PSII do estresse de alta luz e por essa razão, segundo os autores, deveria ser considerado uma estratégia fotoprotetora para aclimação das plantas a essas condições.

Segundo Critchley & Russell (1993), teoricamente, se não experimentalmente, as observações de sombreamento podem ser estendidas até mesmo ao nível de grana, e desse modo começa-se a reconhecer os vários níveis de heterogeneidade estrutural e funcional dos tilacóides, fornecendo a chamada flexibilidade para responder às rápidas mudanças no ambiente. Isso nos faz levantar algumas questões para se entender um pouco mais sobre a dinâmica da membrana do tilacóide. Convém aqui ressaltar que muitos trabalhos referem-se à dinâmica da membrana dentro de um modelo estático, ou seja, o termo “dinâmica” é utilizado para descrever mudanças na transferência de energia, estados de fosforilação ou ainda estequiometria de fotossistemas além da migração do LHCII do grana para a lamela do estroma (estado 1-estado 2). Atualmente, o termo “dinâmica” é aplicado não apenas para descrever as alterações acima citadas mas, também, ao movimento e rearranjo da membrana do tilacóide *per se* (Critchley & Russell, 1993).

Segundo Miller & Lyon (1985), o empilhamento dos grana é a mais intrigante característica da estrutura da membrana do tilacóide e sua função não é entendida. Experimentos *in vitro* sugerem que tilacóides empilhados absorvem menos luz que os desempilhados (Jennings & Zucchelli, 1985). Vários autores sugerem que o empilhamento da membrana é um mecanismo para a proteção das plantas dos efeitos danosos de irradiâncias excessivas (Maenpaa et al., 1987; Aro et al., 1990; Hundal et al., 1990). Talvez estes autores considerassem a camada superior do grana atuando como “óculos de sol” reduzindo o nível efetivo de irradiância e alterando a qualidade de luz entregue aqueles centros de reação presentes nas pilhas inferiores do grana.

No que se refere à possibilidade de auto-sombreamento das lamelas do grana, Critchley & Russell (1993), afirmam que se a resposta for sim, deve-se assumir que as camadas de tilacóides nos grana não são verticalmente homogêneas assim, do topo dos grana às membranas inferiores de tilacóides adaptados à alta luminosidade, a distribuição lateral de complexos transportadores de elétrons e fotossistemas não é a mesma.

Park & Sane (1971), foram os primeiros a sugerir a diferenciação lateral da membrana do tilacóide baseados em estudos de distribuição de partículas em regiões empilhadas e não empilhadas. Eles sugeriram que as lamelas do estroma contém apenas PSI e que o grana contém ambos fotossistemas. Mais suporte foi dado à estas sugestões quando Staehelin (1976) mostraram que o não-empilhamento das membranas do tilacóide induzido por baixo conteúdo de sais, levou a aleatorização de partículas ao longo da membrana. Estes resultados contribuíram para a formulação do modelo de Barber (Barber, 1980), que sugeriu que a antena coletora de luz do PSII (LHCII) está envolvida não apenas nos mecanismos de transição de estado (estado 1-estado 2), mas também no processo de empilhamento das membranas do grana.

Além da heterogeneidade de distribuição lateral do PSI e PSII foi encontrada heterogeneidade entre centros do PSII (Melis & Homann, 1976; Graan & Ort, 1986; Chylla & Whitmarsh, 1989), devido a existência de centros de PSII inativos. Foram encontradas duas populações distintas de PSII, com diferentes atividades de absorção de luz e diferentes localizações dentro da membrana, denominadas de α e β -centros. Os α -centros localizam-se no grana e os β -centros residem com o PSI nas regiões expostas ao estroma. A distinção física entre os dois tipos de PSII foi o tamanho do LHCII associado a eles (Sundby et al., 1986) e à deficiência do “pool” de plastoquinonas associados aos β -centros. Segundo Abadia et al. (1985), essas duas populações de PSII são na verdade, etapas do desenvolvimento dos centros ativos do PSII onde, os β -centros, que não possuem o LHCII periférico, são convertidos em α -centros pela adição de LHCII e de um “pool” funcional de plastoquinonas e, em seguida, ocorre a formação do grana pela interação dos complexos LHCII. Andreasson et al. (1988) também descobriram heterogeneidade em centros do PSI e, encontraram pequenas mas ativas populações de

α -centros de PSI em frações do grana. Recentemente, Albertsson et al. (1992) e Albertsson (1995) propuseram domínios de organização dos fotossistemas nas membranas dos tilacóides que é consistente com as evidências de heterogeneidade lateral.

Evidências experimentais mostram ainda que entre os fotossistemas ativos também há heterogeneidade e que a distribuição de clorofila entre eles é desigual. Em folhas de plantas adaptadas ao sol a distribuição de clorofilas é 60% no PSII e 40% no PSI (Anderson & Osmond, 1987). Em espécies adaptadas à sombra este desbalanço é ainda muito mais marcado. Cloroplastos de sombra possuem maior empilhamento do grana e o empilhamento pode estar relacionado ao desbalanço relativo de clorofila entre os dois fotossistemas. É possível ainda que se encontre nestes empilhamentos do grana uma grande proporção de LHCII desassociada de seus centros de reação (Critchley & Russell, 1993). E, segundo Graan & Ort (1986), se há mais LHCII do que centros de reação do PSII então é possível que este LHCII “extra” funcione principalmente no empilhamento do grana e não como coletor de luz. Validando essas idéias, Kühlbrandt (1990), também encontrou unidades destacadas (não associadas ao centro de reação) dentro da membrana do tilacóide formando possivelmente trímeros. Estes aspectos são bastantes relevantes para plantas de sombra por funcionar como um meio de fornecer flexibilidade para se adaptar a mudanças nos níveis de irradiância de fótons. Assim, sob baixa luminosidade essas unidades triméricas poderiam se associar a PSII ativos e maximizar a interceptação de luz. Entretanto, uma vez que há esta flexibilidade e adaptabilidade no tecido e em toda folha, vários estudos são necessários para se entender o mecanismo que governa essa flexibilidade.

Desse modo, sistemas fotossintéticos são finamente sintonizados e tão bem regulados que, em plantas não estressadas, operando no ambiente as quais estão adaptadas, trabalham próximo à sua eficiência máxima mesmo em ambientes sob limitada luminosidade. De fato, o papel do rearranjo tridimensional da membrana do tilacóide na regulação da distribuição de energia é demonstrado pelas variações na extensão do empilhamento dos grana em espécies adaptadas ao sol e à sombra, onde

ambas apresentam alta eficiência quântica com relação a adaptação à luz de diferentes qualidade e quantidade (Critchley & Russell, 1993).

Métodos experimentais e de análise mais sofisticados são requeridos para provar a ocorrência de auto-sombreamento e sua relevância para a eficiência quântica da fotossíntese neste nível molecular.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Material Utilizado e Condições de Cultivo

As sementes de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), variedade Petit Havana SR1, transgênicas e selvagens, foram, gentilmente doadas pelo Prof. Kenton Ko, do Departamento de Biologia da Universidade de Queen's, Kingston, Canadá. As sementes de tabaco transgênico (TR1 e TR2) originaram-se de plantas transformadas, via protocolo de discos foliares, com linhagens de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Essas linhagens continham o vetor binário pEND4K (Klee et al., 1985) com o inserto ligado ao gene *ntpIII* (Bevan et al., 1983) como marcador de seleção em plantas (resistência à canamicina). O gene quimérico construído (inserto) foi uma fusão de sequências de DNA de ervilha codificando a porção madura da proteína LHC do gene *Lhcb* Tipo I (*Lhcb1*2*) e também do peptídio trânsito da subunidade menor da Ribulose 1,6-bisfosfato carboxilase/oxigenase - Rubisco (*rbcS*) visando o direcionamento da proteína para o cloroplasto (*rbcS:Lhcb1*2*). Uma sequência de 30 bases, da região 5' não traduzida do RNA do vírus do mosaico da alfafa (AMV), fusionada à esquerda do peptídio trânsito (*rbcS*), foi usada como um intensificador da tradução ("enhancer"). Tanto o gene marcador de seleção (*ntpIII*) quanto o gene quimérico (*rbcS:Lhcb1*2*) estão sob controle do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) (Kay et al., 1987). O sinal de terminação da transcrição foi o do gene *Lhcb1*2* de ervilha (Figura 8).

As plântulas transformadas foram selecionadas pela capacidade de enraizamento e crescimento em meio contendo canamicina. Os transformantes selecionados foram transferidos para solo, autofecundados e então, obtidas as sementes T1. Destas plantas foram selecionadas as linhas com elevado conteúdo de mRNA *Lhcb1*2* de ervilha, por densitometria a laser. A integridade do transgene foi monitorada em todos os estágios

Figura 8: Representação esquemática da construção do gene quimérico com a indicação do fragmento usado como sonda para hibridização de ácidos nucleicos e os principais sítios de restrição.

por análises de endonucleases de restrição e por técnicas de hibridização de DNA. Foi medido também o aumento da proteína LHC das linhas selecionadas em relação às plantas selvagens, através de marcação simultânea de "blots" com anticorpo contra a proteína 33kDa do complexo de evolução de oxigênio do PSII (Oee1), usado como marcador interno do nível do PSII e LHC (Ko et al., 1992). O número e a complexidade de insertos estáveis foram estabelecidos por hibridizações do DNA genômico das linhagens transgênicas TR1 e TR2 com sonda específica do gene *nptII* (resistência à canamicina), através de técnicas de Southern Blot (Southern, 1975). O resultado dessas análises revelaram que as plantas de tabaco transgênicas TR1 e TR2 apresentam, respectivamente, 1 e 4 cópias do transgene estavelmente inseridas no seu genoma (Labate¹).

As sementes de tabaco transgênico (TR1 e TR2) e da linhagem parental selvagem (WTSR1) foram inicialmente germinadas em sementeiras contendo substrato orgânico composto de vermiculita (Plantmax). Cerca de um mês e meio após a germinação, as plântulas foram transplantadas para vasos com uma mistura de areia e substrato orgânico (Plantmax) na proporção de 1:1. Para as análises das plantas cultivadas em baixa luminosidade alguns vasos foram mantidos em câmara-de-crescimento controlado (Convion PGW36), com temperatura de 25°C, fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Para as análises de plantas cultivadas em condições de alta luminosidade, a outra parte dos vasos foi mantida em casa-de-vegetação, provida de fonte de luz suplementar para perfazer um total de 16

horas de luz (fotoperíodo). As plantas receberam diariamente solução nutritiva completa (Hoagland & Arnon, 1950).

3.2 - Caracterização das Plantas Transgênicas e Selvagens Quanto ao Potencial Fotossintético

As plantas transgênicas e selvagens foram caracterizadas quanto ao potencial fotossintético para avaliar o efeito do aumento do nível da proteína LHC no comportamento e adaptação das plantas cultivadas em baixa luminosidade e analisadas em condições de alta luminosidade, bem como o efeito do cultivo em alta luminosidade, comumente encontrado no campo e, assim, comparar como funcionam os mecanismos de ajustes do metabolismo nestas plantas. Os parâmetros medidos foram: análises de trocas gasosas, determinação do conteúdo de metabólitos do Ciclo de Calvin-Benson, conteúdo de carboidratos (amido e sacarose) e medidas de fluorescência da clorofila α para se determinar, entre outros, a eficiência do transporte de elétrons no PSII e os mecanismos fotoprotetores de dissipação do excesso de energia solar absorvida.

3.2.1 - Análises de Trocas Gasosas

A determinação da taxa fotossintética de plantas transgênicas (TR1 e TR2) e selvagens (WTSR1) foi feita com o auxílio de dois analisadores de gás infra-vermelho (ADC225 MK3), que medem a taxa de absorção do CO_2 e a transpiração foliar. Os analisadores estão acoplados à uma câmara de alumínio, com duas aberturas, onde a folha a ser analisada foi inserida. A parte superior dessa câmara possui um anel de acrílico transparente, por onde foi fornecida luz actínica às folhas localizadas entre os blocos de alumínio e, a abertura inferior foi coberta com "Parafilm". A luz actínica foi fornecida por um braço de fibra ótica de uma fonte de luz fria KL 1500 (Schott,

¹ LABATE, M. T. V. Comunicação pessoal, 2000

Alemanha), diretamente no topo da câmara e a intensidade luminosa utilizada foi de 1100-1200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. A temperatura da câmara foi mantida em 20°C através de um circulador de água (TE 184 Tecnal) pelas cavidades da câmara. O déficit de vapor de água do ar de entrada da câmara foi ajustado a 12,23 mbar através da passagem do ar circulante por um banho de água (RM6 Lauda-Brinkmann) mantido a 10°C, por meio de um gerador de vapor d'água ADC-WG602. Dessa forma, a temperatura da folha foi mantida ao redor de 25°C, monitorada por um Termopar (Ni-Ca) aderido à superfície inferior da folha. As medidas de fotossíntese foram feitas com o auxílio de um diluidor de gás ADC-GD600 em concentrações atmosféricas de CO_2 e, também em altas concentrações de CO_2 (700-800 ppm) para eliminar o efeito da fotorrespiração. Todo o sistema descrito funciona acoplado a um aparelho de congelamento rápido de folhas, que permite o bloqueio instantâneo do metabolismo, à temperatura de -190°C (Figuras 9 e 10). Os discos foliares congelados foram armazenados em nitrogênio líquido e posteriormente utilizados para extração de metabólitos, descrito mais adiante.

A determinação da taxa de absorção de CO_2 foi obtida comparando-se as concentrações de CO_2 na mistura gasosa anterior à entrada na câmara, e após a passagem pela folha. Assim, pôde-se medir quanto a folha estava absorvendo de CO_2 por unidade de área por tempo. A taxa de assimilação líquida de CO_2 pela folha foi determinada pela seguinte fórmula (von Caemmerer & Farquhar, 1981; Long & Hällgren, 1985):

$$A=(f/S) \times \Delta\text{CO}_2 \times [(1-e_e/P)/(1-e_0/P)]$$

em que:

A: taxa de assimilação líquida de CO_2 por unidade de área foliar ($\mu\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$);

S: área foliar (0,0008553 m^2);

ΔCO_2 : diferencial de CO_2 (ppm);

e_e : pressão parcial de vapor d'água antes da câmara (Kpa);

e_0 : pressão parcial de vapor d'água após a câmara (Kpa);

P: pressão atmosférica (Kpa);

f: fluxo molar (mol.s^{-1}).

$$f = F \times (1/22,4) \times [273,15/(273,15 + T)] \times (P/101,3) \times (1/60)$$

em que:

F: vazão do ar (l/min);

T: temperatura da câmara (°C).

Figura 9: Câmara de análise da fotossíntese e fluorescência da clorofila α , acoplada ao sistema de congelamento rápido de folhas.

Figura 10: Analisadores de gás infra-vermelho usados para medidas de absorção de CO_2 e transpiração foliar.

3.2.2 - Análise de Fluorescência da Clorofila *a*

As análises de fluorescência da clorofila *a* de plantas transgênicas e selvagens foram realizadas na câmara de análise da fotossíntese, juntamente com as análises de

trocas gasosas, nas duas concentrações de CO₂. Para isso, na parte superior da câmara de análise fotossintética foi acoplado um fluorômetro “Portable Chlorophyll Fluorometer” (PAM 2000, Heinz Walz, Alemanha) equipado com uma unidade de controle de disparo de pulsos saturantes. As análises foram feitas seguindo a metodologia descrita por Schreiber et al. (1986) e Genty et al. (1989), avaliando a emissão de fluorescência da clorofila *a* da superfície superior das folhas e, usando as terminologias e cálculos propostos por Kooten & Snel (1990) (Figura 11). O fluorômetro foi conectado a um computador (Compaq 486), que permitiu o monitoramento de todas as medidas durante as análises.

Antes do início das análises, as plantas foram mantidas no escuro por um período de 30 a 60 minutos para a completa oxidação dos componentes do sistema de transporte de elétrons e, então, os seguintes parâmetros foram determinados: F₀, F_M, q_P ("quenching" fotoquímico), q_N ("quenching" não fotoquímico), ϕ_{PSII} , que refere-se à eficiência quântica do transporte de elétrons pelo PSII, NPQ e F_V/F_M. O F_V/F_M, também denominado de ϕ_{PSII}^{open} é uma estimativa da eficiência máxima do fotossistema II (PSII) quando todos os componentes do transporte de elétrons da membrana se encontram no estado oxidado após um longo período de escuro (Kitajima & Butler, 1975; Havaux, 1992 e 1994).

Os parâmetros foram obtidos de leitura direta via computador e calculados de acordo com as seguintes fórmulas:

$$F_V/F_M = (F_M - F_0)/F_M$$

$$q_P: F'_M - F_0 / F'_M - F_0$$

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

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

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

$$NPQ: F_M - F'_M / F'_M$$

em que:

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

F_M : fluorescência máxima obtida quando todos os centros de reação do PSII estão fechados (oxidados), isto é, no estado adaptado no escuro ($q_P=0$ e $q_N=0$);

F_0 : fluorescência mínima obtida com todos os centros de reação do PSII abertos enquanto a membrana do tilacóide está no estado não energizado, isto é, adaptado no escuro ($q_P=1$ e $q_N=0$);

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

F_S : fluorescência no “steady-state” (equilíbrio) ($q_P>0$);

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

F'_V : fluorescência variável máxima obtida em folhas adaptadas à luz.

3.2.3 - Preparo do Extrato Foliar para a Determinação de Metabólitos e Carboidratos

Após as determinações de fluorescência da clorofila a e das taxas de fotossíntese pela análise de absorção de CO_2 , o metabolismo da folha foi interrompido pelo sistema de congelamento rápido, acoplado à câmara de análise de trocas gasosas à temperatura de $-190^\circ C$ (Figura 9). Este sistema consiste de um pistão pneumático, localizado na parte inferior da câmara de análise, acionado por ar comprimido, usando ambas as mãos, onde é encaixado, segundos antes do acionamento da válvula, um cilindro de cobre que permaneceu imerso em nitrogênio líquido ($-190^\circ C$). Em poucos segundos, o cilindro de cobre rompe a membrana de "Parafilm" que sela a extremidade inferior da câmara, congelando a folha, que é então armazenada em envelopes de alumínio devidamente identificados e mantidos em nitrogênio líquido. Estes discos foliares congelados foram

Figura 11: Princípios da análise de “quenching” de fluorescência da clorofila *a* pelo método dos pulsos saturantes. A: luz modulada (frequência 1.6 kHz) para a obtenção de F_0 ; B: pulso de luz saturante (aproximadamente $15000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) para a obtenção de F_M ; C: luz acínica contínua ligada simultaneamente com o pulso de luz saturante (a cada 60 segundos). Dependendo das condições de luz, cinco estados diferentes são distinguidos, correspondendo a pontos característicos da produção de fluorescência e coeficientes de “quenching”. *Indicadores de intensidade de fluorescência*- F_0 : fluorescência mínima (intensidade de fluorescência com todos os centros de reação do PSII abertos enquanto a membrana do tilacóide está no estado não energizado, isto é, adaptada no escuro); F_M : fluorescência máxima (intensidade de fluorescência obtida quando todos os centros de reação do PSII estão fechados no estado adaptado no escuro); F_V : fluorescência variável máxima obtida quando todos os processos não fotoquímicos são mínimos ($q_N=0$); F'_M : fluorescência máxima com todos os centros de reação do PSII fechados em qualquer estado adaptado na luz; F_S : fluorescência no estado fixo, isto é, a fluorescência não muda enquanto os fatores externos permanecerem constantes, F'_V : fluorescência variável máxima em qualquer estado adaptado na luz; F'_0 : fluorescência mínima em qualquer estado adaptado na luz. *Parâmetros de fluorescência*- q_F : “quenching” fotoquímico e q_N : “quenching” não fotoquímico. Modificado de van Kooten & Snell (1990).

então usados para a determinação dos conteúdos de metabólitos do Ciclo de Calvin-Benson e carboidratos.

3.2.3.1 - Extração com Ácido Perclórico para a Quantificação dos Metabólitos do Ciclo de Calvin-Benson

A extração foi realizada com de ácido perclórico 10% (v/v) (HClO_4) conforme descrito por Lowry & Passonneau (1972) e Labate & Leegood (1989): em almofariz pré-resfriado, o disco foliar congelado, foi macerado em nitrogênio líquido com 1 ml de HClO_4 10% (v/v) até completa pulverização. O extrato obtido após a pulverização foi transferido para tubos de centrifuga do tipo “Eppendorf”, previamente colocados no gelo. Em seguida o almofariz foi lavado com mais 0,5 ml de HClO_4 a 1% (v/v), e acrescido ao extrato que estava no gelo. O tubo foi centrifugado à aproximadamente 14000 rpm por 2 minutos. O volume no tubo foi marcado e transferiu-se o sobrenadante para novo tubo. O volume marcado foi tomado como volume do extrato e o pelete verde formado foi utilizado para a determinação do conteúdo de clorofila, com base no valor de feofitina, conforme será descrito mais abaixo. O sobrenadante foi ainda neutralizado a pH 6,5-7,0, com K_2CO_3 5M, acrescido de cerca de 200 μl de uma suspensão de carvão ativado (200 mg/ml) e centrifugado por mais 2 minutos a 14000 rpm. O pelete foi então descartado e o sobrenadante obtido foi devidamente identificado e consistiu do extrato foliar utilizado nas análises de metabólitos do Ciclo de Calvin-Benson.

3.2.3.1.1 - Determinação do Conteúdo de Metabólitos do Ciclo de Calvin-Benson

Todos os metabólitos foram medidos de acordo com a metodologia de Lowry e Passonneau (1972), em um espectrofotômetro Hitachi U-3300 (Tokio, Japão) através de reações enzimáticas acopladas que utilizam NADH ou NADPH. As determinações baseiam-se nas mudanças de absorbância, no comprimento de onda de 340nm, que

ocorre quando o NADH ou NADPH passam do estado reduzido para oxidado ou vice-versa. De acordo com cada metabólito a quantidade de extrato variou de 50 a 100µl, em um volume total de ensaio de 1ml. As enzimas utilizadas foram da Boehringer Mannheim (Alemanha) e da Sigma Chemical Co.

3.2.3.1.1.1 - Determinação do Conteúdo de Ácido 3-Fosfoglicérico (3-PGA)

O ensaio para a determinação do conteúdo de 3-PGA continha 50mM de Imidazole-HCl, 1mM de MgCl₂, 20mM de NaCl e 2mM de β-mercaptoetanol, ajustados a pH 7,1. Acrescentou-se a esta reação 50mM de NADH, 1mM de ATP, 11 unidades de fosfoglicerato quinase (EC: 2.7.2.3, PGK) e 11 unidades de gliceraldeído-3 fosfato-desidrogenase (EC: 1.2.1.12, GAP-DH).

3.2.3.1.1.2 – Determinação do Conteúdo de Triose-Fosfato (TP) e Frutose 1,6-Bisfosfato (FBP)

O ensaio para a determinação do conteúdo de TP+FBP continha 50mM de Imidazole-HCl, 1mM de NaHAsO₄, 1mM de EDTA (ácido tetra acético etilenodiamino) e 2mM de β-mercaptoetanol, ajustados a pH 7,5, acrescidos de 1mM de NAD⁺. Foram adicionadas 2,4 unidades de triose-fosfato isomerase (EC: 5.3.1.1, TIM) e 1,8 unidades de gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (EC: 1.2.1.12, GAP-DH) para determinação de DHAP (dihidroxiacetona-fosfato) e então 0,09 unidades de aldolase (EC: 4.1.2.13) para a determinação de FBP.

Ressalta-se que a determinação de FBP inclui a de DHAP, a qual deriva da sedoheptulose 1,7-bifosfato, devido ao duplo anel da aldolase.

3.2.3.1.1.3 - Determinação do Conteúdo de Hexoses Fosfato

O ensaio para a determinação do conteúdo de hexoses fosfato continha 100mM de Tris-HCl (2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol), pH 8,1 e 0,5mM de NADP^+ . Foi adicionado 0,06 unidades de glucose 6-fosfato desidrogenase (EC: 1.1.1.49, G6P-DH), seguido de 0,35 unidades de fosfoglucoose isomerase (EC: 5.3.1.9, PGI) e 0,2 unidades de fosfoglucomutase (EC: 5.4.2.2, PGluM).

3.2.3.2 - Determinação da Feofitina

Em condições de extração ácida, a clorofila é convertida à feofitina, que foi determinada de acordo com o método de Vernon (1960): Ao pelete verde resultante da centrifugação do tecido foliar, macerado com HClO_4 , adicionou-se 10 ml de acetona 80% (v/v), e transferiu-se para um tubo tipo Falcon, que foi mantido em câmara fria (4°C), por uma noite, para a completa extração dos pigmentos. O pelete de coloração branca formado foi utilizado para a extração do amido que será descrito mais abaixo e o sobrenadante foi centrifugado à 14000 rpm por 5 minutos e a absorbância foi medida a

partir do sobrenadante, contra um branco de acetona 80%, a 666 nm e 655 nm para determinação do conteúdo de feofitina através da seguinte fórmula:

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

em que:

A_{655} : absorvância a 655 nm;

A_{666} : absorvância a 666 nm;

V: volume de acetona 80% (ml).

3.2.4 - Determinação do Conteúdo de Sacarose

O ensaio para a determinação do conteúdo de sacarose continha 100mM de HEPES (pH 7,0), 5mM de MgCl_2 , 0,5 mM de ditioneitol (DTT), 0,02% (p/v) de albumina do soro bovino (BSA), 40 mM de NADP e 0,1 M de ATP. À esta reação adicionou-se 0,5 unidade de glucose-6-fosfato desidrogenase (EC: 1.1.1.49, G6P-DH), seguido de 0,5 unidade de fosfoglucoase isomerase (EC: 5.3.1.9, PGI), 3 unidades de hexoquinase (EC: 2.7.1.1, HK) e 100 unidades de β -frutoseidase (EC: 3.2.1.26).

3.2.5 Extração do Amido

Para a extração do amido foi utilizado o pelete de coloração branca resultante da extração de feofitina descrito no item 3.2.3.2. A este pelete adicionou-se 0,5 ml de MES (ácido 2-[N-Morfolino]etano-sulfônico) 0,5M (pH 4,5) e centrifugou-se por 2 minutos à 14000 rpm. O sobrenadante foi descartado, repetindo-se o procedimento por mais duas

vezes. Em seguida, o pelete foi ressuspensionado em 0,5 ml de MES 0,5M (pH 4,5) e tratado com 14 unidades de amiloglucosidase (EC: 3.2.1.3) e 0,4 unidades de α -amilase (EC: 3.2.1.1). A mistura foi mantida à temperatura ambiente por uma noite, para completa digestão e em seguida, centrifugada à 14000rpm por 3 minutos. O pelete formado foi descartado e o sobrenadante, que constituiu a amostra a ser utilizada nas análises do conteúdo de amido, foi mantida em nitrogênio líquido.

3.2.5.1 - Determinação do Conteúdo de Amido

A determinação do conteúdo de amido (hidrolisado à glicose) foi feita segundo a metodologia de Jones et al. (1977). O ensaio continha 100mM de Hepes (pH 7,0), 5mM de $MgCl_2$, 0,5 mM de ditioneitol (DTT), 0,02% (p/v) de albumina do soro bovino (BSA), 40 mM de NADP e 0,1 M de ATP. À esta reação adicionou-se 3 unidades de hexoquinase (EC: 2.7.1.1, HK), seguido de 0,5 unidades de glucose-6-fosfato desidrogenase (EC: 1.1.1.49, G6P-DH).

3.3 - Determinação de Clorofilas *a* e *b*

A determinação das clorofilas *a* e *b* foi feita a partir de folhas frescas, jovens e maduras, de plantas cultivadas em alta luminosidade (casa-de-vegetação), segundo metodologia de Porra et al. (1989). Discos foliares (5cm²) foram inicialmente macerados em N₂ líquido até a completa pulverização. Adicionou-se 10ml de acetona tamponada, em solução saturada de carbonato de sódio, 80%, pH 7.8, sendo 5ml para mistura e 5ml para lavagem, obtendo-se um extrato que foi colocado em tubos tipo Falcon e mantido por uma noite em câmara fria (4°C) para a total extração dos pigmentos. Descartou-se o

pelete e o sobrenadante foi centrifugado à 14000 rpm por 5 minutos. As leituras de absorbância foram feitas a partir do sobrenadante, contra um branco de acetona tamponada 80%, pH 7.8, a 663.6 e 646.6nm utilizando-se as seguintes fórmulas:

$$\text{Chl}_a = [(12,25 \times A_{663.6}) - 2,55 \times A_{646.6}]$$

$$\text{Chl}_b = [(20,31 \times A_{646.6}) - 4,91 \times A_{663.6}]$$

onde:

Chl_a: concentração de clorofila *a* (µg de clorofila *a*/ml da amostra);

Chl_b: concentração de clorofila *b* (µg de clorofila *b*/ml da amostra);

A_{663,6}: absorbância a 663,6 nm;

A_{646,6}: absorbância a 646,6 nm.

3.4 - Estudo Anatômico e Estrutural de Folhas de Tabaco Transgênico e Selvagem

As análises de microscopia óptica foram feitas visando a determinação de alterações na estrutura foliar devido ao aumento do nível de proteínas LHC aliado ao efeito do cultivo em condições de alta luminosidade, através de comparações visuais e contagens do número de cloroplastos de células do parênquima paliádico, número de células da epiderme superior e tamanho de células do parênquima paliádico de folhas de plantas transgênicas (TR1 e TR2) e selvagens (WTSR1). Para essas análises as amostras foliares (quarta folha completamente desenvolvida) foram retiradas da parte intermediária da lâmina foliar de plantas cultivadas em câmara-de-crescimento controlado (Convicon PGW36) à 600-700µmol.m⁻².s⁻¹ de intensidade luminosa, 16 horas de fotoperíodo em ar umidificado e 25°C de temperatura.

O procedimento para o preparo das amostras foliares, seguiu o protocolo padrão de processamento de amostras foliares do NAP/MEPA - ESALQ/USP. As amostras de tecido foliar de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2) foram cortadas em tiras de 1mm x 2mm e imediatamente colocadas em fixador (Glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2%, CaCl₂ 0.1M e tampão cacodilato 0.05M pH 7.2) onde foram

mantidas, sob vácuo para retirar o ar dos tecidos, por pelo menos 1 hora. Terminada a fixação as amostras foram lavadas 3 vezes em tampão cacodilato 0.05M por 10 minutos cada lavagem e, então, foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio (OsO_4) 1% em tampão cacodilato 0.05M na proporção de 1:1. Essa solução foi preparada apenas na hora do uso. A pós-fixação foi feita à temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida, as amostras foram lavadas com água destilada (3 banhos de 5 minutos cada) e então adicionou-se acetato de uranila 0.5% para fazer a contrastação *en bleu*, mantendo-se em geladeira por uma noite. As amostras já tratadas com o OsO_4 e a uranila foram então lavadas com água destilada. Iniciou-se a seguir a desidratação com uma série de acetona à 30%, 50%, 70% e 90%, por 10 minutos cada e três banhos finais, de 10 minutos cada, em acetona 100% antes de começar a infiltração. A primeira infiltração foi feita em meio contendo acetona 100% e Spurr “soft” (Spurr, 1969), na proporção de 1:1, à temperatura ambiente por cerca de 3-4 horas. O Spurr “Soft” é uma resina semi-dura, usada no emblocamento de materiais destinados à microscopia de luz e é composto dos seguintes produtos: ERL 4206 (dióxido de vinil cicloexano); DER 736 (diglicidil éter); NSA (anidrido noneil succínico) e DMAE (dimetilaminoetano).

Terminado o tempo de infiltração, o meio foi descartado e adicionou-se mais Spurr puro “soft” às amostras, que foram mantidas à temperatura ambiente, sob agitação, por uma noite. Ao final dessa fase as amostras devem estar totalmente infiltradas com a resina e se encontrar no fundo do recipiente de preparo, sendo que as demais são descartadas. As amostras que estavam submersas e as respectivas etiquetas de identificação foram colocadas no fundo de moldes (cápsulas) e em seguida estes foram preenchidos com Spurr puro “soft”. Para a polimerização, manteve-se os moldes em estufa (70°C), cobertos com placa de Petri, por 48-72 horas. Os cortes das secções foram feitos em ultramicrotomo Reichert Ultracut E (Leica) e as secções foram coradas com azul de toluidina 1% e então observadas em microscópio óptico (Olympus BX40) e fotografadas. Os aumentos utilizados foram de 100x e de 400x para contagem de cloroplastos.

3.5 - Experimentos de Estresse de Frio

Baixas temperaturas reduzem a capacidade de sistemas fotossintéticos utilizarem a radiação luminosa, podendo levar ao processo de fotoinibição que é caracterizado pela excessiva excitação das membranas do tilacóide e subsequente prejuízo para a função fotossintética (Öquist & Huner, 1991). O decréscimo na eficiência fotoquímica do PSII sob condições de estresse pode refletir-se não apenas na inibição da função do PSII mas também no aumento da dissipação de energia como calor, definido como “quenching” de fluorescência não-fotoquímica (q_N) (Demmig-Adams & Adams, 1992). Como já discutido, os aumentos do q_N e da conversão de violaxantina para zeaxantina, são induzidos pelas mesmas condições que induzem o q_E , e têm função fotoprotetora contra os efeitos da alta luminosidade. Partindo-se dessa premissa, os experimentos de estresse de frio foram delineados para permitir comparações entre os genótipos no que se refere aos mecanismos fotoadaptativos e fotoprotetores, em função da observação dos valores das taxas fotossintéticas e parâmetros de fluorescência da clorofila a .

Para as análises de estresse de frio as plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2) foram mantidas em câmara fria (4°C) sob iluminação ($300-400\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) por cerca de duas horas e meia. Em seguida foram colocadas no escuro por uma hora e então submetidas às análises de fotossíntese e fluorescência da clorofila a , como descrito anteriormente, tanto em condições atmosféricas (cerca de 340 ppm de CO_2), quanto em condições de saturação de CO_2 (800 ppm de CO_2). Ao final destas análises foram retiradas ainda amostras foliares frescas, para serem utilizadas nos procedimentos de extração de proteínas das membranas dos tilacóides e subsequente preparo de géis de poliacrilamida, como será descrito mais adiante.

3.6 - Caracterização dos Mecanismos de Ajuste de Curto e Longo Prazo no Metabolismo das Plantas Transgênicas e Selvagens Independente das Taxas Fotossintéticas

Pesquisas direcionadas para o entendimento dos mecanismos de transdução de sinais entre o núcleo e o cloroplasto, envolvidos na aclimação das plantas à ambientes com diferenças na intensidade luminosa (transições alta-baixa luz e vice-versa) bem como outros estímulos ambientais, são essenciais para entender como a planta integra esses múltiplos estímulos simultaneamente para coordenar a síntese e manutenção de milhares de proteínas e produtos gênicos secundários que constituem o aparato fotossintético.

Desse modo, o objetivo dessa parte do trabalho foi investigar, através de comparações entre as plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2), como funcionam os mecanismos de regulação do metabolismo que envolvem ajustes imediatos, tais como aumento da dissipação do excesso de energia pela fluorescência da clorofila α , mecanismos não-fotoquímicos e Ciclo das Xantofilas, independente das taxas fotossintéticas (pois estes experimentos não visavam comparações das taxas de absorção de CO_2 entre os genótipos), e ajustes de longo prazo, que implicam em alterações na expressão de genes do aparato fotossintético, por meio de comparações na quantidade e qualidade de proteínas, em géis de poliacrilamida e análises de Northern Blot (Alwine et al., 1977), de plantas de experimentos de reiluminação e experimentos de transferência de plantas cultivadas em baixa luminosidade para condições de alta luminosidade (BL→AL), que serão descritos abaixo.

3.6.1 - Experimentos de Reiluminação

Nos experimentos de reiluminação as plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2) foram mantidas no escuro, em câmara-de-crescimento controlado (Convion PGW36), com temperatura de 25°C, por 21 dias e, em seguida foram

reiluminadas. No 21º dia de escuro e, às 6h, 12h e 24h após a reiluminação mediu-se o valor da máxima capacidade fotoquímica do PSII (F_v/F_m) nessas plantas e, coletou-se material para a determinação de mRNAs, para a extração de proteínas da membrana dos tilacóides de cloroplastos e, para a quantificação de clorofilas e de carotenóides, através de técnicas de HPLC, segundo a metodologia de Gilmore & Yamamoto (1991). Durante todo o experimento as plantas receberam, diariamente, solução nutritiva completa (Hoagland & Arnon, 1950).

3.6.2 - Sistemas de Transferência Baixa Luz-Alta Luz (BL→AL)

Nestes experimentos as plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2) foram inicialmente cultivadas em câmara-de-crescimento controlado (Conviron PGW36) com temperatura de 25°C, fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de $100\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Dessas plantas coletou-se material foliar suficiente para os procedimentos de extração de proteínas da membrana dos tilacóide e para a quantificação de clorofila total e determinação da relação clorofila *a/b*. Em seguida as plantas foram transferidas para câmara-de-crescimento controlado com uma intensidade luminosa bem maior, entre $700\text{-}800\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, temperatura de 25°C e fotoperíodo de 16 horas de luz. As plantas foram mantidas nessas condições por mais 12 dias. Nesse período, no mesmo horário, cerca de 3 horas após o início do período luminoso, coletaram-se discos foliares para a determinação do conteúdo de clorofila total e da relação clorofila *a/b*. Durante o período de cultivo em alta luminosidade, além desses discos foliares, foram coletadas folhas inteiras para a extração de proteínas do tilacóide, como será descrito adiante.

3.6.3 - Determinação da Composição e Conteúdo de Proteínas das Membranas dos Tilacóides de Cloroplastos

O objetivo dessa parte do projeto foi investigar as alterações na composição das proteínas do LHCII e PSII durante o desenvolvimento de plantas transgênicas e selvagens, cultivadas em diferentes condições luminosas e ainda durante as transições de baixa para alta luminosidade para compreendermos os ajustes e a adaptação dessas plantas à quantidade e qualidade de luz disponível. Estes estudos foram feitos por meio de comparações, entre os genótipos, das relações do LHCII, com as bandas da CP29 de 28kDa (LHCII/CP29), do Complexo de Evolução de O₂-OEE de 33kDa (LHCII/OEE) e da subunidade α da ATPase cloroplastidial-CF1 α de 55kDa (LHCII/CF1 α).

3.6.3.1 - Extração de Proteínas das Membranas dos Tilacóides de Cloroplastos

As amostras de proteínas da membrana dos tilacóides de cloroplastos foram obtidas de folhas frescas, provenientes de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2) cultivadas nas seguintes condições: em baixa e alta luminosidade, de plantas de experimentos de estresse de frio, de plantas de experimentos de reiluminação e de sistemas de transferência de baixa para alta luminosidade (BL→AL).

Para a extração de proteínas das membranas de tilacóides usou-se a metodologia descrita por Bassi et al. (1985): Em câmara-fria (4°C), as folhas foram inicialmente trituradas em tampão contendo 0,5% de leite em pó desnatado, para eliminar polifenóis, 0,4M de Sorbitol, 0,1M de Tricina, 0,2 μ M de PMSF, 1 μ M de Benzamidina e 5 μ M de Ácido Amino Capróico, ajustados à pH 7.8. O extrato obtido foi filtrado em duas folhas de Miraclott (Calbiochem) e centrifugado (4°C) por 10 minutos à 1400g. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pelete em tampão contendo 25mM de Hepes/KOH pH 7.5, 10mM de EDTA, 0,2 mM de PMSF, 1 mM de Benzamidina e 5 mM de Ácido Amino Capróico. A suspensão foi então centrifugada à 10000g/10min, em centrífuga resfriada (4°C). Repetiu-se novamente a operação e, em seguida, descartou-se o

resfriada (4°C). Repetiu-se novamente a operação e, em seguida, descartou-se o sobrenadante e o pelete foi ressuspensionado em tampão contendo 50% de Glicerol, 1mM de EDTA e 100mM de Hepes/KOH pH 7.5. Nesta condição as amostras foram então transferidas para tubos previamente identificados e mantidas em freezer -80°C até o momento do uso.

3.6.3.2 - Eletroforese das Proteínas de Membranas dos Tilacóides em Gel de Poliacrilamida (PAGE).

Após a extração, as amostras de proteínas dos tilacóides, de diferentes experimentos e condições de cultivo, foram submetidas à eletroforese usando géis de poliacrilamida-SDS em sistema descontínuo desnaturante (modificado de Laemmli, 1970) e géis High-Tris (Fleng et al., 1986) em gradientes de 12-18% (v/v) de poliacrilamida. Eletroforeses em géis de sistema descontínuo produzem bandas claras e distintas e são realizadas com um gel de concentração e um gel de separação, que diferem no pH e na concentração de poliacrilamida usada.

Para essas análises as amostras de proteínas dos tilacóides foram inicialmente solubilizadas em meio contendo 50mM de Na₂CO₃ e 50mM de DTT e centrifugadas à 4°C, por 2 minutos à 10000 g. O pelete foi ressuspensionado em meio contendo SDS 1% e Sacarose 10% e, novamente centrifugado nas mesmas condições. Retirou-se então aliquotas para a quantificação de clorofila total em acetona tamponada 80% pH 7.8, seguindo a metodologia de Porra et al. (1989). Em seguida as amostras foram desnaturadas em água fervente (100°C) por 1 minuto, e submetidas à eletroforese. As amostras dos géis foram carregadas baseando-se no conteúdo de clorofila (mg de clorofila/μl de amostra) e, para visualização, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 à 0,04%.

Todos os géis tiveram as imagens gravadas em fotodocumentador (ImageMaster®VDS - Pharmacia Biotech) e a intensidade das bandas comparadas através de densitometria, por meio do software (ImageMaster®1D PRIME - Pharmacia

Biotech). O marcador de peso molecular protéico utilizado foi o SDS-PAGE, Mid-Range, 14,4-97,4 kDa (Promega).

3.7 - Análise do Conteúdo de Carotenóides do Ciclo das Xantofilas

A separação dos pigmentos da membrana dos tilacóides de cloroplastos de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2) de experimentos de reiluminação, foi efetuada por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC - “High Performance Liquid Chromatography”), usando a metodologia de Gilmore & Yamamoto (1991). Estas determinações foram feitas em colaboração com o Dr. Enrico Brugnoli do Instituto de Agrosilvicultura do CNR-Porano, Itália.

Foi empregada uma coluna Spherisorb ODS-1 e dois programas de solventes e, entre cada amostra a coluna foi re-equilibrada para evitar o efeito residual dos solventes. Todas as corridas foram feitas à temperatura ambiente. O fluxo foi de $2 \text{ ml} \cdot \text{m}^{-1}$ e usou-se uma alíquota amostral de 20 μl por injeção, para cada repetição. A concentração dos pigmentos (neoxantina, violaxantina, luteína, β -caroteno e clorofila *a* e *b*) foi determinada pela área dos picos integradas (440nm), comparadas aos picos dos padrões utilizados (Sigma).

3.8 - Análises de Northern Blot

A expressão do transgene foi investigada pela detecção do acúmulo de RNAs específicos do gene *Lhcb1**2 de ervilha, através da técnica de Northern Blot (Alwine et al., 1977). Partindo-se da premissa de que a atividade do promotor 35S (CaMV) está associada a expressão forte e constitutiva e o peptídeo trânsito da subunidade menor da Rubisco (*rbcS*) garante o direcionamento da proteína para o cloroplasto, restringindo a expressão da proteína aos tecidos verdes da planta, a expressão do transgene foi verificada pelo isolamento e hibridização de RNAs provenientes de discos foliares (parte

intermediária da lâmina foliar) obtidos de plantas transgênicas (TR1 e TR2) e selvagens (WTSR1) de experimentos de reiluminação.

O RNA foi isolado utilizando o kit RNeasy Mini Kit (Quigen Inc.), a partir de 0,5g de tecido vegetal, conforme descrito pelo fabricante. A quantidade de RNA foi determinada por leitura em espectrofotômetro (Hitachi modelo U3300) a 260nm e a sua integridade foi avaliada em géis desnaturantes (2,2M de formaldeído) de agarose 1% (p/v) MOPS 1X.

Cinco µg de RNA total foram separados por tamanho em gel de eletroforese desnaturante e transferidos para membrana de nylon positivamente carregada (Hybond N⁺, Amersham), conforme descrito em Sambrook et al. (1989).

O preparo e a marcação da sonda foram feitos através do método Random Primer, utilizando nucleotídios com fluoresceína (Fl-dUTP). As hibridações com a sonda marcada e as lavagens de estringência, foram feitas utilizando o Kit Gene Images Random Prime Labelling Module RPN3540 (Amersham), conforme recomendado pelo fabricante. Imediatamente antes do uso a sonda marcada foi desnaturada por 5 minutos à 98°C e mantida no gelo por pelo menos 5 minutos.

Para a detecção da sonda marcada com fluoresceína, utilizou-se o kit Gene Images CPD-Star Detection Module RPN3510 (Amersham), que utiliza um anticorpo anti-fluoresceína conjugado com a fosfatase alcalina. A revelação foi feita através de exposições a filmes autorradiográficos (Kodak X-Omat, XK-1), por 2 horas.

3.9 - Delineamento e Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi o Inteiramente Casualizado. Os dados foram submetidos à análises de variância e a comparação das médias foi realizada usando-se o Teste de Tukey à 5% de probabilidade, através do programa Statistical Analysis System - SAS.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Estudo Anatômico e Estrutural de Folhas de Tabaco Transgênico e Selvagem

As análises comparativas de morfologia e anatomia da quarta folha de plantas transgênicas e selvagens mostraram a existência de diferenças entre os genótipos quando cultivados em alta luminosidade.

A Figura 12 mostra os cortes de secções transversais de plantas selvagens (WTSR1) (A), e transgênicas (TR1 e TR2) (B e C, respectivamente), cultivadas em alta luminosidade. Pela Figura 12 observa-se que a lâmina foliar das plantas transgênicas (TR1 e TR2) é mais espessa que a apresentada pelas plantas selvagens (WTSR1). As células da epiderme superior das plantas selvagens são menores e mais uniformes que a das plantas transgênicas que se apresentam maiores e mais desorganizadas. Com relação ao parênquima paliçádico e lacunoso, pode-se observar que as células das plantas transgênicas (B e C) são relativamente maiores que as apresentadas pelas plantas selvagens (A). As plantas transgênicas apresentam ainda as células do parênquima paliçádico mais alongadas e, parênquima lacunoso com espaços livres maiores quando comparado às plantas selvagens (Figura 12).

Contudo, quando comparado com as plantas cultivadas em baixa luminosidade (Labate et al., 2000), em todos os genótipos, cultivados em alta luminosidade, são bem evidentes as mudanças na anatomia foliar visando favorecer a adaptação às condições de alta luminosidade; como aumento da espessura foliar (Vogelmann et al., 1996) e também no alongamento das células do parênquima paliçádico para acomodar os cloroplastos, como será discutido a seguir. Quando as plantas são cultivadas em baixa luminosidade, o genótipo selvagem também apresenta uma espessura foliar menor

Figura 12: Cortes de secções transversais de plantas selvagens (WTSR1) (A), e transgênicas (TR1 e TR2) (B e C, respectivamente), cultivadas em alta luminosidade e coradas com Azul de Toluidina. Aumentos de 100 x.

quando comparado com as plantas transgênicas (Real, 1997 e Labate et al., 2000), entretanto, são sempre menores que a espessura das folhas de plantas cultivadas em alta luminosidade. Segundo Labate et al. (2000), as células do parênquima paliçádico são ainda menores e mais arredondadas e, para todos os genótipos quando comparados aos cultivados em alta luminosidade, os cloroplastos se concentram nas células em posições perpendiculares à incidência dos raios luminosos para garantir uma máxima interceptação e absorção de luz pelo cloroplasto e favorecer a fotossíntese. Com relação ao posicionamento dos cloroplastos, observa-se ainda o movimento destes no interior das células do parênquima paliçádico em resposta à intensidade e direção da luz incidente, em todos os genótipos, cultivados em alta luminosidade. Desse modo, quando as plantas são cultivadas em condições de alta luminosidade, os cloroplastos se concentram no sentido do comprimento das células, agora mais alongadas, paralelamente ao sentido de incidência dos raios luminosos. Mudanças semelhantes também foram descritas por alguns autores. Segundo Chow et al. (1988b), em *Alocasia*, a alta luminosidade leva os cloroplastos a se posicionarem linearmente nas paredes anticlinais (paralelas ao sentido de incidência dos raios luminosos) das células do parênquima paliçádico e do mesófilo, enquanto, sob condições de baixa luminosidade os cloroplastos acumularam-se ao longo das paredes periclinais das células. Mais recentemente, Park et al. (1996), trabalhando com plantas de ervilha e *Tradescantia albiflora* também encontraram alterações anatômicas após tratamentos com alta luminosidade. Os autores demonstraram que o movimento dos cloroplastos induzidos por alta luminosidade realmente ajudou a proteger o PSII do estresse de alta luz e por essa razão, deveria ser considerado uma estratégia fotoprotetora para aclimação das plantas a essas condições. Assim, tanto para as plantas selvagens (A) quanto transgênicas (B e C), Figura 12, são bem evidentes as mudanças na anatomia foliar visando favorecer a aclimação e o desenvolvimento das plantas e, ainda proteger o PSII da absorção de quantidades excessivas de luz, que podem levar ao processo de fotoinibição nessas condições de cultivo.

Vogelmann et al. (1996), observaram que as propriedades ópticas dos tecidos foliares individuais determinam como a luz é transmitida em uma folha intacta e influenciam na fixação de CO₂. A epiderme da maioria das folhas é formada de células

transparentes à luz visível e tem geralmente a forma plano-convexa, criando lentes celulares capazes de coletar e focar a luz. Apesar desta capacidade de focar a luz ser reconhecida a mais de 80 anos, apenas recentemente tornou-se possível medir esta intensificação de luz pelas células da epiderme foliar. A maioria das plantas é capaz de focalizar a luz para níveis elevados, assim a luz que entra no mesófilo pode ser concentrada em duas a três vezes acima da luz incidente. Estas propriedades das células da epiderme são importantes para as plantas que crescem na sombra, pois podem capturar a luz difusa minimizando a quantidade da luz refletida e, também, para plantas crescidas sob luz solar plena, pois aumenta a probabilidade de intercepção pelo cloroplasto. A maioria das folhas tem tecido paliçádico, que são mais desenvolvidos em plantas cultivadas em alta intensidade luminosa, facilitando a penetração da luz solar direta no interior das folhas. A luz que passa através do tecido paliçádico pode se perder e, para contornar esse problema existe o mesófilo esponjoso, que faz com que a luz retorne ao tecido paliçádico, aumentando a chance de ser absorvida pela fotossíntese. Através do ajuste da espessura, bem como da distribuição geométrica das células deste tecido, a estrutura foliar pode atuar no controle da distribuição da luz interna, potencializando a absorção da luz e maximizando a fixação do carbono de acordo com as condições ambientais de intensidade luminosa.

Assim, parece que as alterações observadas na anatomia foliar das plantas transgênicas de tabaco, como o aumento dos espaços intercelulares, que facilitam a difusão do CO₂, a organização do parênquima paliçádico e a disposição dos cloroplastos, podem atuar no controle da distribuição da luz interna, contribuindo para a aclimação das plantas cultivadas em alta luminosidade, sem comprometer a eficiência fotossintética como será demonstrado mais adiante.

Um outro aspecto importante, se refere as contagens do número de cloroplastos por célula do parênquima paliçádico, número de células do parênquima paliçádico por extensão foliar e número de células da epiderme superior por extensão foliar, de plantas selvagens e transgênicas cultivadas em alta luminosidade. Todas as contagens são apresentadas na Tabela 1. Observa-se que, as plantas selvagens apresentam um menor número de cloroplastos/célula quando comparado com as plantas transgênicas.

GENÓTIPOS	Número de cloroplastos/ célula do paliçádico	Número de células do paliçádico/ extensão foliar (mm)	Número de células da epiderme superior / extensão foliar (mm)
WISR1 (304)	27.50	45.33	33.08
TR1 (304)	37.67***	34.80***	22.65***
TR2 (304)	44.25***	36.53***	24.17***

***Significativo ao nível de 0.01% pelo Teste de Dunnett.

Tabela 1: Médias de contagens do número de cloroplastos/célula do parênquima paliçádico, número de células do parênquima paliçádico/extensão foliar (mm) e número de células da epiderme superior/extensão foliar (mm), de plantas selvagens e transgênicas, cultivadas em alta luminosidade. Os valores entre parênteses se referem ao número de células contadas para cada genótipo.

Entre as plantas transgênicas também foram observadas diferenças no número de cloroplastos/célula, onde o genótipo TR2 apresentou um maior número de cloroplastos quando comparado ao transgênico TR1 (Tabela1). Essa alteração no número de cloroplastos, altamente significativa, sugere que a superexpressão do gene *Lhcb1*2*, ainda sem sabermos exatamente de que forma, alterou o processo de biogênese dos cloroplastos. As células do parênquima paliçádico das plantas transgênicas são portanto, além de maiores, com maior número de cloroplastos. Em baixa luminosidade isso também ocorre, porém, as diferenças são observadas apenas entre os genótipos selvagens e transgênicos e, não entre os transgênicos (Labate et al., 2000). As diferenças no número de cloroplastos entre os transgênicos TR1 e TR2 podem ainda ser explicadas por um efeito de dosagem gênica. As plantas TR1 e TR2 apresentam, respectivamente, 1 e 4 cópias do gene *Lhcb1*2* estavelmente inseridas em seu genoma.

Segundo Possingham (1980), o efeito da luz na divisão dos cloroplastos é complicado. Em folhas inteiras e discos foliares de espinafre crescendo na luz, o desenvolvimento e o número de cloroplastos são geralmente relacionados com a quantidade (intensidade X tempo) de luz que as folhas são expostas. Sob diferentes intensidades luminosas, o produto do tamanho do cloroplasto e número quando dividido pela área celular pode ser quase constante, sugerindo que uma superfície de áreas de

células foliares relativamente constante é ocupada por cloroplastos (Possingham, 1976). Corroborando com tal afirmação, a Tabela 1 mostra ainda que as plantas transgênicas apresentam tanto um menor número de células do parênquima paliçádico por extensão foliar quanto um menor número de células da epiderme superior por extensão foliar. Esse menor número de células por extensão foliar é esperado pois as células da epiderme superior e do parênquima paliçádico das plantas transgênicas (TR1 e TR2) são maiores quando comparado com as selvagens. Assim, as plantas selvagens apresentam um maior número de células, porém menores e com número reduzido de cloroplastos.

Ainda não se sabe quais mecanismos nas plantas transgênicas seriam responsáveis por alterações anatômicas nas células do parênquima de plantas transgênicas. Já está bem estabelecido que, o número de cloroplastos, conteúdo de clorofila e acumulação fotossintética de proteínas são fenômenos relacionados positivamente com tamanho da célula. Meehan et al. (1996), analisaram mutantes variegados (*immutans*) de *Arabidopsis thaliana*, contendo setores verdes e brancos nas folhas, devido a ação de um gene nuclear recessivo e, verificaram que os setores verdes continham cloroplastos fenotipicamente normais, e nos brancos, os plastídios não continham pigmentos e estruturas lamelares. As análises moleculares revelaram que o mRNA do gene *Lhcb* se acumulava em níveis insignificantes nesses setores brancos, se comparados aos verdes. A análise de populações homogêneas de protoplastos verdes e brancos de plantas transgênicas *immutans*, que superexpressavam o promotor do gene *Lhcb* ligado ao gene repórter GUS, revelou que há uma relação positiva e linear entre a transcrição do gene *Lhcb*, conteúdo de clorofila e tamanho da célula. Isto reforça a noção de que a expressão do gene *Lhcb* e a biossíntese de clorofila são eventos coordenados, e esta coordenação pode estar ligada a fatores relacionados ao tamanho celular.

Kühlbrandt (1990), encontrou unidades destacadas (não associadas ao centro de reação) dentro da membrana do tilacóide formando possivelmente trimeros. Segundo Graan & Ort (1986), se há mais LHCII do que centros de reação do PSII então é possível que este LHCII “extra” funcione principalmente no empilhamento do grana e não como coletor de luz. O aumento do empilhamento poderia promover o aumento das células e até certo limite poderia também funcionar como um sinal para induzir a divisão dos

cloroplastos. Desse modo, a expressão constitutiva do gene *Lhcb1*2*, além de alterar o número de cloroplastos e também o tamanho das células do parênquima paliádico e da epiderme superior, como discutido acima, pode estar induzindo o acúmulo de unidades triméricas isoladas no tilacóide dos grana e desse modo, alterando todo o processo de empilhamento do grana e organização dos cloroplastos e consequentemente o processo de biogênese dos cloroplastos.

Finalmente o maior empilhamento poderia então promover uma diminuição na quantidade de luz absorvida protegendo o PSII do efeito fotoinibitório da alta luminosidade, impedindo a diminuição da eficiência fotossintética nessas condições. Os resultados das taxas de assimilação de CO₂ de plantas selvagens e transgênicas, cultivadas em alta luminosidade, que será discutida mais adiante, mostram que, as plantas transgênicas mesmo com o aumento da expressão de uma proteína da antena coletora de luz, ao contrário do que se poderia esperar, são capazes de lidar com o excesso de energia, não apresentando diferenças nas taxas fotossintéticas quando comparadas com as plantas selvagens. Em outras palavras, o aumento das antenas não foi prejudicial ao funcionamento das plantas transgênicas em alta luminosidade.

Alterações morfológicas que se refletem tanto na estrutura anatômica das folhas quanto no fenótipo da planta, estão relacionados com mecanismos de fotoaclimação e de fotoproteção que visam proteger o aparato fotossintético em condições de alta luminosidade. Dessa forma, é importante observar que apesar da expressão constitutiva do gene *Lhcb1*2*, as plantas transgênicas conseguem se aclimatar às condições de cultivo em alta luminosidade, que podem ser justificados pelos valores das taxas fotossintéticas e pelas alterações na anatomia foliar e em outros processos fisiológicos e metabólicos como dissipação mais eficiente do excesso de energia, estequiometria dos fotossistemas, metabólitos do ciclo de Calvin-Benson, entre outros que serão discutidos mais adiante.

Há ainda necessidade de outras análises de microscopia, em plantas transgênicas cultivadas em alta luminosidade para verificar se estas realmente mostram diferenças no empilhamento dos grana.

4.2 - Assimilação de CO₂ e Fluorescência da Clorofila *a*

As taxas de assimilação de CO₂ ($\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), P_i (pressão parcial intercelular de CO₂- μbar) e parâmetros de fluorescência da clorofila (F_v/F_m , q_N , ϕ_{PSII} e $1-q_P$) de experimentos realizados com plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2), cultivadas em condições de baixa (80-100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) e alta luminosidade (casa-de-vegetação) encontram-se nas Tabelas 2, 3 e 4, respectivamente. Todas as análises foram realizadas em alta luminosidade (1000-1200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), entretanto, na Tabela 2 os valores das taxas de fotossíntese e de fluorescência da clorofila *a* foram determinados em condições atmosféricas de CO₂ (340ppm de CO₂) e nas Tabelas 3 e 4 estão os mesmos parâmetros, porém obtidos em condições de saturação de CO₂ (800ppm de CO₂) para minimizar os efeitos fotorrespiratórios. Os dados obtidos nas Tabelas 2 e 4 são de plantas cultivadas em baixa luminosidade e os da Tabela 3, são de plantas cultivadas em alta luminosidade.

Os resultados da Tabela 2 mostram que quando as plantas são cultivadas em baixa luminosidade e analisadas em condições atmosféricas de CO₂ (340ppm de CO₂) e em alta luminosidade (1000-1200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), as taxas fotossintéticas das plantas transgênicas (TR1 e TR2) não diferiram significativamente das plantas selvagens. Quando plantas cultivadas nessas mesmas condições são analisadas em condições de saturação de CO₂ (800 ppm de CO₂) e alta luminosidade (1000-1200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) (Tabela 4), observa-se que os valores das taxas fotossintéticas aumentam para todos os genótipos, porém, não há diferença significativa nas taxas de assimilação entre plantas selvagens e transgênicas. Com o aumento no fornecimento de CO₂ é esperado que o sistema responda com mais fotossíntese por diminuir a taxa de fotorrespiração, o que foi evidenciado em todos os genótipos. Apesar do aumento na taxa fotossintética não ter sido grande, principalmente nos transgênicos, o mais importante é que não ocorreu queda na assimilação de CO₂, que indicaria alguma limitação. Isso evidencia que as plantas atingiram a máxima capacidade para essas condições.

Cultivadas em baixa luminosidade e analisadas em concentração atmosférica de CO ₂						
GENÓTIPOS	A	Pi	F _v /F _M	q _N	φPSII	1-q _P
WTSR1 (10)	5.8±1.1	273±57	0.815±0.01	0.881±0.04	0.154±0.04	0.511±0.10
TR1 (10)	6.3±0.7 ^{ns}	217±66 ^{ns}	0.826±0.01 *	0.901±0.02 ^{ns}	0.167±0.02 ^{ns}	0.465±0.08 ^{ns}
TR2 (10)	6.3±0.9 ^{ns}	231±75 ^{ns}	0.825±0.01 *	0.895±0.02 ^{ns}	0.152±0.02 ^{ns}	0.552±0.07 ^{ns}

***Significativo à 0.05% pelo Teste de Dunnett. ns=não significativo.

Tabela 2: Taxas de assimilação de CO₂ (A) em $\mu\text{molCO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, *Pi* (pressão parcial intercelular de CO₂) em μbar e parâmetros de fluorescência da clorofila (F_v/F_M, q_N, φPSII e 1-q_P) de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2) ± o desvio padrão. As plantas foram cultivadas em condições de baixa luminosidade e as análises foram conduzidas em condições atmosféricas de CO₂ e com intensidade luminosa de 1000-1200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Os valores entre parênteses referem-se ao número de plantas analisadas para cada genótipo.

A Tabela 3 mostra que, quando as plantas foram cultivadas em condições de alta luminosidade (casa-de-vegetação) e analisadas também em alta luminosidade (1000-1200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) e em alta concentração de CO₂ (800 ppm de CO₂) para diminuir os efeitos da fotorrespiração, a taxa de assimilação de CO₂ também não diferiu entre os genótipos.

Esses resultados são muito importantes, pois em todos eles, observa-se que mesmo com a superexpressão do gene *Lhcb1*2*, as plantas transgênicas, ao contrário do que se poderia imaginar, mantém taxas de assimilação de CO₂ que não diferem da apresentada pelas plantas selvagens.

Durante a fotossíntese os espaços intercelulares provavelmente têm uma pressão parcial de CO₂ menor que a pressão atmosférica. Em estudos de trocas gasosas, a pressão parcial de CO₂ nos espaços intercelulares (*Pi*) é um parâmetro que indica o efeito que o estômato tem sobre a folha (Farquhar & Caemmerer, 1982; Sharkey, 1985). As Tabelas 2, 3 e 4 mostram ainda que não houve diferenças na pressão parcial intercelular de CO₂ (*Pi*) entre plantas transgênicas e selvagens, indicando que não há restrição na

Cultivadas em alta luminosidade e analisadas em alta concentração de CO ₂						
GENÓTIPOS	A	Pi	F _v /F _M	q _N	φPSII	1-q _P
WTSR1 (10)	10,5±1,1	672±74	0,800±0,007	0,588±0,02	0,245±0,01	0,608±0,02
TR1 (10)	10,8±0,4 ^{ns}	686±33 ^{ns}	0,806±0,009 ^{ns}	0,721±0,02*	0,272±0,01 ^{ns}	0,487±0,02*
TR2 (10)	11,0±0,7 ^{ns}	583±55 ^{ns}	0,813±0,004 ^{ns}	0,708±0,02*	0,259±0,01 ^{ns}	0,534±0,01*

***Significativo à 0.05% pelo Teste de Dunnett. ns=não significativo.

Tabela 3: Taxas de assimilação de CO₂ (A) em $\mu\text{molCO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, Pi (pressão parcial intercelular de CO₂) em μbar e parâmetros de fluorescência da clorofila (F_v/F_M, q_N, φPSII e 1-q_P) de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2) ± o desvio padrão. As plantas foram cultivadas em condições de alta luminosidade e as análises foram conduzidas em altas concentrações de CO₂ e com intensidade luminosa de 1000-1200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Os valores entre parênteses referem-se ao número de plantas analisadas para cada genótipo.

taxa fotossintética devido às diferenças na resistência estomática, em quaisquer condições de cultivo ou análises. Segundo Terashima (1988), os valores de pressão parcial intercelular de CO₂ (Pi) têm sido também usados para avaliar os efeitos de determinados tipos de estresse na capacidade fotossintética do mesófilo. Dessa forma, os valores semelhantes de Pi, entre as plantas transgênicas e selvagens, mostram ainda que estas plantas estavam bem aclimatadas às condições de cultivo e não sofreram nenhum tipo de estresse durante a análise.

A determinação dos parâmetros de fluorescência foi feita juntamente com a taxa de fotossíntese. Segundo Krause & Weis (1991), a compreensão dos componentes que diminuem a fluorescência da clorofila fornecem informações importantes sobre o estado funcional do aparato fotossintético e mais especificamente sobre a eficiência do PSII.

O valor de F_v/F_M é uma medida da máxima eficiência das reações fotoquímicas do PSII e representa a eficiência de captura da energia de excitação pelos centros de reação do PSII em folhas adaptadas no escuro. Esse parâmetro apresenta valores que variam de 0,75 a 0,85 entre folhas de diferentes espécies e ecótipos (Kitajima & Butler, 1975; Butler & Kitajima, 1989; Krause & Weis, 1991; Havaux, 1992 e 1994). Segundo

Cultivadas em baixa luminosidade e analisadas em alta concentração de CO ₂						
GENÓTIPOS	A	Pi	F _v /F _M	q _N	φPSII	1-q _P
WTSR1 (11)	7,9±0,7	649±23	0,814±0,004	0,748±0,03	0,225±0,02	0,566±0,02
TR1 (11)	7,3±0,6 ^{ns}	641±27 ^{ns}	0,806±0,001 ^{ns}	0,817±0,01 ^{ns}	0,215±0,01 ^{ns}	0,536±0,02 ^{ns}
TR2 (11)	7,1±0,5 ^{ns}	621±33 ^{ns}	0,818±0,003 ^{ns}	0,809±0,02 ^{ns}	0,224±0,01 ^{ns}	0,495±0,01*

***Significativo à 0.05% pelo Teste de Dunnett. ns=não significativo.

Tabela 4: Taxas de assimilação de CO₂ (A) em $\mu\text{molCO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, Pi (pressão parcial intercelular de CO₂) em μbar e parâmetros de fluorescência da clorofila (F_v/F_M, q_N, φ_{PSII} e 1-q_P) de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2) ± o desvio padrão. As plantas foram cultivadas em condições de baixa luminosidade e as análises foram conduzidas em altas concentrações de CO₂ e com intensidade luminosa de 1000-1200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Os valores entre parênteses referem-se ao número de plantas analisadas para cada genótipo.

Krause & Weis (1991), estresses ambientais, causados por fatores bióticos ou abióticos, que afetam a eficiência do PSII levam à diminuição do F_v/F_M. As Tabelas 2, 3 e 4 mostram que todos os genótipos apresentaram valores da relação F_v/F_M bem próximos do esperado para plantas que não estão sofrendo qualquer tipo de estresse. Isso evidencia que no momento da análise, quando os valores dessa relação foram determinados, as plantas estavam bem aclimatadas ao ambiente em que foram cultivadas.

Os valores da eficiência do transporte de elétrons no PSII (φ_{PSII}) foram determinados usando a metodologia proposta por Genty et al. (1989), seguindo as terminologias descritas por Kooten & Snel (1990). As Tabelas 2, 3, e 4 mostram que, não há diferenças no valor de φ_{PSII} entre as plantas selvagens e transgênicas, em todas as condições de análise, ou seja, 1000-1200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sob condições ambientais e de saturação de CO₂, tanto para as plantas cultivadas em alta quanto em baixa luminosidade.

Os valores de 1-q_P que representam a relativa extensão de redução da Q_A, são menores para os genótipos transgênicos, mostrando que as plantas selvagens, nestas

condições de cultivo e análise, possuem uma maior proporção de Q_A no estado reduzido e, portanto estão mais impossibilitadas de transferir ou receber elétrons da clorofila a, e consequentemente promover qualquer reação fotoquímica. Segundo Krause & Weiss (1991) a fotoinibição parece aumentar com o aumento do estado reduzido da Q_A . Isso mostra que as plantas selvagens sofrem mais com a alta luminosidade que as plantas transgênicas. Até mesmo para as plantas aclimatadas em alta luminosidade e analisadas nas mesmas condições descritas acima (alta luminosidade e alto CO_2) (Tabela 3), as plantas selvagens também se mostram mais limitadas, evidenciado significativamente pelos maiores valores de $1-q_P$.

Isso sugere que as plantas transgênicas apesar da maior antena do PSII, usam a energia disponível de maneira mais eficiente em qualquer condição de cultivo, possivelmente devido a mecanismos mais eficientes de dissipação do excesso de energia, como por exemplo o valor de q_N , que será discutido abaixo.

Segundo Krause & Weis (1991), o mecanismo de “quenching” não-fotoquímico funciona como controle e desativação dos pigmentos excessivamente excitados, tendo então função fotoprotetora contra os efeitos destrutivos da alta luminosidade. Já foi também observado que em condições de q_N elevado, a fotoinibição é reduzida.

As Tabelas 2 e 4 mostram que os valores de q_N são maiores para as plantas transgênicas e, que apesar de não diferirem estatisticamente do valor de q_N apresentado pelas plantas selvagens, evidenciam uma tendência, que se confirma nos resultados da Tabela 3.

Como já mencionado, todas as análises são realizadas em alta luminosidade e, quando estes valores são obtidos de plantas aclimatadas à essa condição, ou seja, cultivadas em alta luminosidade, como nos dados da Tabela 3, os valores de q_N das plantas transgênicas são estatisticamente maiores que o apresentado pelas plantas selvagens. Sendo o q_N um parâmetro relacionado com a capacidade de proteção à fotoinibição e quanto maiores esses valores menor a fotoinibição, isto demonstra a capacidade de aclimação das plantas transgênicas.

O “quenching” não-fotoquímico pode ser causado por vários fatores, mas a maior proporção se origina de uma dissipação na forma de calor sendo referido como q_E . O aumento no q_E é uma estratégia fisiológica para “descarregar” a energia de excitação

como calor, antes que cheguem ao centro de reação do PSII. Dessa forma, as plantas podem proteger a si próprias contra o excesso de luz. Segundo Demmig-Adams (1990) e Demmig-Adams & Adams (1992), a dissipação térmica é estimada pelo valor de NPQ, mostrado na Tabela 5.

GENÓTIPOS	NPQ – plantas cultivadas em baixa luminosidade	NPQ – plantas cultivadas em alta luminosidade
WTSR1	1.60±0.14	0.93±0.08
TR1	2.00±0.10**	1.43±0.10**
TR2	1.95±0.11 ^{n.s}	1.39±0.12**

**Significativo à 0.05% pelo Teste de Dunnett. n.s = não significativo

Tabela 5: Valores da fração de dissipação térmica (NPQ) do “quenching” não-fotoquímico (q_N) obtidos de plantas analisadas em alta luminosidade (1000-1200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e saturação de CO_2 (800 ppm de CO_2) tanto para cultivo em baixa quanto alta luminosidade.

A Tabela 5 mostra que os valores de NPQ é maior nos exemplares transgênicos principalmente quando estes foram cultivados em alta luminosidade e, portanto, estão aclimatados às condições de análise. Convém acrescentar ainda que apesar das plantas transgênicas apresentarem um maior número de cloroplastos/célula do parênquima paliádico (Tabela 1) e conseqüentemente um menor número de cloroplastos/extensão foliar, os valores da taxa de assimilação não são menores, ao contrário, eles não diferem do valor apresentado pelos exemplares selvagens e ainda mantém uma menor redução da Q_A ($1-q_P$) e um melhor mecanismo de dissipação contra o excesso de energia evidenciado pelos maiores valores de q_N e NPQ.

Os resultados das análises de fotossíntese e de fluorescência da clorofila *a* registram as diferenças entre plantas transgênicas e selvagens. Os dados de assimilação de CO_2 evidenciam que as plantas transgênicas adaptam-se à alta luminosidade, aproveitando de maneira mais eficiente a energia disponível no ambiente quando são cultivadas desde o início nessas condições, que pode ser visto na Tabela 3, onde as análises foram feitas em plantas aclimatadas à alta luminosidade. Provavelmente, deve

ocorrer alguma alteração na estequiometria dos fotossistemas e/ou dos componentes do transporte de elétrons além de mecanismos de transição de estado (estado 1-estado 2), que se ajustam a nova condição de excesso de luz ao lado das mudanças na anatomia foliar e morfologia, discutidos anteriormente.

4.3 - Experimentos de Estresse de Frio

Baixas temperaturas reduzem a capacidade dos sistemas fotossintéticos utilizarem a radiação luminosa, podendo levar ao processo de fotoinibição, caracterizado pela excessiva excitação das membranas do tilacóide e subsequente prejuízo para a função fotossintética (Öquist e Huner, 1991). Convém considerar que a intensidade de luz capaz de causar algum dano para o sistema de transporte de elétrons depende das condições fisiológicas da planta. Assim, em situações de estresse, mesmo uma baixa intensidade luminosa pode ser suficiente para causar a destruição das moléculas transportadoras de elétrons.

Como já comentado, os experimentos de estresse de frio foram delineados para permitir comparações entre os genótipos no que se refere aos mecanismos fotoadaptativos e fotoprotetores, em função da observação dos valores das taxas fotossintéticas e parâmetros de fluorescência da clorofila α . Nesses experimentos, as plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2) foram mantidas em câmara-fria (4°C) sob iluminação ($300\text{--}400\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) por cerca de duas horas e meia. Em seguida foram colocadas no escuro por 1 hora e então submetidas às análises de fotossíntese e fluorescência da clorofila α , tanto em condições atmosféricas ($\sim 360\text{ppm}$ de CO_2), quanto em condições de saturação de CO_2 (800 ppm de CO_2). Os resultados obtidos são mostrados nas Tabelas 6, 7, 8 e 9.

As Tabelas 6 e 7 apresentam as taxas de assimilação de CO_2 ($\mu\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), P_i (pressão parcial intercelular de CO_2 - μbar) e parâmetros de fluorescência da clorofila (F_v/F_m , q_N , ΦPSII e $1-q_P$) de experimentos de estresse de frio, realizados com plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2), cultivadas em condições de baixa (100

$\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e alta luminosidade (casa-de-vegetação), respectivamente. As análises foram realizadas em condições de saturação de CO_2 (800ppm de CO_2) para minimizar os efeitos fotorrespiratórios e, alta luminosidade (1000 a 1200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Os resultados da Tabela 6 mostram que quando as plantas são cultivadas em baixa luminosidade e analisadas em alta luminosidade e saturação de CO_2 , as selvagens não apresentam diferenças na taxa de assimilação de CO_2 , quando comparado com as plantas transgênicas apesar dessas últimas mostrarem uma tendência à maiores taxas de assimilação de CO_2 . Isto é possivelmente justificado pela ausência de diferenças na eficiência do PSII (ϕPSII) para todos os genótipos. Resultados semelhantes foram obtidos quando as plantas foram cultivadas em alta luminosidade e analisadas nas mesmas condições e altas concentrações de CO_2 (Tabela 7). Nesta, observa-se que a taxa de assimilação de CO_2 apesar de ter aumentado devido a maior disponibilidade de CO_2 , os valores da ϕPSII também não diferiram significativamente entre os genótipos. Pode-se observar ainda que tanto em condições de baixa luminosidade quanto em alta

Estresse de Frio						
Plantas cultivadas em baixa luminosidade e analisadas em altas concentrações de CO_2						
GENÓTIPOS	A	Pi	F_v/F_m	q_N	ϕPSII	1- q_P
WTSR1 (10)	7,7±1,1	694±17	0,785±0,01	0,784±0,01	0,148±0,01	0,668±0,02
TR1 (10)	8,2±0,8 ^{ns}	681±21 ^{ns}	0,770±0,01 ^{ns}	0,794±0,02 ^{ns}	0,149±0,01 ^{ns}	0,626±0,03 ^{ns}
TR2 (9)	9,1±1,2 ^{ns}	657±32 ^{ns}	0,772±0,01 ^{ns}	0,813±0,01 ^{ns}	0,149±0,01 ^{ns}	0,635±0,02 ^{ns}

***Significativo à 0.05% pelo Teste de Dumett. ns=não significativo.

Tabela 6: Taxas de assimilação de CO_2 (A) em $\mu\text{molCO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, Pi (pressão parcial intercelular de CO_2) em μbar e parâmetros de fluorescência da clorofila (F_v/F_m , q_N , ϕPSII e 1- q_P) de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2) $\pm$ o desvio padrão de experimentos de estresse de frio. As plantas foram cultivadas em condições de baixa luminosidade e as análises foram conduzidas em altas concentrações de CO_2 e com intensidade luminosa de 1000-1200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Os valores entre parênteses referem-se ao número de plantas analisadas para cada genótipo

luminosidade (Tabelas 6 e 7, respectivamente), os valores de q_N mostram sempre a tendência de elevação nas plantas transgênicas, mesmo que estas diferenças não sejam significativas.

Com relação aos valores de $1-q_p$, quando as plantas são cultivadas em baixa luminosidade e analisadas em alta luminosidade (Tabela 6), os valores de $1-q_p$ são semelhantes para todos os genótipos. Quando as plantas são cultivadas em alta luminosidade e analisadas nessa condição para as quais já estão aclimatadas, após a aplicação do estresse de frio, novamente não há diferenças significativas entre os genótipos para este parâmetro. Entretanto, nas Tabelas 6 e 7 observa-se a tendência de maiores valores de q_N e redução de $1-q_p$ para as plantas transgênicas. $1-q_p$ representa a proporção de Q_A no estado reduzido (fechado) impossibilitado de receber ou transferir elétrons. Desse modo, quanto maior o valor de $1-q_p$, e menor o transporte de elétrons pelo PSII.

Estresse de Frio						
Plantas cultivadas em alta luminosidade e analisadas altas concentrações de CO_2						
GENÓTIPOS	A	P_i	F_v/F_M	q_N	ϕ_{PSII}	$1-q_p$
WTSR1 (9)	14,1±1,8	629±27	0,773±0,02	0,585±0,03	0,330±0,01	0,459±0,02
TR1 (8)	11,9±2,0 ^{ns}	661±33 ^{ns}	0,774±0,01 ^{ns}	0,628±0,03 ^{ns}	0,307±0,01 ^{ns}	0,447±0,02 ^{ns}
TR (9)	13,6±1,5 ^{ns}	648±27 ^{ns}	0,757±0,02 ^{ns}	0,665±0,04 ^{ns}	0,288±0,02 ^{ns}	0,440±0,03 ^{ns}

***Significativo à 0.05% pelo Teste de Dunnett. ns=não significativo.

Tabela 7: Taxas de assimilação de CO_2 (A) em $\mu mol CO_2.m^{-2}.s^{-1}$, P_i (pressão parcial intercelular de CO_2) em μbar e parâmetros de fluorescência da clorofila (F_v/F_M , q_N , ϕ_{PSII} e $1-q_p$) de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2) $\pm$ o desvio padrão de experimentos de estresse de frio. As plantas foram cultivadas em condições de alta luminosidade e as análises foram conduzidas em altas concentrações de CO_2 e com intensidade luminosa de 1000-1200 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$. Os valores entre parênteses referem-se ao número de plantas analisadas para cada genótipo.

As Tabelas 8 e 9 mostram resultados bastante interessantes. Elas apresentam as taxas de assimilação de CO₂ ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), P_i (pressão parcial intercelular de CO₂- μbar) e parâmetros de fluorescência da clorofila (F_v/F_m , q_N , ϕPSII e $1-q_P$) de experimentos de estresse de frio, realizados com plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2), cultivadas em condições de baixa ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) e alta luminosidade (casa-de-vegetação), respectivamente. As análises foram realizadas em condições atmosféricas de CO₂ e em alta luminosidade ($1000\text{-}1200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Os resultados da Tabela 8 mostram que quando as plantas são cultivadas em baixa luminosidade a taxa de assimilação de CO₂ entre as plantas transgênicas e selvagens novamente não diferiu significativamente. Nestas condições os valores de ϕPSII , $1-q_P$ e q_N também não diferiram significativamente entre os genótipos, todavia, observa-se a tendência de aumento nos valores de q_N e redução de $1-q_P$ para as plantas transgênicas.

Estresse de Frio						
Plantas cultivadas em baixa luminosidade e analisadas em condições atmosféricas de CO ₂						
GENÓTIPOS	A	P_i	F_v/F_m	q_N	ϕPSII	$1-q_P$
WTSR1 (8)	$8,0 \pm 0,5$	375 ± 11	$0,757 \pm 0,01$	$0,796 \pm 0,03$	$0,175 \pm 0,01$	$0,555 \pm 0,02$
TR1 (6)	$6,8 \pm 0,6^{ns}$	376 ± 12^{ns}	$0,747 \pm 0,01^{ns}$	$0,860 \pm 0,01^{ns}$	$0,135 \pm 0,01^{ns}$	$0,553 \pm 0,03^{ns}$
TR2 (7)	$6,1 \pm 0,8^{ns}$	374 ± 12^{ns}	$0,759 \pm 0,01^{ns}$	$0,865 \pm 0,01^{ns}$	$0,135 \pm 0,01^{ns}$	$0,537 \pm 0,03^{ns}$

***Significativo à 0.05% pelo Teste de Dumett. ns=não significativo.

Tabela 8: Taxas de assimilação de CO₂ (A) em $\mu\text{molCO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, P_i (pressão parcial intercelular de CO₂) em μbar e parâmetros de fluorescência da clorofila (F_v/F_m , q_N , ϕPSII e $1-q_P$) de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2) $\pm$ o desvio padrão de experimentos de estresse de frio. As plantas foram cultivadas em condições de baixa luminosidade e as análises foram conduzidas em concentrações atmosféricas de CO₂ e com intensidade luminosa de $1000\text{-}1200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Os valores entre parênteses referem-se ao número de plantas analisadas para cada genótipo.

A Tabela 9 mostra que quando as plantas são cultivadas em casa-de-vegetação e analisadas em alta luminosidade e concentração atmosférica de CO₂, as taxas de assimilação de CO₂ são significativamente menores para as plantas transgênicas. Essa redução da assimilação é possivelmente justificada pela maior eficiência do PSII (ϕ PSII) nas plantas selvagens quando comparado com os materiais transgênicos (TR1 e TR2).

Labate et al. (2000), observaram o padrão de migração de bandas referentes às porções triméricas e monoméricas do LHCII, de plantas de ervilha em comparação com plantas selvagens e transgênicas de petúnia e tabaco que expressam constitutivamente o gene *Lhcb1*2* de ervilha. Os resultados obtidos mostraram que apesar da proteína endógena estar presente, a porção dominante das proteínas do complexo é produto da expressão do transgene. Segundo os autores, alterações obtidas no comportamento de migração das bandas refletem mudanças na composição de pigmentos e/ou lipídeos dentro dos complexos. Desse modo, pode estar ocorrendo uma diferença em relação ao lipídeos, que nestas condições é desvantajoso para as plantas transgênicas promovendo assim uma redução na fotossíntese e na eficiência do PSII. Aliado a isso tem-se ainda o

Estresse de Frio						
Plantas cultivadas em alta luminosidade e analisadas em condições atmosféricas de CO ₂						
GENÓTIPOS	A	Pi	F _v /F _M	q _N	ϕ PSII	1-q _p
WTSR1 (5)	13,0±1,1	344±8	0,775±0,02	0,665±0,04	0,282±0,01	0,464±0,03
TR1 (5)	9,0±1,3*	331±8 ^{ns}	0,763±0,02 ^{ns}	0,859±0,03*	0,207±0,02*	0,384±0,02 ^{ns}
TR2 (5)	7,9±0,6*	335±6 ^{ns}	0,762±0,02 ^{ns}	0,863±0,02*	0,194±0,02*	0,361±0,07 ^{ns}

***Significativo à 0.05% pelo Teste de Dunnett. ns=não significativo.

Tabela 9: Taxas de assimilação de CO₂ (A) em $\mu\text{molCO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, Pi (pressão parcial intercelular de CO₂) em μbar e parâmetros de fluorescência da clorofila (F_v/F_M, q_N, ϕ PSII e 1-q_p) de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2) $\pm$ o desvio padrão de experimentos de estresse de frio. As plantas foram cultivadas em condições de alta luminosidade e as análises foram conduzidas em concentrações atmosféricas de CO₂ e com intensidade luminosa de 1000-1200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Os valores entre parênteses referem-se ao número de plantas analisadas para cada genótipo.

efeito da fotorrespiração uma vez que as análises foram conduzidas em condições atmosféricas de CO_2 , e portanto favorecendo a competição entre o O_2 e o CO_2 pela Rubisco, promovendo possivelmente alterações no Ciclo de Calvin e consequentemente “feedback” do processo fotossintético.

Pela Tabela 9 observa-se ainda que os valores de $1-q_p$ não diferiram significativamente entre os genótipos enquanto os valores de q_N foram significativamente maiores para os transgênicos se confirmando como um mecanismo de defesa do PSII contra os efeitos da alta luminosidade.

Segundo Krause & Weis (1991), o mecanismo de “quenching” não-fotoquímico funciona como controle e desativação dos pigmentos excessivamente excitados, tendo então função fotoprotetora contra os efeitos destrutivos da alta luminosidade. Já foi também observado que em condições de q_N elevado a fotoinibição é diminuída. Como já mencionado, o “quenching” não fotoquímico pode ser causado por vários fatores, mas a maior proporção se origina de uma dissipação na forma de calor sendo referido como q_E . O aumento no q_E é uma estratégia fisiológica para “descarregar” a energia de excitação como calor, antes que cheguem ao centro de reação do PSII. Dessa forma, as plantas podem proteger o fotossistema II contra o excesso de luz. A violaxantina é importante com relação ao q_E , pois condições que induzem o q_E também causam a sua de-epoxidação, formando a zeaxantina, e há fortes correlações entre a formação da zeaxantina e a extensão do “quenching” (Horton et al., 1991). As variações no conteúdo de carotenóides do ciclo das xantofilas entre plantas transgênicas e selvagens serão discutidos mais adiante.

Schöner e Krause (1990) mostraram que aumentos nos níveis de luteína e zeaxantina em espinafre durante aclimação a condições de frio estão correlacionados com resistência a fotoinibição em baixas temperaturas. Todavia, Foyer et al. (1990), não encontraram correlação entre zeaxantina e “quenching” de fluorescência da clorofila a durante a exposição de folhas de cevada à altas intensidades luminosas ($1400\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) por 5 horas. Além disso, eles observaram que a formação de zeaxantina precedeu o “quenching” de fluorescência e esteve presente após completa recuperação das plantas da fotoinibição. Hurry et al. (1992) também demonstraram que o acúmulo de grandes

conteúdos de zeaxantina não conferem aumento de tolerância a estresse fotoinibitório em trigo. Gillham e Dodge (1987), demonstraram que plantas de feijão crescendo a altas intensidades luminosas e baixas temperaturas contém altos níveis de ascorbato e de enzimas antioxidantes quando comparadas com as plantas crescendo em baixa luminosidade.

Em estudos de trocas gasosas, a pressão parcial do CO_2 nos espaços intercelulares (P_i) é um parâmetro que indica o efeito que o estômato tem sobre a folha (Farquhar & Caemmerer, 1982; Sharkey, 1985). As Tabelas 6, 7, 8 e 9 mostram ainda que não houve diferenças na pressão parcial intercelular de CO_2 (P_i) entre plantas transgênicas e selvagens, indicando que não há restrição na taxa fotossintética devido às diferenças na resistência estomática, em quaisquer condições de cultivo e análises. Segundo Terashima (1988), os valores de pressão parcial intercelular de CO_2 (P_i) têm sido também usados para avaliar os efeitos de determinados tipos de estresse na capacidade fotossintética do mesófilo. Dessa forma, os valores semelhantes de P_i , entre as plantas transgênicas e selvagens, mostram ainda que estas plantas estavam bem aclimatadas às condições de cultivo e não sofreram nenhum tipo de estresse durante a análise.

O valor de F_v/F_M é uma medida da eficiência máxima das reações fotoquímicas do PSII e representa a eficiência de captura da energia de excitação pelos centros de reação do PSII em folhas adaptadas no escuro. Esse parâmetro apresenta valores que variam de 0,75 a 0,85 entre folhas de diferentes espécies e ecótipos (Kitajima & Butler, 1975; Butler & Kitajima, 1989; Krause & Weis, 1991; Havaux, 1992 e 1994). Segundo Krause & Weis (1991), estresses ambientais, causados por fatores bióticos ou abióticos, que afetam a eficiência do PSII levam a uma diminuição do F_v/F_M . As Tabelas 6, 7, 8 e 9 mostram que todos os genótipos (plantas selvagens e transgênicas) apresentaram valores da relação F_v/F_M bem próximos do esperado para plantas que não estão sofrendo qualquer tipo de estresse. Isso evidencia que no momento da análise, quando os valores dessa relação foram determinados, as plantas estavam bem aclimatadas ao ambiente em que foram cultivadas.

Arvidson et al. (1997) mostraram que para tilacóides isolados a temperatura exerce uma forte influência na taxa de conversão de violaxantina e no grau de conversão

máxima. Desse modo, apenas 50% de conversão foi detectada a 4°C quando a fluidez da membrana é baixa restringindo a migração, enquanto a 25°C e a 37°C o grau de conversão foi de 70% e 80%, respectivamente. Os autores sugeriram que a conversão de violaxantina é restrita pela interação com complexos pigmento-proteína na antena e que sob iluminação a violaxantina migra para a matriz lipídica para ser convertida.

Estudos recentes sobre fosforilação de proteínas do tilacóide mostraram que fortes condições fotoinibitórias, as quais decrescem a fosforilação do LHCII, levam, por sua vez, à fosforilação do Lhcb4 (CP29) da antena interna (Bergantino et al., 1995). As fosforilações da CP29, contrariamente do LHCII, não induzem destacamento da proteína do "core complex" do PSII (Mauro et al., 1997). Fosforilações da CP29 têm sido relacionadas com o aumento de resistência a fotoinibição induzida pelo estresse de frio. Isto se deve às observações de que genótipos com altas taxas de fosforilação da CP29 mostraram um pequeno decréscimo na taxa F_v/F_M sob frio, na luz (Bergantino et al., 1995) e aumento nas de reações não-fotoquímicas (Mauro et al., 1997), possivelmente devido à mudanças conformacionais que levam a uma modificação das propriedades espectrais da proteína purificada (Croce et al., 1996) e a qual pode ser reversível por tratamento com fosfatase alcalina (Bassi et al., 1997). Esses resultados sugerem que CP29 pode ser o sítio para um mecanismo de dissipação de energia diferente da dissipação dependente de zeaxantina o qual contribui para a proteção da fotoinibição do PSII (Bassi et al., 1997). Uma outra função para esse mecanismo reversível pode ser inferido pela constatação de que condições que causam fosforilações da CP29 levam a uma repressão da transcrição do gene LHC enquanto esse controle é inibido por inibidores quinase (Escoubas et al., 1995). Uma vez que CP29 é hábil para sentir ambas, a diminuição do pH do lúmen (Walters et al., 1994; Pesaresi et al., 1997) e redução da plastoquinona (Bergantino et al., 1995 e 1997), é um bom candidato para a função de sensor do estado reduzido no controle de genes nucleares (Danon e Mayfield, 1994; Escoubas et al., 1995; Levings e Siedow, 1995) e do cloroplasto (Allen, 1995).

4.4 - Conteúdo de Carboidratos e Metabólitos do Ciclo de Calvin-Benson

As Tabelas 10 e 11 apresentam os valores do conteúdo de metabólitos do Ciclo de Calvin-Benson, obtidos de folhas de plantas selvagens e transgênicas (TR1 e TR2), cultivadas em baixa e alta luminosidade, respectivamente. Os dados referem-se aos experimentos conduzidos em alta luminosidade ($1000-1200\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e alta concentração de CO_2 (800ppm) para minimizar os efeitos da fotorrespiração.

Pela Tabela 10, pode-se observar que quando as plantas são cultivadas em baixa luminosidade e, portanto, aclimatadas à essa condição e analisadas em alta luminosidade, os conteúdos de 3-PGA mostram-se maiores para as plantas transgênicas quando comparados com as plantas selvagens. A Tabela 10 mostra ainda que as plantas transgênicas apresentaram menor conteúdo de TP e maiores valores da relação 3-PGA/TP. Vários fatores são conhecidos por controlar as relações fonte-dreno devido aos seus efeitos sobre a fotossíntese, síntese de sacarose, transferência e utilização de assimilados (Mitra et al., 1993). A triose-fosfato (TP), um dos primeiros produtos da fixação de CO_2 pode ser exportada para o citosol para iniciar a síntese de sacarose ou pode permanecer no cloroplasto para a síntese de amido. A demanda de sacarose pelos

Cultivadas em Baixa Luminosidade						
GENÓTIPOS	3-PGA	TP	G6P	F6P	3-PGA/TP	G6P/F6P
WTSR1	137.20±12.3	70,09±15,89	185,82±36,31	113,17±8,90	1,96	1,64
TR1	235.52±21.00	39,41±7,62	145,97±13,23	75,88±0,93	5,98	1,92
TR2	320.76±17.07	48,86±4,33	135,7±11,20	90,15±19,36	6,56	1,50

Tabela 10: Valores de 3-PGA, G6P, F6P e TP em nmol/mg de clorofila e da relação 3-PGA/TP e G6P/F6P (mol/mol) para plantas transgênicas e selvagens cultivadas em baixa luminosidade e analisadas em alta luminosidade e alta concentração de CO_2 . Os dados são médias de 3 plantas $\pm$ o desvio padrão.

“drenos” controlam o efluxo de TP do cloroplasto via transportador de fosfato inorgânico (Stitt & Quick, 1989; Mitra et al., 1993). O conteúdo de P_i no estroma e no citosol é particularmente importante na coordenação da taxa de fotossíntese com as sínteses de amido e sacarose, uma vez que o cloroplasto é largamente dependente da síntese de sacarose pelo fornecimento de P_i requerido para a síntese de ATP, pela ATPase plastidial (Foyer, 1993). A reciclagem do fosfato inorgânico (P_i) pela síntese de carboidratos seria portanto, responsável pelo controle do metabolismo fotossintético via “feedback” (Stitt, 1986; Foyer, 1989, Foyer, 1993).

Segundo Dietz & Heber (1986), como a reação de redução de 3-PGA para TP é mantida no equilíbrio durante a fotossíntese, alterações na relação 3-PGA/TP indicariam mudanças na capacidade de transporte de elétrons e geração de ATP e ADP, onde o aumento da razão 3-PGA/TP sugere limitação na redução de 3-PGA para TP em função do fornecimento de NADPH e ATP. Dessa forma, nestas condições de análise e utilizando-se plantas cultivadas em baixa luminosidade, as plantas que superexpressam o gene *Lhcb1*2*, apresentaram certa dificuldade em lidar com o excesso de energia devido ao maior tamanho da antena do PSII. Contudo, apesar dos maiores conteúdos de 3-PGA e maior relação 3-PGA/TP apresentado pelas plantas transgênicas, os experimentos de assimilação de CO_2 (Tabela 4), discutidos anteriormente, mostram que as taxas fotossintéticas não diferiram entre as plantas selvagens e transgênicas.

Segundo Stitt (1986), quando uma planta está em baixa luminosidade ou baixa concentração de CO_2 , a taxa de fotossíntese pode ser elevada pelo aumento da intensidade luminosa ou pela concentração de CO_2 . Entretanto, há um ponto de saturação, onde nem o aumento da luz, nem o aumento da concentração de CO_2 levam a um aumento da fotossíntese. Neste ponto parece que pelo menos um dos componentes do aparato fotossintético não pode operar mais rápido, e isto pode ser devido à taxa de reciclagem dos centros fotoquímicos; à capacidade de transporte de elétrons; ou à taxa na qual o ATP e NADPH podem ser consumidos nas reações do metabolismo do carbono que convertem CO_2 e H_2O ao produto final. Então durante a fotossíntese, a maioria do carbono fixado é exportada para o citosol como triose-fosfato (TP) e convertida à sacarose, liberando fosfato inorgânico (P_i). Esse P_i retorna ao cloroplasto em uma troca por mais triose-fosfato que deve ser precisa. A taxa de síntese de sacarose

deve então estar ajustada de tal forma que quantidade suficiente de P_i seja liberada para manter sua concentração no estroma e permitir que as reações ocorram eficientemente no estroma e tilacóide (Stitt, 1987; Stitt et al., 1988).

A Figura 13 mostra o conteúdo de sacarose de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2), cultivadas em alta e baixa luminosidade e analisadas em condições de saturação de CO_2 para limitar a taxa fotorrespiratória. Os resultados da

Figura 13: Conteúdo de sacarose ($\mu\text{mol sacarose.mg}^{-1}$ clorofila) de plantas selvagens (WT) e transgênicas (TR1 e TR2). As plantas foram cultivadas em condições de baixa (BL) e alta (AL) luminosidade e as análises foram conduzidas em condições de saturação de CO_2 e com intensidade luminosa de $1000-1200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Os resultados representam a média de 4 plantas.

Figura 13 mostram que as plantas transgênicas (TR1 e TR2) cultivadas em baixa luminosidade apresentam menor conteúdo de sacarose que as selvagens. Desse modo, Mudanças na partição do carbono favorecendo a síntese de amido ou sacarose parecem ser cruciais para essas plantas, pelo fornecimento de P_i . Como a capacidade de reciclagem de P_i via síntese de amido é menor do que via síntese de sacarose, o fornecimento de P_i fica desfavorecido. Como as plantas transgênicas devem ter

demandas por P_i maiores devido ao possível aumento na antena do PSII, pela expressão do gene *Lhcb1*2*, esse fator parece ser bastante limitante nessas plantas.

Segundo Gerhardt et al. (1987) a relação G6P/F6P indica a compartimentalização das hexoses dentro da célula, onde valores entre 1 e 2 mostram uma compartimentalização no cloroplasto e a síntese predominante de amido, e valores entre 3 e 5 uma compartimentalização citoplasmática e síntese predominante de sacarose. Pela Tabela 10, observa-se ainda que o conteúdo de hexoses fosfato (G6P e F6P) foi maior nas plantas selvagens do que nas plantas transgênicas e para todos os genótipos o valor da relação G6P/F6P foi menor que 2, indicando um fracionamento favorecendo a síntese de amido. Como a capacidade de reciclagem de P_i via síntese de amido é menor do que via síntese de sacarose, o fornecimento de P_i fica desfavorecido. Como as plantas transgênicas devem ter demandas por P_i maiores devido ao aumento na antena do PSII, pela expressão do gene *Lhcb1*2*, observa-se o acúmulo de 3-PGA, que pode estar retroinibindo a fotossíntese nestas plantas. A Figura 14 mostra o conteúdo de amido de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2), cultivadas em alta e baixa luminosidade e analisadas em condições de saturação de CO_2 para limitar a taxa fotorrespiratória. Os resultados da Figura 14 confirmam que quando as plantas são cultivadas em baixa luminosidade e analisadas em alta luminosidade e alta concentração de CO_2 , as plantas transgênicas apresentaram maior conteúdo de amido quando comparado com o material selvagem.

Em corroboração com tal fato, a síntese de amido é regulada pela enzima ADPglucose pirofosforilase, que é fortemente ativada por 3-PGA e inibida por P_i , e a regulação baseia-se em mudanças na propriedade cinética e tem pouca influência da quantidade de enzima (Preiss & Levi, 1980; Stitt, 1986; Huber, 1989; Stitt & Quick, 1989; Huber & Huber, 1992). Estudos feitos em cloroplastos isolados mostraram que quando a fotossíntese é inibida por baixas concentrações de P_i do meio, ocorre uma diminuição da razão ATP/ADP, e a síntese de amido é estimulada pois o aumento de 3-PGA ativa a ADPglucose pirofosforilase (Heldt et al., 1977). Desse modo, os maiores conteúdos de 3-PGA das plantas transgênicas cultivadas em baixa luminosidade (Tabela 10) pode ainda estar ativando a ADPglucose pirofosforilase e garantindo maiores conteúdos de amido a essas plantas como pode ser visto na Figura 14.

Os resultados da Tabela 11, obtidos para plantas cultivadas em alta luminosidade e também analisadas nessa condição e em saturação de CO₂, mostram que as plantas selvagens apresentaram maiores conteúdos de 3-PGA, G6P e TP que as plantas transgênicas. Observa-se que, contrariamente aos dados obtidos na Tabela 10, as plantas transgênicas apresentaram conteúdos de 3-PGA menores que o das plantas selvagens. Verifica-se ainda que a relação 3-PGA/TP, aumentou em todos os genótipos, quando comparados com a Tabela 10, entretanto, devido aos valores extremamente baixos de TP para o material transgênico, estes mostraram valores da relação PGA/TP bastante altos. A fotossíntese pode também ser inibida se a TP for exportada muito rapidamente para o citosol, em níveis que levam a uma diminuição dos metabólitos do Ciclo de Calvin-Benson. Talvez isso explique a taxa de assimilação de CO₂ sem diferenças significativas entre os genótipos (Tabela 3) mesmo quando as plantas transgênicas mostraram tendências de valores de ϕ PSII maiores e menor $1-q_p$.

Figura 14: Conteúdo de amido ($\mu\text{mol amido.mg}^{-1}$ clorofila) de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2). As plantas foram cultivadas em condições de baixa (BL) e alta (AL) luminosidade e as análises foram conduzidas em condições de saturação de CO₂ e com intensidade luminosa de 1000-1200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Os resultados representam a média de 4 plantas.

A relação G6P/F6P que indica a compartimentalização das hexoses dentro da célula, mostrou alterações importantes dessa razão quando os mesmos genótipos são cultivados em alta luminosidade. Observa-se a compartimentalização no cloroplasto e síntese de amido (valores entre 1 e 2) nas plantas selvagens e TR2, confirmado pela Figura 14. Entretanto, nas plantas TR1, o valor 5,86 indica uma compartimentalização citoplasmática e um fracionamento favorecendo a síntese de sacarose, como uma maneira de compensar a demanda por P_i . Os menores valores de TP mostrado pelas plantas TR1 (Tabela 11), sugerem que esse metabólito deve estar sendo exportado para o citosol e convertido a sacarose. A Figura 13 mostra que quando as plantas são cultivadas em alta luminosidade, as plantas transgênicas TR1 apresentam conteúdo de sacarose maior que o das plantas selvagens e transgênica TR2.

Cultivadas em Alta Luminosidade						
GENÓTIPOS	3-PGA	TP	3-PGA/TP	G6P	F6P	G6P/F6P
WTSR1	211.72±16.44	33.92±6.5	6.24	62.13±9.39	105.31±5.78	0.59
TR1	247.03±7.74	34.40±6.67	7.18	38.16±3.83	64.15±6.17	0.59
TR2	142.20±18.45	33.49±2.84	4.25	53.67±7.36	65.15±10.30	0.82

Tabela 11: Valores de 3-PGA, TP, G6P e F6P em $\mu\text{mol/mg}$ de clorofila e da relação 3-PGA/TP e G6P/F6P (mol/mol) para plantas transgênicas (TR1 e TR2) e selvagens (WTSR1) cultivadas em alta luminosidade e analisadas em alta luminosidade e concentração atmosférica de CO_2 . Os dados são médias de 3 plantas $\pm$ o desvio padrão.

A Tabela 12 mostra os valores obtidos para o conteúdo de carboidratos totais (amido + sacarose) para plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2), cultivadas em alta e baixa luminosidade e analisadas em condições de saturação de CO_2 . Pela Tabela 12 observa-se que o conteúdo de carboidratos totais é maior para plantas transgênicas (TR1 e TR2). Fica claro que, nas análises em alta luminosidade, mesmo quando as plantas transgênicas são cultivadas em baixa luminosidade, a expressão constitutiva do gene *Lhcb1**2 que promove o aumento do sistema antena do fotossistema

II (LHCII), favorece o maior acúmulo de carboidratos nessas plantas como já verificado por Real (1997). Já quando as plantas são cultivadas em alta luminosidade o conteúdo de carboidratos totais é bastante semelhante entre os genótipos.

Convém reforçar que muitas interações ocorrem entre as reações de assimilação e os processos fotoquímicos. Ambos participam da reciclagem dos “pools” de ATP e NADPH. Além disso, as reações de luz alteram muito o ambiente estromal em termos de pH, estado iônico e potenciais de oxido-redução. Todos esses fatores exercem influência sobre as vias de redução do carbono, através da modulação de componentes enzimáticos. O principal objetivo da regulação metabólica dentro do cloroplasto é garantir o fornecimento de ATP e NADPH, numa correta estequiometria, para direcionar a assimilação do carbono. Por essa razão, a taxa de reciclagem de NADPH e ATP para a via de redução do CO₂, tem efeito retroinibitório no ΔpH e no estado de redução dos componentes do sistema de transporte de elétrons. Estes por sua vez, controlam a fotoquímica do PSII, a taxa de transferência de elétrons entre os fotossistemas e a atividade de enzimas associadas à membrana tais como a ATPase, Ferredoxina-NADP redutase e proteínas quinase do tilacóide (Foyer, 1993; Mitra et al., 1993). Assim, estudos de modulação da atividade de enzimas do ciclo de Calvin-Benson são ainda necessárias e importantes para confirmar esses resultados.

Conteúdo de Carboidratos Totais (μmol hexoses equivalentes.mg⁻¹ chl)		
GENÓTIPOS	Baixa Luminosidade e Alto CO₂	Alta luminosidade e Alto CO₂
WTSR1	16.00	17.30
TR1	19.10	16.88
TR2	18.00	15.91

Tabela 12: Conteúdo de carboidratos totais (amido e sacarose) em μmol hexoses equivalentes.mg⁻¹ clorofila de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2). Os valores representam a média de 4 plantas.

4.5 - Experimentos de Reiluminação

A regulação temporal de funções biológicas é de particular importância em plantas que têm que responder ao seu ambiente *in situ*. Assim, muitas funções de plantas exibem ritmos de atividade em resposta à mudanças diárias no seu ambiente. Funções celulares e fisiológicas que continuam a oscilar ritmicamente sob condições ambientais constantes, em um período de aproximadamente 24 horas, são chamadas de ritmos circadianos e estão sob o controle de um relógio circadiano endógeno (Anderson e Kay, 1997). A regulação através do relógio circadiano serve para sincronizar e otimizar processos celulares e fisiológicos em antecipação às mudanças periódicas no ambiente da planta.

Os genes *Lhc* também exibem um ritmo circadiano, ou seja, sofrem alterações independente da indução do ambiente em um período de 24 horas que é manifestado na transcrição e pós-transcrição (Piechulla, 1993). Assim, quando as plantas são expostas a regimes alternados de luz/escuro, o padrão de expressão dos genes *Lhc* oscila até a adaptação ao novo ambiente. Como nas plantas transgênicas, a expressão do gene *Lhcb1*2* é constitutiva, ou seja, constante e portanto, não está sob o controle circadiano, os experimentos de reiluminação tiveram por objetivos: *) conhecer os mecanismos de ajuste rápido e a longo prazo do metabolismo dessas plantas, no intervalo de 24 horas de reiluminação. **) verificar como a expressão constitutiva do gene *Lhcb1*2* afeta o fenótipo da planta, após 21 dias na ausência de luz. Partindo-se da premissa de que a expressão dos genes *Lhc* e a síntese de clorofila é regulada pela luz e que na ausência desta as plantas passam a apresentar folhas amareladas, como estaria o fenótipo das plantas transgênicas no final do período de escuro. Os dados foram coletados ao final dos 21 dias de escuro (T0), após 6h (T1), 12h (T2) e 24h (T3) de reiluminação.

A Tabela 13 mostra os valores da relação F_v/F_m de plantas selvagens e transgênicas de tabaco, mantidas no escuro por 21 dias e então iluminadas. Como já comentado, o valor de F_v/F_m é uma medida da máxima eficiência das reações fotoquímicas do PSII e representa a eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação do PSII em folhas adaptadas no escuro. Na Tabela 13 observa-se que os valores da relação F_v/F_m foram sempre maiores para as plantas transgênicas (TR1 e

TR2), tanto no escuro (T_0) quanto durante as 24 horas de reiluminação. O valor da relação F_v/F_m de 0,46, determinado no escuro (T_0) para as plantas selvagens (WTSR1), indica que estas plantas estavam bastantes estressadas, enquanto os valores dessa relação, na mesma fase foram de 0,6 e 0,63 para as plantas transgênicas TR1 e TR2, respectivamente, indicando que as plantas não estavam sofrendo tanto, quando comparado com as plantas selvagens. É como se após um longo período de escuro, as plantas transgênicas mesmo tendo maior expressão da proteína da antena coletora de luz do PSII, conseguissem lidar melhor com o início do fornecimento de energia luminosa, que é evidenciado pelos valores da relação F_v/F_m maiores para as plantas transgênicas nas primeiras 24 horas de reiluminação.

Experimentos de Reiluminação				
Relação F_v/F_m				
GENÓTIPOS	T_0 (0h)	T_1 (6h)	T_2 (12h)	T_3 (24h)
WTSR1	0.46 ± 0.05 (4)	0.51 ± 0.04 (4)	0.54 ± 0.06 (3)	0.71 ± 0.03 (3)
TR1	0.60 ± 0.02 (4)	0.60 ± 0.02 (3)	0.61 ± 0.04 (3)	0.70 ± 0.02 (3)
TR2	0.63 ± 0.01 (4)	0.56 ± 0.03 (4)	0.65 ± 0.02 (3)	0.70 ± 0.03 (3)

Tabela 13: Valores da relação F_v/F_m de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2) $\pm$ o desvio padrão, de experimentos de reiluminação. Os valores foram determinados ao final dos 21 dias de escuro (T_0), e às 6h (T_1), 12h (T_2) e 24h (T_3) após a reiluminação. Os valores entre parênteses referem-se ao número de plantas analisadas para cada genótipo.

Um outro aspecto refere-se à coloração das folhas ao final dos 21 dias de escuro. Enquanto as folhas de tabaco selvagem se apresentaram muito amareladas, as folhas de tabaco transgênico (TR1 e TR2) ainda mantinham uma coloração esverdeada (Figura 15). Esses resultados demonstram a expressão constitutiva do gene *Lhcb1*2*. Pode-se inferir ainda que a expressão constante desse gene talvez funcione como um sinal para induzir respostas de luz, ou seja, possam mimetizar o efeito da luz e/ou sinalizar para a maquinaria de síntese, que a planta está sob luz e, dessa forma induzir a síntese de

clorofilas, necessárias para a estabilização das proteínas LHC, garantindo então a coloração verde às plantas transgênicas (TR1 e TR2) durante o período de escuro.

Os experimentos de reiluminação forneceram ainda informações importantes sobre o metabolismo das plantas transgênicas, que serão agora abordados. Apesar da verificação de: *) um maior valor da relação F_v/F_m para as plantas transgênicas, que aumentou, em todos os genótipos, no decorrer das 24 horas de reiluminação, até que não mais se observassem diferenças, nesses valores, entre as plantas transgênicas e selvagens e, **) das diferenças na coloração das folhas no final do período de escuro, pergunta-se: Será que estas plantas ainda estariam fisiologicamente funcionais ao final dos 21 dias de escuro, de forma que não houvesse dúvidas quanto a validade dos resultados obtidos? Essas plantas poderiam se recuperar? Que mudanças no metabolismo dessas plantas conduziram a uma recuperação, após o estresse de 21 dias sem luz?

Figura 15: Folhas mantidas no escuro por 21 dias. WTSR1 ao centro, TR2 à esquerda e TR1 à direita.

A Figura 16, mostra os valores do conteúdo de clorofilas totais ($a+b$), para todos os genótipos, coletados ao final dos 21 dias de escuro (T0), após 6h (T1), 12h (T2) e 24h (T3) de reiluminação. Nesta, observa-se que no T0 (final dos 21 dias de escuro), realmente, as plantas transgênicas apresentavam um maior conteúdo de clorofila que as plantas selvagens o que, justificaria, as diferenças encontradas na coloração das folhas entre os genótipos. Pôde-se observar ainda que o conteúdo de clorofila total, das plantas selvagens (WTSR1), se elevou no decorrer das 24 horas do período de reiluminação, confirmando que estas plantas, apesar do estresse de 21 dias de escuro, ainda se encontravam fisiologicamente ativas e, portanto, mostrando uma recuperação, evidenciada pelo aumento crescente no conteúdo de clorofilas, validando e corroborando com os valores de F_v/F_m citados. As plantas TR1 mostraram, um decréscimo no conteúdo de clorofilas totais no decorrer do experimento enquanto, as plantas TR2 registraram valores praticamente constantes.

Cabe aqui comentar mais um pouco sobre o ritmo circadiano e síntese de clorofilas. Apesar do ritmo circadiano estar bem estabelecido para muitas espécies da divisão Angiosperma, esta oscilação não está presente para as Gimnospermas subdivisão Coniferofitina onde, a maquinaria para a expressão circadiana parece ter sido perdida durante a evolução. Ao contrário de Angiospermas, as Coniferofitinas são capazes de sintetizar clorofila independentemente da luz e, estas são fundamentais para a organização do complexo LHC, a expressão dos genes *Lhc*, regulada pelo ritmo circadiano poderia ser excessiva. O mesmo argumento é usado para espécies de Briófitas que também sintetizam clorofila no escuro e não apresentam ritmo circadiano para o gene *Lhc*. A partir desses resultados, Oberschmidt et al. (1995), propuseram que em espécies de plantas que possuem a síntese de clorofila dependente da luz, é necessário o controle circadiano dos genes *Lhc* para otimizar a formação do complexo LHC, e plantas capazes de sintetizar clorofila no escuro, não precisam de controle circadiano para a expressão dos genes *Lhc*. Os valores de clorofila apresentados no T0 pelas plantas transgênicas (Figura 16), mostram que elas conseguem sintetizar clorofila mesmo no escuro, ou pelo menos degradam menos intensamente o seu conteúdo pré-existente.

Figura 16: Conteúdo de clorofila total (mg de clorofila/m²) de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas TR1 (CAB1) e TR2 (CAB2), de experimentos de reiluminação. Os dados foram coletados ao final dos 21 dias de escuro (T0), às 6 horas (T1), às 12 horas (T2) e às 24 horas (T3) após a reiluminação e representam a média de 3 plantas.

A Figura 17 registra que foram detectados mRNAs específicos do gene *Lhcb1*2* de ervilha, em folhas de tabaco transgênico TR1 e TR2. A detecção dos mRNAs do gene já no T0 para os exemplares transgênicos, e sua ausência no genótipo selvagem, suportam a idéia da perda do controle circadiano para a expressão desse gene e confirmam a superexpressão do gene *Lhcb1*2* de ervilha, uma vez que esse gene é que

foi usado como sonda (Figura 8) para a detecção dos mRNAs. A intensidade de detecção dos mRNAs é crescente para os transgênicos durante o período de reiluminação e comparável com o efeito de dosagem gênica, discutido anteriormente. Assim, as plantas TR1 que apresentam apenas uma cópia do transgene evidenciam bandas menos intensas que as plantas TR2, com quatro cópias do transgene. A crescente intensidade de detecção da expressão gênica, durante o aumento do período de reiluminação também mostram que as plantas continuam a responder a esse estímulo.

Deve-se salientar que além da regulação pela luz da transcrição e pós-transcrição dos genes *Lhc*, as proteínas LHC também sofrem regulação na pós-tradução. Os principais passos de pós-tradução na biossíntese destas proteínas são: importação pelo cloroplasto, processamento após a importação, inserção na membrana do tilacóide, formação de complexos com os pigmentos, processamento proteolítico e montagem correta no fotossistema. Vários destes passos são regulados direta ou indiretamente pela luz, através dos fitocromos, dos protoclorofilídeos e dos fotorreceptores azul/UV-A.

Figura 17: Análise de Northern Blot de plantas de experimentos de reiluminação. A análise foi realizada ao final dos 21 dias de escuro e, 24 horas após a reiluminação. Em cada tempo as canaletas obedecem sempre a seguinte ordem: TR1, WTSR1 e TR2.

A inserção dos polipeptídeos LHC nos tilacóides também é acompanhada pela ligação com pigmentos, cuja síntese e acúmulo são regulados pela luz (Klein et al., 1988; Mullet et al., 1990). A clorofila não só é importante para a estabilidade,

organização correta e integração das proteínas LHC no fotossistema, como também para o acúmulo de outras proteínas envolvidas na estrutura do fotossistema II como a CP47 e a D1 (Klein et al., 1988; Mullet et al., 1990). Assim, os cofatores necessários para a organização do LHCII são clorofilas a e b e, também, xantofilas, neoxantinas, violaxantinas e luteínas, onde o acúmulo de clorofila b , que é fortemente dependente da luz, tem um papel fundamental para determinar qual polipeptídeo LHC será acumulado e qual será degradado.

A Figura 18 mostra o conteúdo de carotenóides (luteína, neoxantina, violaxantina e β -caroteno) pelo total de clorofila ($a+b$), a relação do total de carotenóides pelo total de clorofilas ($a+b$) e a relação clorofila a/b de tilacóides provenientes de experimentos de reiluminação. Pela Figura 18 visualiza-se que, em baixa luminosidade (no início do experimento de reiluminação) os conteúdos de neoxantina, luteína, violaxantina e β -caroteno, bem como o total de carotenóides e a relação clorofila a/b não diferem entre os genótipos transgênicos e selvagens. Com o decorrer do período de escuro, observa-se para todos os genótipos um aumento no conteúdo de luteína e β -caroteno e no total de carotenóides, que são mais acentuados no material selvagem. É como se os exemplares transgênicos (TR1 e TR2) não “sentissem” tanto o período de escuro. Possivelmente a expressão do gene *Lhcb1**2 sinalizasse para a planta que ela está sob luz, como discutido anteriormente.

Um papel estrutural é sugerido às moléculas de luteína, por observações de que a montagem de complexos coletores de luz *in vitro*, a partir de componentes separados é absolutamente dependente da presença de conteúdos estequiométricos de luteína (Plumley & Schmidt, 1995; Paulsen, 1997). Kuhlbrandt et al. (1994), a partir de dados da estrutura atômica de complexos Lhcb1,2, afirmaram que dois carotenóides próximos ao centro do complexo são responsáveis pela estabilidade entre as α -hélices das extremidades N e C-proximas. Os autores acreditam que esses dois carotenóides sejam luteínas por estes estarem presentes na maioria de todas as estequiometrias de complexos clorofila a/b . Desse modo, as mudanças nos conteúdos de luteína mostrados na Figura 18 são consistentes com mudanças na estrutura dos complexos ao final dos 21 dias de escuro, mostrando-se mais dramático para os exemplares selvagens.

Figura 18: Conteúdo de carotenóides do Ciclo das Xantofilas de plantas transgênicas TR1 ($\square$), TR2 (Δ) e selvagens WTSR1 ($\circ$) de experimentos de reiluminação.

Observe que com o decorrer do período luminoso os conteúdos de carotenóides totais, luteína e β -caroteno tendem a diminuir retornando próximos aos níveis iniciais que os genótipos apresentavam, no início do experimento, em baixa luminosidade. Demmig et al. (1987) e Sharma e Hall (1993), sugerem que β -caroteno possa ser convertido à zeaxantina em condições de alta luminosidade ou, em anteraxantina em condições de escuro. O aumento no conteúdo de β -caroteno mostrados na Tabela 7, pode funcionar como um “estoque regulador”, devido à sua conversibilidade, em antecipação a uma condição de luminosidade e também devido ao fato do β -caroteno *per se* atuar como um acceptor de energia de excitação.

Ao final dos 21 dias de escuro, os genótipos praticamente apresentam o mesmo valor da relação clorofila *a/b* que, com o início do período luminoso aumentou muito para os selvagens enquanto para os exemplares transgênicos tendem a retornar a valores próximos aos observados no início do período de escuro, ou seja, a sua condição inicial.

Os conteúdos de violaxantina para todos os genótipos (Figura 18) mostram-se constantes durante todo o experimento aumentando levemente no transgênico TR2 no decorrer do período luminoso. Pela Figura 18 observa-se ainda que os conteúdos de anteraxantina caem para os exemplares selvagens e o contrário é observado para as plantas transgênicas no final do período de escuro. Com o início do período luminoso estes conteúdos tendem a retornar aos valores iniciais para os exemplares transgênicos (TR1 e TR2) enquanto para o selvagem aumenta drasticamente.

Todos esses resultados mostram que as plantas selvagens sofrem mais, observado pelos comportamentos mais acentuados de alterações no conteúdo de carotenóides do ciclo das Xantofilas.

É conveniente aqui uma discussão sobre a associação entre a estrutura do PSII, conteúdo de pigmentos e dissipação do excesso de luz. A fotossíntese nas plantas superiores é direcionada por moléculas de clorofila e carotenóides. Todas as clorofilas e presumivelmente todos os carotenóides que são ativamente envolvidos na fotossíntese estão ligados às proteínas da membrana do tilacóide. As proteínas do aparato fotossintético podem ser classificadas naquelas do "core-complex", que são codificadas no plastoma e se ligam a carotenóides e clorofila α , e aquelas da antena periférica que

são codificadas pelo núcleo e pós-traducionalmente transportadas para o plastídio onde se associam a clorofila *a*, clorofila *b* e carotenóides (Paulsen, 1997). Em todos esses complexos, os pigmentos são não-covalentemente associados às proteínas. Apesar de ligações não-covalentes estarem envolvidas, a associação dos pigmentos à essas proteínas é altamente específica. A interação física entre os pigmentos requer um preciso posicionamento desses pigmentos em relação aos outros. Essa bem definida interação entre pigmentos é um pré-requisito para um processo fotossintético altamente eficiente. Possivelmente a estrutura dos transgenes (TR1 e TR2), com mudanças mais equilibradas no conteúdo de carotenóides, que favorece a fotossíntese em condições de cultivo em baixa luminosidade, como observado por Real (1997), também consegue em alta luminosidade promover mudanças de forma que a fotossíntese se mantenha com valores muito próximos aos das plantas selvagens, indicando uma aclimação do aparato fotossintético à essas condições.

Essas afirmações evidenciam que informações estruturais de complexos pigmento-proteína do aparato fotossintético são importantes para o estabelecimento de correlações entre a estrutura e função desses complexos (Paulsen, 1997, Kühlbrandt et al., 1994; Nicholson et al., 1996, Koepke et al., 1996) e porque através delas pode-se saber mais sobre os mecanismos de ajuste e aclimação das plantas às mudanças ambientais. Podemos inferir que a expressão do gene *Lhcb1*2*, pode ter modificado algum item nessa bem definida interação, que alterou todo o metabolismo fotossintético das plantas transgênicas. Os perfis obtidos de géis desnaturantes de proteínas do tilacóide que serão discutidos mais adiante e as fotos de análises de microscopia de luz, discutidas anteriormente, suportam a idéia de alterações estruturais induzidas pela expressão do gene *Lhcb1*2*, em alta luminosidade.

4.6 - Sistemas de Transferência Baixa Luz-Alta Luz (BL→AL)

A luz é a fonte de energia para o crescimento das plantas. Para enfrentar as flutuações na intensidade luminosa é essencial que o organismo tenha encontrado meios para se ajustar e se adaptar à quantidade e qualidade de luz disponível. A transferência

de plantas adaptadas a baixa luminosidade, para condições de alta intensidade de luz, promove uma série de alterações a curto e a longo prazo (Kloppstech, 1997). Entre as alterações que ocorrem a curto prazo podemos citar, alterações no fluxo de metabólitos, aumento no estado de redução dos componentes do transporte de elétrons nos tilacóides, aumento da dissipação do excesso de energia pela fluorescência da clorofila a e mecanismos não-fotoquímicos e, a longo prazo os que implicam em alteração da expressão de genes do aparato fotossintético.

As Figuras 19 e 20 mostram os valores do conteúdo de clorofila total e os valores da relação clorofila a/b , respectivamente, de plantas transgênicas (TR1 e TR2) e selvagens (WTSR1) de experimentos de transferência de plantas cultivadas em baixa luminosidade para condições de alta luminosidade (BL→AL).

Em sistemas de transferência BL→AL, duas estratégias estão envolvidas: 1) Os conteúdos de LHCII e LHCI suprimindo cada centro de reação decresce com o aumento da irradiação e 2) O conteúdo de centros de reação do PSII em relação ao PSI, isto é, a estequiometria dos fotossistemas, é alterada devido às variações na quantidade e qualidade de luz. Plantas de sombra ou de baixa luz (BL) têm menor relação PSII/PSI, de 1,0-1,3, devido a um menor número de unidades de PSII com antena coletora de luz maior, enquanto as plantas de alta luz (AL), com valores de relação PSII/PSI de 1,8-2,4, tem mais unidades de PSII com menor antena coletora de luz em relação ao PSI (Andersson et al., 1988). Este ajuste na estequiometria dos fotossistemas serve para regular a distribuição da energia de excitação entre os fotossistemas e corrigir desbalanços (Andersson et al., 1995).

A Figura 19 mostra uma diminuição no conteúdo de clorofila total um pouco mais acentuada para o material transgênico (TR1 e TR2) em condições de alta luminosidade. Este menor conteúdo de clorofila pode ser justificado pelas alterações na morfologia e estrutura da folha, mostradas pelo material transgênico em alta luminosidade onde, possivelmente deve ocorrer um mecanismo de compensação, ou seja, apesar do maior número de cloroplastos/célula do parênquima paliádico (Tabela 1), como as células são maiores observa-se uma diminuição no número de cloroplastos/área foliar e conseqüentemente uma diminuição no conteúdo de clorofila. A Figura 20 mostra um aumento da relação clorofila a/b para as plantas TR1 e diminuição dessa relação para as

plantas selvagens e TR2, após a transferência para alta luminosidade. Alterações na relação clorofila a/b são esperadas acontecer pois plantas adaptadas a baixa luz têm maiores conteúdos de clorofila b , assim, condições de alta luminosidade aumentam a relação clorofila a/b . O comportamento do material transgênico TR1 (Figura 20), evidencia bem esse mecanismo de ajuste, ou seja, à medida que diminui o conteúdo de clorofila b em alta luminosidade, a relação clorofila a/b aumenta. O transgênico TR2 mantém essa relação praticamente constante. As plantas selvagens (WTSR1), contrariamente, mostram uma redução nos valores da relação clorofila a/b , possivelmente devido a um aumento da degradação de clorofilas na luz.

Figura 19: Conteúdo de clorofila total (μg de clorofila/ml amostra) de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas TR1 (CAB1) e TR2 (CAB2), de experimentos de transferência de baixa luminosidade para alta luminosidade (BL $\rightarrow$ AL). Os valores foram coletados do 0º (BL) ao 12º dia em alta luminosidade (AL) e representam a média de 3 plantas.

Segundo Andersson et al. (1995), modulações na composição, organização e funcionalidade do aparato fotossintético são tão bem reguladas que os valores da relação clorofila a/b de folhas são um índice simples para intensidade de aclimação na luz. Os

valores da relação clorofila *a/b* são linearmente relacionados com o conteúdo de citocromo *b_{6/f}*, ATP sintase e Rubisco e inversamente correlacionadas com os conteúdos de LHCII e LHCI (Andersson et al., 1988) e membranas empilhadas (Andersson e Aro, 1994).

Segundo Lindahl et al. (1997), a exposição de plantas de espinafre, cultivadas em baixa luminosidade, a elevadas intensidades luminosas levam a uma redução da antena do PSII para evitar ou minimizar os efeitos do estresse de luz. Essas mudanças envolvem reduções no conteúdo relativo de proteínas associadas às clorofilas devido à digestão proteolítica de proteínas LHC. Cerca de 50% das subunidades de 25kDa e 25% das subunidades de 27kDa podem ser degradadas durante esse processo (Lindahl et al., 1995).

No que se refere às alterações a longo prazo, a regulação na luz deve envolver ainda a síntese de proteínas ELIPs (“Early Light Induced Proteins”) bem como enzimas que catalisam passos da biossíntese de carotenóides em alta luminosidade. Um enfoque sobre a função dos carotenóides tem sido recentemente discutido; segundo Havaux (1998) em plantas adaptadas à alta luminosidade, alguns carotenóides perderiam permanentemente sua função usual de pigmentos acessórios que se refletiria numa nova organização espacial de pigmentos da antena em alta intensidade de luz e temperatura. A longo prazo, os pigmentos da antena seriam rearranjados com proteínas ELIPs, que teriam seu acúmulo induzido pela luz. As ELIPs, por terem homologia com polipeptídeos do LHC (Green e Kühlbrandt, 1995), funcionariam como substitutos dessas proteínas, quando as plantas estivessem crescendo sob condições de luz potencialmente danosas (Adamska e Kloppstech, 1994). Novamente, o estabelecimento de correlações sobre a estrutura e função de complexos pigmento-proteína dos fotossistemas nas plantas transgênicas, são ferramentas valiosas na compreensão dos mecanismos de aclimação às condições de alta luminosidade.

A mesma situação de estresse de luz ou pressão de excitação que induz ELIPs pode levar à expressão de um grupo inteiro de genes. Estes genes incluem enzimas e proteínas estruturais que são creditadas conferir proteção contra dano de estresse de luz, por exemplo, catalases, peroxidases e enzimas da rota fotorrespiratória. Como resultado

Figura 20: Valores da relação clorofila *a/b* de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas TR1 (CAB1) e TR2 (CAB2), de experimentos de transferência de baixa luminosidade para alta luminosidade (BL→AL). Os valores foram coletados do 0º (BL) ao 12º dia em alta luminosidade (AL) e representam a média de 3 plantas.

as plantas alteram suas características morfológicas, cujo resultado são “fenótipos estresse-adaptado”, com baixos níveis de clorofila, grana reduzido, acentuados conteúdos de carotenóides e dependendo da temperatura de crescimento também antocianinas (Kloppstech, 1997). Essa observação de “fenótipos estresses-adaptados” em termos de folha e de planta, são bastante importantes para o estabelecimento de diferenças entre as plantas selvagens e transgênicas quando transferidas de condições de baixa luminosidade para alta luminosidade (BL→AL). As análises de microscopia de luz, discutidas anteriormente dão suporte a essas sugestões e mostram que as plantas transgênicas adaptadas a alta luminosidade apresentam características morfológicas bastantes diferentes das plantas selvagens, porém típicas de plantas aclimatadas a altas intensidades luminosas (Figura 12).

4.7 - Determinação da Composição e Conteúdo das Proteínas das Membranas dos Tilacóides em Gel de Poliacrilamida (PAGE)

Os resultados das análises dos perfis eletroforéticos, em géis PAGE, de proteínas dos tilacóides de cloroplastos de plantas selvagens e transgênicas mostram diferenças entre os genótipos em diferentes condições de análise.

A Figura 21 apresenta o perfil eletroforético dessas proteínas em gel High Tris (Fleng et al., 1986), em gradiente de 12-18% (p/v) de poliacrilamida, coradas com solução de Coomassie Brilliant Blue (CBB) 0,4%. Estas amostras foram obtidas de experimentos de transferência BL→AL. Após a primeira canaleta com o marcador de peso molecular (M), a 5°, 6° e 7° canaletas subsequentes são de plantas TR1, selvagem e TR2, respectivamente, no quinto dia após a transferência para alta luminosidade (5d). Nestas observa-se o aparecimento de uma banda de peso molecular entre 55kDa e 42,7kDa, bastante intensa nas plantas selvagens além de “rastros” na canaleta que possivelmente representam o produto de degradação de alguma(s) proteína(s) do tilacóide em alta luminosidade. A Figura 21 mostra ainda que, apesar de se observar o aparecimento dessa mesma banda entre 55-42,7 kDa nas plantas transgênicas, ela é mais tardia e sempre menos intensa que para o genótipo selvagem. Outro aspecto interessante se refere aos “rastros” de produtos de degradação que são sempre menores para as plantas transgênicas (TR1 e TR2). As três primeiras canaletas, após o marcador, são de plantas TR1, WTSR1 e TR2, respectivamente, cultivadas em alta luminosidade. Pode-se visualizar que nessa condição a banda entre 55-42,7 kDa é mais intensa no genótipo selvagem e que, entre os transgênicos é menos intensa nas plantas TR2. No material transgênico a referida banda atinge uma intensidade máxima no 7° dia após a transferência para alta luminosidade. Através da Figura 21 pode-se ver ainda que em condições de alta luminosidade, as plantas selvagens apresentam uma banda de valor próximo a 14,4 kDa. Essa banda se mostra ausente nos exemplares transgênicos, nas mesmas condições e são visualizados nesses genótipos apenas no 7° dia após a transferência para alta luminosidade.

Figura 21: Perfil eletroforético de proteínas da membrana do tilacóide de plantas selvagens (WT), TR1 (T1) e TR2 (T2) de experimentos de transferência de plantas cultivadas em baixa luminosidade para alta luminosidade (BL→AL), corados com Coomassie Brilliant Blue 0,4%. O gel mostra o perfil dos genótipos em alta luminosidade (AL), aos cinco (5d), aos sete (7d) e aos 9 dias (9d) após a transferência para alta luminosidade. A 1ª canaleta corresponde ao marcador de peso molecular (M).

A Figura 22 mostra o perfil eletroforético de proteínas do tilacóide de plantas selvagens e transgênicas submetidas à estresse de frio. O gel descrito é do tipo High Tris (Fleng et al., 1986). As três primeiras canaletas, após a canaleta com o marcador de peso molecular (M), são de plantas cultivadas em baixa luminosidade e submetidas à estresse de frio (E-BL) e as três subsequentes (canaletas 4, 5 e 6) são de plantas cultivadas em baixa luminosidade (BL). Observa-se a mesma banda de peso entre 55 kDa e 42,7 kDa descrita acima, presente no genótipo selvagem submetido ao estresse de frio. As canaletas 7, 8 e 9, da Figura 22, sempre após o marcador, são de plantas TR1 selvagens e TR2, respectivamente, cultivadas em alta luminosidade e submetidas à estresse de frio (E-AL). Elas mostram que a referida banda é evidente apenas no genótipo transgênico

TR1. Em alta luminosidade (AL) a banda é menos evidente no genótipo TR2 (canaleta 12) e bem evidente nos demais genótipos (canaletas 10 e 11).

Figura 22: Perfil eletroforético de proteínas da membrana do tilacóide de plantas selvagens (WT), TR1 (T1) e TR2 (T2) de experimentos de estresse de frio, corados com Coomassie Brilliant Blue 0,4%. O gel mostra o perfil dos genótipos em baixa luminosidade e submetidos ao estresse de frio (canaletas 1-3), em baixa luminosidade (canaletas 4-6), em alta luminosidade e submetidos ao estresse de frio (canaletas 7-9) e em alta luminosidade (canaletas 10-12). A 1ª canaleta corresponde ao marcador de peso molecular (M).

A Figura 23 mostra o perfil eletroforético de proteínas do tilacóide de plantas selvagens e transgênicas de experimentos de reiluminação. O gel descrito também é do tipo High Tris (Fleng et al., 1986). As canaletas seguem sempre a mesma ordem de disposição dos genótipos na seguinte sequência: TR1, WTSR1 e TR2. As três primeiras canaletas, após o marcador de peso molecular, são de plantas aos 21 dias de escuro (T0), as três seguintes (4º, 5º e 6º canaleta) são de plantas após 6 horas de reiluminação (T1), a 7º, 8º e 9º canaletas foram obtidas de plantas após 12 horas de reiluminação (T2), e as

três últimas canaletas (10°, 11° e 12°) são de plantas após 24 horas de reiluminação (T3). Em todos os tempos de coleta de amostras (T0, T1, T2 e T3) observa-se que o genótipo selvagem (canaletas 2, 5, 8 e 11), apresenta a referida banda de peso entre 55-42,7 kDa, já mencionada nos outros géis, que está ausente no T0 para as plantas TR1 e TR2 e quase ausente para esses mesmos genótipos nos demais tempos após a reiluminação (T1, T2 e T3). O parental selvagem (WTSR1) apresenta ainda em todos os tempos do experimento de reiluminação (T0, T1, T2 e T3) a banda de 14,4 kDa e uma maior intensidade de “rastros”, possivelmente resultantes da degradação de proteínas.

Em cloroplastos isolados de cevada, as condições fotooxidativas geradas por variações na intensidade luminosa e concentração de CO₂ levam a aumentos na taxa de degradação de várias proteínas não identificadas do cloroplasto (Casano et al., 1990 e

Figura 23: Perfil eletroforético de proteínas da membrana do tilacóide de plantas selvagens (WT), TR1 (T1) e TR2 (T2) de experimentos de reiluminação, corados com Coomassie Brilliant Blue 0,4%. O gel mostra o perfil dos genótipos onde, T0 se refere ao final dos 21 dias de escuro e, T1, T2 e T3 se referem às 6, 12 e 24 horas após a reiluminação. A 1ª canaleta corresponde ao marcador de peso molecular (M).

1994) bem como à degradação parcial da subunidade maior (LSU) da Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) (Desimone et al., 1996). O aparecimento das bandas entre 55-42,7 kDa e 14,4 kDa, pode ser devido à degradação de alguma proteína do tilacóide em alta luminosidade, que é mais precoce nas plantas selvagens ou mesmo a síntese de produtos gênicos com função fotoprotetora como ELIPs, peroxidases, catalases, entre outros. Como ELIPs são proteínas de estresse, cuja expressão é acentuada sob condições de alta luminosidade visando a proteção do PSII, o aumento de sua expressão nessas condições é bastante plausível. A síntese de proteína D1 é elevada em condições de alta luminosidade e em combinação com sua intensa degradação nessas condições, pode ocorrer um aumento no "turnover" dessa proteína (Prasil, et al., 1992), implicando em um custo metabólico bastante grande para as plantas. Obviamente, proteólises nos cloroplastos tem um papel central em funções "housekeeping" por remoção de proteínas supérfluas ou não funcionais, proteínas danificadas ou subunidades estequiometricamente desbalanceadas.

Esses referidos géis foram ainda submetidos às análises de densitometria por meio do programa ImageMaster[®] 1D-PRIME (Pharmacia Biotech). Os resultados que serão mencionados abaixo são provenientes dessas análises e mostram as relações da banda referente ao LHCII, com as bandas da CP29 (28kDa), do Complexo de Evolução de O₂-OEE (33kDa) e da subunidade α da ATPase cloroplastidial-CF1 α (55kDa).

As Figuras 24, 25 e 26 mostram os valores da relações LHCII/CP29, LHCII/OEE e LHCII/CF1 α para plantas transgênicas e selvagens de experimentos de transferência BL→AL, de experimentos de estresse de frio e de experimentos de reiluminação, respectivamente.

Para os valores da relação LHCII/CP29, a Figura 24, observa-se uma tendência de queda nessas relações para todos os genótipos até o décimo primeiro dia (11d) em alta luminosidade, entretanto no experimento de estresse de frio (Figura 25), nota-se que as plantas selvagens mantêm valores constantes para essa relação tanto quando as plantas são cultivadas em alta luminosidade quanto em baixa luminosidade e submetidas ao estresse de frio. Entretanto, o transgene TR2 mostra aumento nessa relação quando submetidos ao estresse de frio, tanto para plantas cultivadas em baixa quanto em alta

Figura 24: Valores das relações LHCII/CP29, LHCII/OEE e LHCII/CF1 α , para plantas transgênicas e selvagens de experimentos de transferência BL→AL.

luminosidade. O exemplar TR1 apresenta o mesmo comportamento quando cultivado em baixa luminosidade e submetido ao estresse. Fosforilações da CP29 têm sido relatadas com o aumento de resistência à fotoinibição induzida pelo estresse de frio. Isto se deve às observações de que genótipos com altas taxas de fosforilação da CP29

mostraram um pequeno decréscimo na taxa F_v/F_M sob frio, na luz (Bergantino et al., 1995) e aumento nas de reações não-fotoquímicas (Mauro et al., 1997), possivelmente devido à mudanças conformacionais que levam a uma modificação das propriedades espectrais da proteína purificada (Croce et al., 1996) e a qual pode ser reversível por tratamento com fosfatase alcalina (Bassi et al., 1997). Esses resultados sugerem que CP29 pode ser o sítio para um mecanismo de dissipação de energia diferente da dissipação dependente de zeaxantina o qual contribui para a proteção da fotoinibição do PSII (Bassi et al., 1997).

Figura 25: Valores das relações LHCII/CP29, LHCII/OEE e LHCII/CF1 α , para plantas transgênicas e selvagens de experimentos de estresse de frio.

Já para experimentos de reiluminação (Figura 26), os valores da relação LHCII/CP29, são maiores para as plantas selvagens no tempo T1 (6h de reiluminação) e, depois caem acentuadamente, permanecendo constantes até o final do experimento. As plantas TR2 apresentam valores praticamente constantes dessa relação em todos os tempos (T0, T1, T2 e T3), bem como o exemplar TR1.

Figura 26: Valores das relações LHCII/CP29, LHCII/OEE e LHCII/CF1 α , para plantas transgênicas e selvagens de experimentos de reiluminação.

Para os valores da relação LHCII/OEE, os experimentos de transferência BL→AL (Figura 24) e de reiluminação (Figura 26), mostram uma tendência de queda para todos os genótipos e as plantas selvagens de experimentos de reiluminação (Figura 26) apresentam os menores valores dessa relação.

Os experimentos de estresse de frio (Figura 25), tanto para as plantas cultivadas em alta quanto em baixa luminosidade, mostram que os valores da relação LHCII/OEE se elevam, para todos os genótipos, quando estes são submetidos ao estresse de frio. O mesmo comportamento, é observado para todos os genótipos, submetidos ao estresse de frio, quando cultivados tanto em baixa quanto em alta luminosidade, para os valores da relação LHCII/CF1 α (Figura 25).

Os valores da relação LHCII/CF1 α são menores e constantes para as plantas selvagens de experimentos de reiluminação (Figura 26) e maiores e constantes para os genótipos transgênicos (Figura 26). Nos experimentos de reiluminação (Figura 24), os valores da relação LHCII/CF1 α mostraram uma tendência de queda para todos os genótipos.

Todas as diferenças mostradas nessas relações e nos padrões de eletroforese de proteínas (Figuras 23, 24 e 25), quando comparam-se plantas selvagens e transgênicas, aliados às informações sobre conteúdo de clorofila (18, 21 e 22) e pigmentos do Ciclo das Xantofilas (Figura 18) bem como metabolismo fotossintético (Tabelas de 2 a 9), discutidas anteriormente, evidenciam mudanças estruturais de complexos pigmento-proteína do aparato fotossintético que são importantes para o estabelecimento de correlações entre a estrutura e função desses complexos (Paulsen, 1997, Kühlbrandt et al., 1994; Nicholson et al., 1996, Koepke et al., 1996) e através delas pode-se saber mais sobre os mecanismos de ajuste e aclimação das plantas às mudanças ambientais.

Recentemente, Murakami et al. (2000), obtiveram plantas de tabaco transgênico com um menor conteúdo de ácidos graxos trienólicos, um tipo de lipídio insaturado, com tripla ligação. Com a inibição da síntese desse tipo de lipídio, que está presente na membrana de cloroplastos de plantas superiores e, é abundante nas membranas de plantas que crescem em condições de baixa temperatura, os pesquisadores conseguiram promover um aumento na tolerância das plantas à temperaturas mais elevadas e maiores

índices de crescimento e fotossíntese nas plantas transgênicas. Comparadas com as plantas selvagens, os transgênicos apresentaram taxas de crescimento bem maiores à uma temperatura de 36°C e, à 47°C as plantas transgênicas conseguiram sobreviver por duas horas, enquanto os exemplares selvagens morriam mais rápido. Segundo os autores, isso sugere que a tolerância a altas temperaturas pode estar relacionadas a essas substâncias.

No nosso caso, as plantas transgênicas TR1 e TR2 possuem uma elevada expressão das proteínas LHC que, poderia se mostrar extremamente prejudicial aos transgenes quando estes são cultivados em condições de alta luminosidade, devido ao processo de fotoinibição, provocado pela absorção de um excesso de energia luminosa nestas condições. Entretanto, isso não é observado nos exemplares transgênicos TR1 e TR2, uma vez que estes conseguem se aclimatar às condições de alta luminosidade evidenciado tanto pelas análises de fluorescência da clorofila *a*, onde se observam maiores valores de q_N , que representam eficientes mecanismos de fotoproteção e fotoaclimatação a alta luminosidade; análises de trocas gasosas que não se diferem das plantas selvagens; conteúdo de pigmentos do ciclo das xantofilas; quanto pelas análises da morfologia foliar das plantas em alta luminosidade. Isso pode nos levar a inferir também que possivelmente a superexpressão do gene *Lhcb1*2*, pôde ter alterado, de alguma forma, a síntese de certos lipídios presentes na membrana dos tilacóides que, permitiu mudanças na montagem dos complexos coletores inseridos nestas membranas e que podem ainda ter induzido alterações na biogênese dos cloroplastos promovendo, consequentemente, todas as mudanças morfológicas já mencionadas e ainda conferindo dessa forma, às plantas transgênicas, a capacidade de adaptar-se e desenvolver-se em condições de alta luminosidade, que são sempre acompanhadas de altas temperaturas.

5. - CONCLUSÕES

A expressão do gene *Lhcb1*2* constitutivamente em condições de alta luminosidade resultou em alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas importantes nas plantas de tabaco:

1) As plantas transgênicas possuem a lâmina foliar mais espessa que a das plantas selvagens. Estas plantas apresentam também tanto um menor número de células da epiderme superior por extensão foliar quanto um menor número de células do parênquima paliçádico por extensão foliar com maior número de cloroplastos/célula. Esse menor número de células por extensão foliar é esperado pois as células da epiderme superior e também do parênquima paliçádico das plantas transgênicas (TR1 e TR2) são maiores sendo que, as células do parênquima paliçádico são mais alongadas para acomodar o maior número de cloroplastos destas plantas e, as do parênquima lacunoso se mostra com espaços livres maiores quando comparado com as plantas selvagens (WTSR1).

2) A determinação do conteúdo de carboidratos e de metabólitos do Ciclo de Calvin-Benson mostram que a expressão constitutiva do gene *Lhcb1*2* em alta luminosidade promoveu várias mudanças no metabolismo das plantas transgênicas. Contudo, a taxa de assimilação de CO₂ destas plantas não diferiu significativamente da apresentada pelas plantas selvagens em todas as condições de cultivo (alta e baixa luminosidade) e de análise (alta luminosidade em condições atmosféricas e de saturação de CO₂). Assim, parece que as alterações observadas na anatomia foliar das plantas transgênicas de tabaco, como o aumento dos espaços intercelulares, que facilitam a difusão de CO₂, a organização do parênquima paliçádico e a disposição dos cloroplastos, podem atuar no controle da distribuição da luz interna, contribuindo para a aclimação

das plantas cultivadas em alta luminosidade, sem comprometer a eficiência fotossintética.

3) As análises de fluorescência da clorofila *a* e mais especificamente a verificação de aumentos nos valores de q_N e de NPQ, para os materiais transgênicos, obtidos durante as análises de assimilação de CO₂ e de experimentos de estresse de frio confirmam a função fotoprotetora do mecanismo de “quenching” não-fotoquímico contra os efeitos da alta luminosidade.

4) Os resultados das análises de Northern Blot de plantas transgênicas e selvagens de experimentos de reiluminação demonstraram a expressão constitutiva do gene *Lhcb1*2*. Além disso, os experimentos de reiluminação e de transferência BL→AL forneceram informações importantes sobre o metabolismo das plantas transgênicas como a perda do controle circadiano para a expressão do referido gene e alterações no conteúdo de carotenóides do Ciclo das Xantofilas e também de clorofilas totais (*a* + *b*) e da relação clorofila *a/b*. Quanto ao conteúdo de clorofilas (*a* e *b*) sugere-se que a expressão constitutiva do gene talvez funcione como um sinal para induzir respostas de luz, ou seja, possa mimetizar o efeito da luz e/ou sinalizar para a maquinaria de síntese ou que pelo menos degradam menos intensamente o seu conteúdo pré-existente.

5) Finalmente, as diferenças mostradas nas relações LHCII/OEE, LHCII/CF1 α e LHCII/CP29 e na composição e conteúdo das proteínas das membranas dos tilacóides em géis PAGE, quando comparam-se plantas selvagens e transgênicas, aliados à todos os resultados obtidos mencionados acima permitem inferir que a expressão do gene *Lhcb1*2* constitutivamente, em alta luminosidade alterou o processo de biogênese do cloroplasto, sem que saibamos exatamente como, além de ter promovido mudanças estruturais dos complexos pigmento-proteína do aparato fotossintético que são importantes para o estabelecimento de correlações entre a estrutura e função desses complexos e consequentemente, pôde-se conhecer mais sobre os mecanismos de ajuste de curto e longo prazo e de aclimação das plantas às mudanças ambientais.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADIA, J.; GLICK, R. E.; TAYLOR, S. E.; TERRY, N.; MELIS, A. Photochemical apparatus organization in the chloroplasts of two *Beta vulgaris* genotypes. **Plant Physiol.**, v. 79, p. 872-878. 1985.
- ADAMSKA, I. ELIPs - Light-induced stress proteins. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 100, p. 794-805. 1997.
- ADAMSKA, I.; KLOPPSTECH, K. Considerations to the role of ELIPs during light stress. In: **Photoinhibition of Photosynthesis – from molecular mechanism to the field**. Barker, N. R.; Bowyer, J. R. (Eds.). p. 209-204. 1994.
- ADAMSKA, I.; KLOPPSTECH, K.; OHAD, I. Early light-inducible protein in pea is stable during light stress but is degraded during recovery at low light intensity. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 5438-5444. 1993.
- AHMAD, M. & CASHMORE, A. R. HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. **Nature**. v.366, p. 162-166. 1993.
- ALBERTSSON, P. A. The structure and function of the chloroplast photosynthetic membrane – a model for the domain organization. **Photosynthesis Research**, v. 46; p. 141-149. 1995.
- ALLEN, J. F. & NILSSON, A. Redox signalling and the structural basis of regulation of photosynthesis by protein phosphorylation. **Physiol. Plantarum.**, v. 100, p. 863-868. 1997.
- ALLEN, J. F.; ALEXCIEV, K.; HAKANSSON, G. Regulation by redox signalling. **Current Biology**, v. 5 (8): 869-872. 1995.
- ALLEN, J. F.; BENNETT, J.; STEINBACK, K. E.; ARNTZEN, C. J. Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of excitation energy between photosystems. **Nature**, v. 291, p. 25-29. 1981.
- ALWINE, J. C.; KEMP, D. J.; STARK, G. R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. **Proc. Nat. Acad. Science of USA**, v.74, p.5350-54, 1977.
- ANDERSON, J. M. and ANDERSON, B. The dynamic photosynthetic membrane and regulation of solar energy conversion. **Trends Biochem. Sci.**, v.13, p. 351-55. 1988.
- ANDERSON, J. M.; CHOW, W. S.; GOODCHILD, D. J. Thylakoid membrane organisation in sun/shade acclimation. **Aust. J. Plant Physiol.**, v. 15, p.11-26. 1988.

- ANDERSON, J. M.; CHOW, W. S.; PARK, Y. The grand design of photosynthesis: Acclimation of the photosynthetic apparatus to environmental cues. **Photosynthesis Research**, v.46, p. 129-139. 1995.
- ANDERSON, J. M.; OSMOND, C. B. Shade-sun responses: compromises between acclimation and photoinhibition. In: KYLE, D. J.; OSMOND, C. B.; ARNTZEN, C. J. (eds.). **Photoinhibition**. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp.1-38. 1987.
- ANDERSON, S. L.; KAY, S. A. Phototransduction and circadian clock pathways regulating gene transcription in higher plants. In: **Advances in Genetics**. Jeffrey C. Hall & Jay C. Dunlap (Eds.), v. 35, p. 1-34. 1997.
- ANDERSSON, B. & BARBER, J. Composition, organization and dynamics of thylakoid membranes. In: BITTAR, E. E. (Eds). **Advances in molecular and cell biology. Molecular processes of photosynthesis**. v.10, p.1-53. 1994.
- ANDERSSON, B.; ARO, E. M. Grana stacking and protection of photosystem II in thylakoid membranes of higher plant leaves under sustained high irradiance: a hypothesis. **Photosynthesis Research**. V. 41, p. 325-326. 1994.
- ANDERSSON, B.; ARO, E. M. Proteolytic activities and proteases of plant chloroplasts. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 100, p. 780-93. 1997.
- ANDERSSON, B.; STYRING, S. Photosystem II: Molecular organisation, function and acclimation. In: KROGMANN, D. W. ed. **Currents Topics in Bioenergetics**, London, Academic Press, v.16, p.2-81. 1991.
- ANDREASSON, E.; SVENSSON, P.; WEIBULL, C.; ALBERTSSON, P. A. Separation and characterization of stroma and grana membranes-evidence for heterogeneity in antenna size of both photosystem I and photosystem II. **Biochim Biophys. Acta.**, v. 939, p. 339-350. 1988.
- ARO, E. M.; TYYSTJARVI, E.; NURMI, A. Effects of light and temperature on PSII heterogeneity. In: BALTSCHIEFFSKY, M. (Ed.). **Current Research in Photosynthesis**. v. II, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 439-442. 1990.
- ARVIDSSON, P. O.; CARLSSON, M.; STEFÁNSSON, H.; ALBERTSSON, P. A.; AKERLUND, H. E. Violaxanthin accessibility and temperature dependency for deepoxidation in spinach thylakoid membranes. **Photosynthesis Research**. 1997.
- ASADA, K. Radical production and scavenging in the chloroplasts. In: **Advances in Photosynthesis. Photosynthesis and Environment.**, Baker, N. R. (ed.). v. 5, p. 123-150. 1996.
- BARBER, J. An explanation for the relationship between salt-induced thylakoid stacking and the chlorophyll fluorescence changes associated with changes in spillover of energy from photosystem II to photosystem I. **FEBS Lett.**, v. 118, p. 1-10. 1980.
- BARBER, J. & ANDERSSON, B. Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. **Trends Biochem. Sci.**, v. 17, p. 61-66. 1992.

- BARBER, J.; NIELD, J.; MORRIS, E. P.; HANKAMER, B. subunit positioning in photosystem II revisited. **Trends Biochem. Sci.** v. 24, p. 43-45. 1999.
- BARBER, J.; NIELD, J.; MORRIS, E. P.; ZHELEVA, D.; HANKAMER, B. The structure, function and dynamics of photosystem two. **Physiologia Plantarum**. v. 100, p. 817-827. 1997.
- BASSI, R. & DAINESE, P. A supramolecular antenna complex from photosystem II membranes. **Eur. J. Biochem.**, v.204, p. 317-326. 1992
- BASSI, R. PINEAU, B.; DAINESE, P.; MARQUARDT, J. Carotenoid-binding proteins of photosystem II. **Eur. J. Biochem.**, v.212, p. 297-303. 1993.
- BASSI, R.; BARBATO, R.; HINZ, U. G. The role of the light harvesting complex and photosystem II in thylakoid stacking in the *chlorina f2* barley mutant. **Carlberg Res. Commun**, v. 50, p. 347-367. 1985.
- BASSI, R.; SANDONÀ, D.; CROCE, R. Novel aspects of chlorophyll a/b binding proteins. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 100, p. 769-79. 1997.
- BENGIS, C. & NELSON, N. Purification and properties of the photosystem I reaction center from chloroplast. **J. Biol. Chem.** v. 250, p. 2783-2788. 1975.
- BERGANTINO, E.; DAINESE, P.; CEROVIC, Z.; SECHI, S.; BASSI, R. A post-translational modification of the photosystem II subunit CP29 protects maize from cold stress. **J. Biol. Chem**, v.270, p. 8474-8481. 1995.
- BERGANTINO, E.; SANDONÀ, D.; CUGINI, D.; BASSI, R. The photosystem II subunit CP29 can be phosphorylated in both C3 and C4 plants as suggest by sequence analysis. **Plant Mol. Biol.** 1997.
- BEVAN, M.; BARNES, W. M.; CHILTON, M. D. Structure and transcription of the nopoline synthase gene region of the T-DNA. **Nucleic Acids Research**, v.11, p. 369-385. 1983.
- BILGER, W. & SCHREIBER, U. Energy dependent quenching of dark level chlorophyll fluorescence in intact leaves. **Photosynthesis Research**, Hague, v. 10, p. 303-308, 1986.
- BJÖRKMAN, O. High irradiance stress in higher plants and interaction with other stress factors. In: BIGGINS, E. D. (Ed.) **Progress in Photosynthesis research**, v. 4, p. 11-18. 1987a.
- BJÖRKMAN, O.; DEMMIG-ADAMS, B. Regulation of photosynthetic light energy capture, conversion and dissipation in leaves of higher plants. In: **Ecological Studies**, Schulze, E. D.; Caldwell, M. (eds.), v. 100, p. 17-47. 1994.
- BRUSSLAN, J. A. & TOBIN, E. M. Light-independent developmental regulation of *cab* gene expression in *Arabidopsis thaliana* seedlings. **PNAS-USA**, v. 89, p. 7791-7795. 1992.
- BUCHANAN, B.B. Regulation of the CO₂ assimilation in oxygenic photosynthesis: the ferredoxin-thioredoxin systems. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 288, p. 1-9, 1991.

- BUSCHMANN, C. Variation of the quenching of chlorophyll fluorescence under different intensities of the actinic light in wildtype plants of tobacco and in an aurea mutant deficient of light-harvesting-complex. **Journal Plant Physiology**. Alemanha, v. 145, p. 245-252. 1995.
- BUTLER, W. L. & KITAJIMA, M. Fluorescence quenching in photosystem II of chloroplast. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 376, p.116-125, July. 1989.
- CAEMMERER, S. von & FARQUHAR, G. D. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. **Planta**, Berlin, v. 153, p. 376-387. 1981.
- CAEMMERER, S. von & FARQUHAR, G. D. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. **Planta**, Berlin, v. 153, p. 376-387. 1981.
- CARRE, I. A. & KAY, S. A. Multiple DNA protein complexes at a circadian-regulated promotor element. **Plant Cell**. v. 7, p. 2039-2051. 1995.
- CARTER, D. R.; CHEESEMAN, J. M.; CLOUGH, B. F.; LOVELOCK, C. SIM, R. G.; ONG, J. E. Photosynthetic characteristics of the mangrove, *Bruguiera parviflora* (Roxb.) Wright & Arn., under natural conditions. In: BALTSCHIEFFSKY, M. (Ed.). **Current Research in Photosynthesis**. v. IV, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 859-862. 1990.
- CASANO, L. M.; GOMEZ, L. D.; TRIPPI, V. S. Oxygen- and light-induced proteolysis in isolated oat chloroplast. **Plant Cell Physiology**. V. 31, p. 377-382. 1990.
- CASANO, L. M.; LASCANO, H. R.; TRIPPI, V. S. Hydroxyl radicals and a thylakoid-bound endopeptidase are involved in light and oxygen-induced proteolysis in oat chloroplasts. **Plant Cell Physiology**. V. 35, p. 145-152. 1994.
- CASHMORE, A. R. Structure and expression of a pea nuclear gene encoding a chlorophyll a/b binding polypeptide. **Proceedings of the National Academy Sciences**, Washington, v.81, p.2960-64. 1984.
- CHAMPIGNY, M.L.; FOYER, C. Nitrate reductase of cytosolic protein kinases diverts photosynthetic carbon from sucrose to amino acid biosynthesis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 100, p. 7-12, 1992.
- CHANG, Y. C. & WALLING, L. L. Absciscic acid negatively regulates expression of chlorophyll a/b binding protein genes during soybean embryogeny. **Plant Physiol**. v. 97, p. 1260-1264. 1991.
- CHOW, W. S.; QUIAN, L.; GOODCHILD, D. J.; ANDERSON, J. M. Photosynthetic acclimation of *Alocasia macrorrhiza* L. G. Don to growth irradiance : structure, function and composition of chloroplast. **Aust. J. Plant Physiology**, v. 12, p. 107-122. 1988b.
- CHRISTOPHER, D. A. & MULLET, J. E. Separated photosensory pathway co-regulate blue light/ultraviolet-a-activated psbD-psbC transcription and light-induced D2 and CP43 degradation in barley (*Hordeum vulgare*) chloroplasts. **Plant Physiology**, v. 104, p.1119-29. 1994.

- CHYLLA, R. A. & WHITMARSH, J. Inactive photosystem II complexes in leaves. Turnover rate and quantitation. **Plant Physiol.** v. 90, p. 765-772. 1989.
- COGDELL, J. R. Photosynthetic reaction centers. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, v. 34, p. 21-45. 1983.
- CRITCHLEY C. & RUSSELL, A. W. Maximizing light interception: the role of chloroplast disposition in cells and thylakoid membrane architecture. In: ABROL, Y. A.; MOHANTY, P.; GOVINDJEE (Eds.). **Photosynthesis: photoreactions to plant productivity**. Kluwer Academic Publishers. P. 257-276. 1993.
- CROCE, R.; BRETON, J.; BASSI, R. Conformational changes induced by phosphorylation in the CP29 subunit of photosystem II. **Biochemistry**. V. 35, p. 11142-11148. 1996.
- CROFTS, A. R. & YERKES, C. T. A molecular mechanism for q_E -quenching. **FEBS Letters**, v. 352, p. 265-270. 1994.
- CROFTS, A. R. & YERKES, C. T. A molecular mechanism for q_E -quenching. **FEBS Letters**, v. 352, p. 265-270. 1994.
- DANON, A.; MAYFIELD, S. P. Light-regulated translation of chloroplast messenger RNAs through redox potential. **Science**, v. 266, p. 1717-19. 1994.
- DEMMIG, B.; WINTER, K.; KRUGER, A.; CZYGAN, F. C. Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves. **Plant Physiol.** v. 84, p. 218-224. 1987.
- DEMMING-ADAMS, B. Carotenoids and Photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. **Biol. and Biochim. Acta.**, v. 1020, p. 1-24. 1990.
- DEMMING-ADAMS, B. & ADAMS W. W III. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. **Annu. Ver. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 43, p. 599-626. 1992.
- DEMMING-ADAMS, B. & ADAMS W. W III. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. **Trends in Plant Science**, v. 1, p. 21-6. 1996.
- DEMMING-ADAMS, B.; ADAMS W. W III; CZYGEN, F. C.; SCHREIBER, U.; LANGE, O. L. Difference in the capacity for radiationless energy dissipation in the photochemical apparatus of green and blue green algal lichens associated with differences in carotenoid composition. **Planta**, v. 180, p. 582-589. 1990.
- DESIMONE, M.; HENKE, A.; WAGNER, E. Oxidative stress induces partial degradation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase in isolated chloroplasts of barley. **Plant Physiology**, v. 111, p. 789-796. 1996.
- DIETZ, K. J. & HEBER U. Light and CO₂ limitation of photosynthesis and state of the reactions regenerating ribulose 1,5-bisphosphate or reducing 3-phosphoglycerate. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 848, p. 392-410. 1986.
- DREYFUSS, B. W.; THORBNER, J. P. Assembly of the light-harvesting complexes (LHCs) of photosystem II. Monomeric LHCIIb complexes are intermediates in the formation of oligomeric LHCIIb complexes. **Plant Physiology**. Rockville, v. 106, p. 829-39. 1994.

- DURNIFORD, D. G. & FALKOWSKI, P. G. Chloroplast redox regulation of nuclear gene transcription during photoacclimation. **Photosynthesis Research**, v. 53, p. 229-241. 1997.
- EDWARDS, G. & WALKER, D. A. **C₃, C₄: mechanisms, and cellular and environmental regulation of photosynthesis**. Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 205, 1983.
- EDWARDS, J. W. & CORRUZI, G. M. Cell-specific gene expression in plants. **Ann Rev. Gen.** v. 24, p. 275-303. 1990.
- ESCOUBAS, J. M.; LOMAS, M.; LaROCHE, J.; FALKOWSKI, P. G. Light intensity regulation of *cab* gene transcription is signaled by the redox state of the plastoquinone pool. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, p. 10237-10241. 1995.
- ESKLING, M. & AKERLUND, H. E. Changes in the quantities of violaxanthin de-epoxidase, xanthophylls and ascorbate in spinach upon shift from low to high light. **Photos. Research**. v. 57, p. 41-50. 1998.
- FALKOWSKI, P. G.; LaROCHE, J. Acclimation to spectral irradiance in algae. **J. Phycol.**, v.28, p. 8-14. 1991.
- FARQUHAR, G. D. & CAEMMERER, S. von. Modelling of photosynthesis response to environmental conditions . In: Lange, O. L., Nobel, P. S., Osmond, C. B., Ziegler, H. (eds.). **Encyclopaedia of Plant Physiology**, New Series, v. 12 (A), p. 549-587. 1982.
- FOYER, C. H. Willey Series in cell biology - Photosynthesis. In: EDWARDS BITTAR (Ed.), v. 1; p.1-219. 1984.
- FOYER, C. H. The role of orthophosphate in photosynthetic control: studies using phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. **Plant Physiology**. v.8, p. 81-89. 1989.
- FOYER, C. H. Interactions between electron transport and carbon assimilation in leaves: coordination of activities and control. In: **Photosynthesis: photoreactions to plant productivity**. ABROL, Y. P.; MOHANTY, P.; GOVINDJEE (Eds.). Academic Press, p. 199-226. 1993.
- FOYER, C. H.; DUJARDYN, M.; LEMOINE, Y. Turnover of the xanthophyll cycle during photoinhibition and recovery. In: **Current Research in Photosynthesis**. Baltscheffsky, M. (ed.). v. II, p. 491-494. 1990.
- FUNK, C.; SCHRODER, W. P.; GREEN, B. R.; RENGGER, G.; ANDERSSON, B. The intrinsic 22kDa protein is a chlorophyll-binding subunit of photosystem II. **FEBS Letters**. v. 342, p. 261-66. 1994.
- FURUYA, M. Phytochromes : their molecular species, gene families and functions. **Ann Revi. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, p. 617-646. 1993.
- GAL, A.; ZER, H.; OHAD, I. Redox-controlled thylakoid protein phosphorylation. News and views. **Physiologia Plantarum**, v.100, p.869-885. 1997.

- GENTY, B.; BRIANTIS, J. M.; BAKER, N. R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta.**, Amsterdam, v. 990, p. 87-92. 1989.
- GERHARDT, R.; STITT, M.; HELDT, H. W. Subcellular metabolite levels in spinach leaves: regulation of sucrose synthesis during alterations in photosynthetic partitioning. **Plant Physiology**, v. 83, p. 397-407. 1987.
- GHANOTAKIS, D. F. & YOCUM, C. F. Photosystem II and the oxygen-evolving complex. **Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.**, v. 41, p. 255-76. 1990.
- GILLHAM, D. J.; DODGE, A. D. Chloroplast superoxide and hydrogen peroxide scavenging systems from pea leaves: seasonal variations. **Plant Science**, v. 50, p. 105-109. 1987.
- GILMORE, A. M. & YAMAMOTO, H. Y. Resolution of lutein and zeaxanthin using a non-endcapped, lightly carbon-loaded C₁₈ high-performance liquid chromatographic column. **Journal of Chromatography**, v.543, p.137-45, 1991.
- GILMORE, A. M. Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplast and leaves. **Plant Physiology**, v. 99, p. 197-09. 1997.
- GIUFFRÀ, E.; CUGINI, D.; CROCE, R.; BASSI, R. Reconstitution and pigment binding properties of recombinant CP29. **European Journal Biochem.**, v. 238, p. 112-120. 1996.
- GOLBECK, J. H. Structure, function and organization of the photosystem II reaction center complex. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 895, p. 167-204. 1988.
- GOUNARIS, K.; BARBER, J.; HARWOOD, J. L. The thylakoid membranes of higher plants. **Biochem. Journal**, v. 237, p. 313-326. 1986.
- GRAAN, T. & ORT, D. R. Detection of oxygen-evolving photosystem II centers inactive in plastoquinone reduction. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 852, p. 320-330. 1986.
- GREEN, B. R.; KÜHLBRANDT, W. Sequence conservation of light-harvesting and stress-response proteins in relation to the three-dimensional molecular structure of LHCII. **Photosynthesis Research**, v. 44, p. 139-148. 1995.
- GREEN, B. R.; PICHERSKY, E. and KLOPPSTECH, K. Chlorophyll a/b binding proteins: an extended family. **Trends Biochem. Sci.**, v. 16, p. 181-86. 1991.
- HAVAUX, M. Stress tolerance of photosystem II *in vivo*: antagonistic effects of water, heat and photoinhibition stresses. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 100, p. 424-432. 1992.
- HAVAUX, M. Temperature-dependent modulation of the photoinhibition-sensitivity of photosystem II in *Solanum tuberosum* leaves. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 35, n. 5, p. 757-66. 1994.
- HAVAUX, M.; TARDY, F.; LEMOINE, Y. Photosynthetic light-harvesting function of carotenoids in higher-plant leaves exposed to high light irradiances. **Planta**, v. 205, p. 242-250. 1998.

- HELDT, H. W.; CHON, C. J.; MARONDE, D.; HEROLD, A.; STANKOVIC, Z. S.; WALKER, D. A.; KRAMINER, A.; KIRK, M. R.; HERBER, U. Role of orthophosphate and other factors in regulation of starch formation in leaves and isolated chloroplasts. **Plant Physiology**, v.59, p. 1146-55. 1977.
- HERRERA-ESTRELLA, L. & SIMPSON, J. Influence of environmental factors on photosynthetic genes. In: **Advances in Genetics**. Genomic responses to environmental stress. John G. Scandalios (Eds). Academic Press. v.28. 1990.
- HOAGLAND, D. R. & ARNON, D. I. **The water culture of growing plants without soil**. University of California. Berkley. 1950.
- HOOBER, J. K.; EGGINK, L. L. Assembly of light-harvesting complex II and biogenesis of thylakoid membranes in chloroplasts. **Photosynthesis Research**. v. 61; p. 197-215. 1999.
- HORTON, P.; RUBAN, A. V.; REES, D.; PASCAL, A. A.; NOCTOR, G.; YOUNG, A. J. Control of the light harvesting function of chloroplast membranes by aggregation of the LHC chlorophyll-protein complex.. **FEBS Letters**, v. 292, p. 1-4. 1991.
- HOSHINA, S. & ITOH, S. Photosystem I reaction center in oxygenic photosynthetic organisms: current views and the future. . In: ABROL, Y. A.; MOHANTY, P.; GOVINDJEE (Eds.). **Photosynthesis: photoreactions to plant productivity**. Kluwer Academic Publishers. P. 51-82. 1993.
- HUBER, S. C. & HUBER, J. L. Role of sucrose-phosphate synthase in sucrose metabolism in leaves. **Plant Physiology**, v.99, p. 1275-8. 1992.
- HUBER, S. C. Biochemical mechanism for regulation of sucrose accumulation in leaves during photosynthesis. **Plant Physiology**. v.91, p. 656-662. 1989.
- HUDSON, G.S.; EVANS, J.R.; CAEMMERER, S.; ARVIDSSON, Y.B.C.; ANDREWS, T.J. Reduction of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase content by antisense RNA reduces photosynthesis in transgenic tobacco plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 98, p. 294-320. 1992.
- HUNDAL, T.; ARO, E. M.; CARLBERG, I.; ANDERSSON, B. Restoration of light induced photosystem II inhibition without *de novo* protein synthesis. **FEBS Letters**, v. 267, p. 203-206. 1990.
- HURRY, V.; KRÓL, M.; ÖQUIST, G.; HUNER, N. P. A. Effect of long-term photoinhibition on growth and photosynthesis of cold hardened spring and winter wheat. **Planta**, v. 188, p. 369-375. 1992.
- JANG, J. & SHEEN, J. Sugar sensing in higher plants. **Plant Cell**, v. 6, p. 1665-1679. 1994.
- JANSSON, S.; PICHERSKY, E.; BASSI, R.; GREEN, B. R.; IKEUCHI, M.; MELLIS, A.; SIMPSON, D. J.; SPANGFORT, M.; STAECHELIN, L. A.; THORNER, J. P. A nomenclature for the genes encoding the chlorophyll a/b binding proteins of higher plants. **Plant Mol. Biol. Rep.**, v. 10, p. 242-53. 1992.

- JENNINGS, R. C. & ZUCHELLI, G. The influence of membrane stacking on light absorption by chloroplasts. **Photobiochem Photobiophys.**, v. 9, p. 215-221. 1985.
- JONES, M. G. K.; OUTLAW, W. H.; LOWRY, O. H. procedure for the assay of sucrose in range 10^{-7} – 10^{-4} moles. **Plant Physiology**, v. 196, p. 379-83. 1977.
- KARLIN-NEUMANN, G. A.; SUN, L. ; TOBIN, E. M. Expression of light-harvesting chlorophyll a/b protein genes is phytochrome-regulated in etiolated *Arabidopsis thaliana* seedlings. **Plant Physiol.** v. 88, p. 1323-1331. 1988.
- KAY, S. A. Shedding light on clock controlled *cab* gene transcription in higher plants. **Seminars Cell Biol.**, v. 4, p. 81-86. 1993.
- KELLMANN, J. W.; MERFORTH, N.; WIESE, M.; PICCHERSKY, E.; PIECHULLA, B. Concerted circadian oscillations in transcript levels of nineteen *Lhca/b* genes in *L. esculentum*. **Mol. Gen. Gen.**, v. 237, p. 438-48. 1993.
- KITAJIMA, M. & BUTLER, W. L. Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry by dibromothymoquinone. **Biochimica et Biophysica Acta**. Amsterdam, v. 376, p. 105-115. 1975.
- KLEE, H.; YANOFSKY, M. F.; NESTER, E. W. Vectors for transformation of higher plants. **Biotechnology**, v.3, p. 637-642. 1985.
- KLEIN, R. R.; GAMBLE, P. E.; MULET, J. E. Light-dependent accumulation of radiolabeled plastid-encoded chlorophyll *a*-apoproteins requires chlorophyll *a*. I Analysis chlorophyll-deficient mutants and phytochrome involvement. **Plant Physiology**, v.88, p.1246-56. 1988.
- KLOPPSTECH, K. Light regulation of photosynthetic genes. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 100, p. 739-47. 1997.
- KO, K.; KO, Z. W.; TURPIN, D. H.; LABATE, C. A.; MOHANTY, N.; GRANELL, A. Overproduction of chlorophyll a/b binding protein enhances photosynthetic activity in transgenic tobacco. In: Murata, N. (ed) **Research in photosynthesis**, vol. III, 445-48, Kluwer Academic Publishers - Netherlands. 1992.
- KOEPKE, J.; HU, X. C.; MUENKE, C.; SCHULTEN, K.; MICHEL, H. The crystal structure of the light-harvesting complex II from *Rhodospirillum rubrum*. **Structure**, v. 4, p. 581-587. 1996.
- KOOTEN, O. van & SNEL, J. F. H. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. **Photosynthesis Research**, Hague, v. 25, p. 147-50. 1990.
- KRAUSE, G. H. & WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 42, p. 313-49. 1991.
- KRAUSE, G. H.; SOMERSALO, S.; ZUMBUSCH, E.; WEYERS, B.; LAASCH, H. On the mechanisms of photoinhibition in chloroplast relationship between changes in fluorescence and activity of PSII. **J. Plant Physiol.** v. 136, p. 472-479. 1990.

- KRÓL, M.; SPANGFORT, M. D.; HUNER, N. P. A.; ÖQUIST, G.; GUSTAFSSON, P.; JANSSON, S. Chlorophyll *a/b*-binding proteins, pigment conversion, and early light-induced proteins in a chlorophyll *b*-less barley mutant. **Plant Physiology**, v. 107, p. 843-873. 1995.
- KÜHLBRANDT, W. Three-dimensional structure of the light-harvesting chlorophyll *a/b* complex. **Nature**, v. 307, p. 478-80. 1984.
- KUHLBRANDT, W. Structure of the light harvesting chlorophyll *a/b* protein complex by high resolution electron crystallography. In: BALTSCHIEFFSKY, M. (Ed.). **Current Research in Photosynthesis**. v. II, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 217-222. 1990.
- KÜHLBRANDT, W.; WANG, D. N.; FUJIYOSHI, Y. Atomic model of plant light-harvesting complex. **Nature**, v. 367, p. 614-21. 1994.
- KUTTKAT, A.; GRIMM, R.; PAULSEN, H. Light-harvesting chlorophyll *a/b* binding protein inserted into isolated thylakoids binds pigments and is assembled into trimeric light-harvesting complex. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, p. 1267-76. 1995.
- LABATE, C. A. & LEEGOOD, R. Influence of low temperature on respiration and contents of phosphorylated intermediates in darkened barley leaves. **Plant Physiology**, v. 91, p. 905-10. 1989.
- LABATE, M. T. V.; KO, K.; ZDENKA, W. K.; PINTO, L. S. R.; GRANELL, A.; BRUGNOLI, E.; AUGUSTI, A.; LABATE, C. A. Constitutive production of pea *Lhcb1**2 in tobacco and petunia triggers multiple responses in development, morphology and photosynthetic capacity. 2000. Submetido.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage the structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T₄. **Nature**, London, v. 227, p. 680-5. 1970.
- LARSSON, U. K.; ANDERSON, J. M.; ANDERSSON, B. Variations in the relative content of the peripheral and tightly bound LHCII subpopulations during thylakoid light adaptation and development. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 894, p. 69-75. 1987.
- LEEGOOD, R. Enzymes of the Calvin Cycle. In: LEA, P. J. eds. **Methods in Plants Biochemistry**. Academic Press, v.3, p. 15-37. 1990.
- LEVERENZ, J. W. The effects of illumination sequence, CO₂ concentration, temperature and acclimation on the convexity of the photosynthetic light response curve. **Plant Physiol.**, v. 74, p. 332-341. 1988.
- LINDAHL, M.; ANDERSSON, B. A proteolytic activity associated with loss of LHCII during acclimation of spinach leaves from low to high light. In: **Research in Photosynthesis**, Murata, N. (ed.). v. 1, p. 307-310. 1992.

- LINDAHL, M.; FUNK, C.; WEBSTER, J.; BINGSMARK, S.; ADAMSKA, I.; ANDERSSON, B. Expression of ELIPs and PSII-S protein in spinach during acclimative reduction of the photosystem II antenna in response to increased light intensities. **Photosynthesis Research**, v. 54, p. 227-236. 1997.
- LINDAHL, M.; YANG, D. H.; ANDERSSON, B. Regulatory proteolysis of the major light-harvesting chlorophyll a/b protein of photosystem II by a light-induced membrane-associated enzymic system. **Eur. J. Biochem.**, v. 231, p. 503-509. 1995.
- LONG, S. P. & HÄLLGREN, J. E. Measurement of CO₂ assimilation by plants in the field and laboratory. In: COOMBS, J.; HALL, D. O.; LONG, S. P.; SCURLOCK, J. M. O. (ed.). **Techniques in bioproductivity and photosynthesis**. Oxford, Pergamon Press, 1985, p. 62-94. 1985.
- LOOMIS, R. S. & GERAkis, P. A. Productivity of agricultural ecosystems. In: COOPER, J. P. (ed.). **Photosynthesis and productivity in different environments**. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 145-172. 1975.
- LOWRY, O. & PASSONNEAU, J. V. **A flexible system of enzymatic analysis**. Academic Press, New York. 1972.
- MAENPAA, P.; ANDERSSON, B.; SUNDBY, C. Differences in the sensitivity to photoinhibition between PSII in the appressed and non-appressed thylakoid regions. **FEBS Letters**, v. 215, p. 343-350. 1987.
- MALKIN, S.; ARMOND, P. A.; MOONEY, H. A.; FORK, D. C. Photosystem II photosynthetic unit sizes from fluorescence induction in leaves: correlation to photosynthetic capacity. **Plant Physiol.**, v. 67, p. 570-579. 1980.
- MARRS, K. A. & KAUFMAN, L. S. Rapid transcriptional regulation of the *Cab* and pEA207 gene families in peas by blue light in the absence of cytoplasmic protein synthesis. **Planta**, v. 183, p. 327-333. 1991.
- MAURO, S.; DAINESE, P.; LANNOY, R.; BASSI, R. Cold-resistant and cold-sensitive maize lines differ in the phosphorylation of the photosystem II subunit CP29. **Plant Physiol.** 1997.
- MAYFIELD, S. P.; YOHAN, C. B.; COHEN, A.; DANON, A. Regulation of chloroplast gene expression. **Annual Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.46, p. 147-166. 1995.
- MEEHAN, L.; HARKINS, K.; CHORY, J.; RODERMEL, S. *Lhcb* transcription is coordinated with cell size and chlorophyll accumulation. Studies on fluoresce-activated, cell-sorter-purified single cell from wild-type and immutans *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, v.112, p.953-63. 1996.
- MELIS, A. & HOMANN, P. H. Heterogeneity of the photochemical centers in system II of chloroplasts. **Photochem. Photobiol.**, v. 23, p. 343-350. 1976.
- MISHRA, S.; SUBRAHMANYAM, D.; SINGHAL, G. S. Interrelationship between salt and light stress on primary process of photosynthesis. **J. Plant Physiol.** v. 138, p. 92-96. 1991.

- MITRA, S.; BHARDWAJ, S. N.; SRIVASTAVA, G. C. Source and sink relationship. In: **Photosynthesis: photoreactions to plant productivity**. ABROL, Y. P.; MOHANTY, P.; GOVINDJEE (Eds.). Academic Press, p. 361-387. 1993.
- MULLET, J. E.; KLEIN, P. G.; KLEIN, R. R. Chlorophyll regulates accumulation of the plastid-encoded chlorophyll apoproteins CP43 and D1 by increasing apoprotein stability. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v.87, p.4038-42. 1990.
- MUNCH, S.; LJUNGBERG, U.; STEPPUHN, J.; SCHNEIDERBAUER, A.; NECHUSHTAI, R.; BEYREUTHER, K.; HERRMANN, R. G. Nucleotide sequences of cDNAs encoding the entire precursor polypeptides for subunits II and III of the photosystem I reactin center of spinach. **Curr. Genet.** v. 14, p. 511-518. 1988.
- MURAKAMI, Y.; TSUYAMA, M.; KOBAYASHI, Y.; KODAMA, H. Trienoic fatty acids and plant tolerance of high temperature. **Science**, v.287, n.5452, p.476-79. 2000.
- MYLLER, K. R. & LYON, M. K. Do we really know why chloroplast membranes stack? **TIBS**, v. 6, p. 219-222. 1985
- NAGY, F.; KAY, S. A.; CHUA, N. H. A circadian clock regulates transcription of the wheat *cab1* gene. **Genes Dev.** v. 2, p. 376-382. 1988.
- NICHOLSON, W. V.; SHEPHERD, F. H.; ROSENBERG, M. F.; FORD, R. C.; HOLZENBURG, A. Structure of photosystem II in spinach thylakoid membranes: comparison of detergent-solubilized and native complexes by electron microscopy. **Biochem. Journal**, v. 315, p. 543-547. 1996.
- OBERSCHMIDT, O.; HÜCKING, C.; PIECHULLA, B. Diurnal *Lhc* gene expression is present in many but not all species of the plant kingdom. **Plant Mol. Biol.** v. 27, p. 147-53. 1995.
- ÖQUIST, G.; HUNER, N. P. A. Effects of cold acclimation on the susceptibility of photosynthesis to photoinhibition in Scots pine and winter and spring cereals: a fluorescence analysis. **Funct. Ecol.**, v. 5, p. 91-100. 1991.
- PARK, R. B. & SANE, P. V. Distribution of function and structure in chloroplast lamellae. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, v. 22, p. 395-430. 1971.
- PARK, Y.; CHOW, W. S.; ANDERSON, J. M. Chloroplast movement in the shade plant *tradescantia albiflora* helps protect photosystem II against light stress. **Plant Physiology**, v.111, p. 867-75. 1996.
- PAULSEN, H. Pigment ligation to proteins of the photosynthetic apparatus in higher plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 100, p. 760-68. 1997.
- PEARCY, R. W. Sunflecks and photosynthesis in plant canopies. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 41, p. 421-453. 1990.
- PESARESI, P.; SANDONÀ, D.; GIUFFRÀ, E.; BASSI, R. A single point mutation (E166Q) prevents dicyclohexylcarbodiimide binding to the photosystem II subunit CP29. **FEBS Lett.**, v. 402, p. 151-156. 1997.

- PETER, G. F. & THORNER, J. P. Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment-proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 266, p. 16745-54. 1991.
- PIECHULLA, B. "Circadian Clock" directs the expression of plant genes. **Plant Mol. Biol.** v. 22, p. 533-542. 1993.
- PLUMLEY, F. G. & SCHMIDT, G. W. Light-harvesting chlorophyll *a/b* complexes: interdependent pigment synthesis and protein assembly. **The Plant Cell**, v. 7, p. 689-704. 1995.
- PORRA, R. J.; THOMPSON, W. A.; KRIEDEMANN, P. E. Determination of accurate coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 975, p. 384-394. 1989.
- POSSINGHAM, J. V. Plastid replication and development in the life cycle of higher plants. **Ann. Rev. Plant Physiol.** v. 31, p. 113-29. 1980.
- POSSINGHAM, J. V. Controls to chloroplast division in higher plants. **J. Microsc. Biol. Cell.** v. 25, p. 283-288. 1976.
- PRASIL, O.; ADIR, N.; OHAD, I. Dynamics of photosystem II: Mechanism of photoinhibition and recovery processes. In: **The Photosystems: Structure, Function and Molecular Biology**. J. BARBER ed. P.295-348. Elsevier, Amsterdam. 1992.
- PREISS, J. & LEVI, C. Starch biosynthesis and degradation. In: HATCH, M. D. & BOARDMAN, N. R. (Eds.). **The Biochemistry of Plants**. Academic Press, v.3, p. 371-423. 1980.
- QUICK, W. P.; SCHURR, U.; SCHEIBE, R.; SCHULZE, E. D.; RODERMEL, S. R.; BOGORAD, L.; STITT, M. Decreased ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase in transgenic tobacco transformed with "antisense" *rbcS*. I Impact on photosynthesis in ambient growth conditions. **Planta**, Berlin, v. 183, p.542-554. 1991.
- REAL, M. J. U. D. Efeito do aumento do complexo proteico clorofila *a/b* no metabolismo fotossintético de plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). Tese de Doutorado. Departamento de Genética, ESALQ-USP. Março de 1997.
- ROULIN, S.; FELLER, U. Light-independent degradation of stromal proteins in intact chloroplasts isolated from *Pisum sativum* L. leaves: requirement for divalent cations. **Planta**, v.205, p.297-304. 1998.
- RUBAN, A. V.; PHILLIP, D.; YOUNG, A. J.; HORTON, P. Carotenoid-dependent oligomerization of the major chlorophyll *a/b* light harvesting complex of photosystem II of plants. **Biochemistry**. v. 36, p. 7855-7859. 1997.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATES, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989, 3v.

- SAS INSTITUTE SAS/STAT user's guide, release 6, 11 ed., Cary, NC, USA: SAS Institute Inc.
- SCHÖNER, S.; KRAUSE, G. H. Protective systems against active oxygen species in spinach: response to cold acclimation in excess light. **Planta**, v. 180, p. 383-389. 1990.
- SCHREIBER, U.; SCHIWA, U.; BILGER, W. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. **Photosynthesis Research**, Hague, v. 10, p. 51-62. 1986.
- SEALEY, R. V.; WILLIAMS, M. L.; COBB, A. H. Adaptation of *Codium fragile* (Suringar) Hariot fronds to photosynthesis at varying flux density. In: BALTSCHIEFFSKY, M. (Ed.). **Current Research in Photosynthesis**. v. II, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 455-458. 1990.
- SENGER, H. & SCHMIDT, W. Diversity of photoreceptors. In: KENDRICK, R. E. & KRONENBERG, G. H. M. (Eds.) **Photomorphogenesis in plants**, 2ed., p. 301-325. 1994.
- SHARKEY, T. D. Photosynthesis in intact leaves of C₃ plants: Physics, physiology and rate limitations. **Bot. Review**, v.51, p. 53-105. 1985.
- SHARMA, P. K. **Effects of environmental stresses (light, temperature and salt) on photosynthesis in shorgum**. Ph. D. Thesis. King's College, University of London. London p. 225-229. 1990.
- SHARMA, P. K. & HALL, D. O. The role of carotenoids in protection against photoinhibition. In: ABROL, Y. A.; MOHANTY, P.; GOVINDJEE (Eds.). **Photosynthesis: photoreactions to plant productivity**. Kluwer Academic Publishers. p. 469-478. 1993.
- SMITH, H. Sensing the light environment: the functions of the phytochrome family. In: **Photomorphogenesis in plants**, Kendrick, R. E.; Kronenberg, G. H. M. (eds), p. 377-416. 1993.
- SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J. Mol. Biol.** ; v. 98, p. 503-517. 1975.
- SPURR, A. R. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **Journal of Ultrastructure Research**, New York, v.26, p.31-43. 1969.
- STAEHELIN, L. A. Reversible particle movements associated with unstacking and restacking of chloroplast membranes *in vivo*. **J. Cell Biol.**, v. 71, p. 136-158. 1976.
- STAEHELIN, L. A. Chloroplast structure and supramolecular organization of photosynthetic membranes. In: STAEHELIN, L. A. & ARNTZEN, C. J. (Eds.). **Encyclopedia of Plant Physiology**. v.19, Photosynthesis III, p.1-84. 1986.
- STITT, M. & QUICK, W. P. Photosynthetic carbon partitioning: its regulation and possibilities for manipulation. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 77, p. 633-41. 1989.

- STITT, M. & SONNEWALD, U. Regulation of metabolism in transgenic plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 46, p. 341-368. 1995.
- STITT, M. Limitation of photosynthesis by carbon metabolism. I. Evidence for excess electron transport capacity in leaves carrying out photosynthesis in saturating light and CO₂. **Plant Physiology**, v.81, p. 1115-22. 1986.
- STITT, M. Fructose 2,6-bisphosphate and plant carbohydrate metabolism. **Plant Physiology**, v.84, p. 201-4. 1987.
- STITT, M.; WILKE, I.; FEIL, R.; HELDT, H. W. Coarse control of sucrose phosphate synthase in leaves: alterations of the kinetic properties in response to the rate of photosynthesis and accumulation of sucrose. **Planta**, v.174, p. 217-30. 1988.
- SUNDBY, C.; MELIS, A.; MAENPAA, P.; ANDERSSON, B. Temperature-dependent changes in the antenna size of photosystem II. Reversible conversion of photosystem II α to photosystem II β . **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 851, p. 475-483. 1986.
- TERASHIMA, I. & INOUE, Y. Comparative photosynthetic properties of palisade tissue chloroplasts and spongy tissue chloroplasts of *Camellia japonica* L.: Functional adjustment of the photosynthetic apparatus to light environment within a leaf. **Plant Cell Physiol.**, v. 25, p. 555-563. 1984.
- TERASHIMA, I. & INOUE, Y. Palisade tissue chloroplasts and spongy tissue chloroplasts in spinach: Biochemical and ultrastructural differences. **Plant Cell Physiol.**, v. 26, p. 63-75. 1985a
- TERASHIMA, I. & INOUE, Y. Vertical gradient in photosynthetic properties of spinach chloroplasts dependent on intra-leaf light environment. **Plant Cell Physiol.**, v. 26, p. 781-785. 1985b.
- TERASHIMA, I. & SAEKI, T. A new model leaf photosynthesis incorporating the gradients of light environment and photosynthetic properties of chloroplasts within a leaf. **Ann. Bot.**, v. 56, p. 489-499. 1985.
- TERASHIMA, I. & SAEKI, T. Light environment within a leaf. I. Optical properties of paradermal sections of *Camellia* leaves with special reference to differences in the optical properties of palisade and spongy tissues. **Plant Cell Physiol.**, v. 24, p. 1493-1501. 1983.
- TERASHIMA, I. Productive structure of a leaf. In: **Photosynthesis-Proceedings of the C. S. French Symposium on Photosynthesis**. Stanford, California, July 17-23. 1988.
- TERZAGHI, W. B. & CASHMORE, A. R. Light-regulated transcription. **Ann. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.** v. 46, p. 445-74. 1995.
- VERNON, L. P. Spectrophotometric determination of chlorophylls and pheophytins in plant extracts. **Anal. Chemistry**, New York, v.32, p. 1144-50. 1960.