**ANÁLISE DE CRESCIMENTO, PRODUÇÃO DE BIOMASSA,
FOTOSSÍNTESE E BIOSÍNTESE DE AMINOÁCIDOS EM
PLANTAS TRANSGÊNICAS DE TABACO (*Nicotiana tabacum* L.)
QUE EXPRESSAM O GENE *Lhcb1*2* DE ERVILHA**

MARCELO RIBEIRO ROMANO

Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura “Luiz de Queiroz”,
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Ciências, Área de
concentração: Fisiologia e Bioquímica de
Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Novembro - 2001

**ANÁLISE DE CRESCIMENTO, PRODUÇÃO DE BIOMASSA,
FOTOSSÍNTESE E BIOSÍNTESE DE AMINOÁCIDOS EM
PLANTAS TRANSGÊNICAS DE TABACO (*Nicotiana tabacum* L.)
QUE EXPRESSAM O GENE *Lhcb1*2* DE ERVILHA**

MARCELO RIBEIRO ROMANO
Engenheiro Agrônomo

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

Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura “Luiz de Queiroz”,
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Ciências, Área de
concentração: Fisiologia e Bioquímica de
Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Novembro - 2001

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

Romano, Marcelo Ribeiro

Análise de crescimento, produção de biomassa, fotossíntese e biossíntese de aminoácidos em plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) que expressam o gene *Lhcb1**2 de ervilha / Marcelo Ribeiro Romano. - Piracicaba, 2001.
66 p. : il.

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

1. Açúcares. 2. Biomassa 3. Bioquímica vegetal 4. Biossíntese 5. Fotossíntese 6. Fumo transgênico I. Título

CDD 633.71

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

*Aos meus pais, Jorge e Mariza, pelo amor e educação e aos meus irmãos, André Luiz,
Angelina, Jorge, Ricardo e Anna Paula, pela amizade*

OFEREÇO

*À minha linda esposa Anne, pelo amor, paciência e apoio nos momentos difíceis e à
minha filha Amanda e ao meu filho que está por nascer, motivos da minha vida*

DEDICO

*“A força que através do verde conduz a flor também comanda minha juventude; aquela
que arranca as raízes das árvores destrói a mim”*

(Dylan Thomas)

AGRADECIMENTOS

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

Ao Professor Dr. Antônio Augusto Lucchesi (*in memorian*), pela escolha e confiança, durante o processo seletivo de ingresso ao curso.

Ao Professor Dr. Ricardo de Oliveira Ferraz, pelo apoio e disponibilização dos equipamentos do laboratório de Plantas Cultivadas Sob Condições de Estresse .

Aos professores do curso de Fisiologia e Bioquímica de Plantas da ESALQ-USP, pelos ensinamentos e abertura de novos horizontes.

Aos colegas do laboratório de Genética Fisiológica do Departamento de Genética da ESALQ/USP, em especial à Mônica Teresa Veneziano Labate pela amizade, convivência e paciência.

Ao Dr. Paulo Roxo Barja, pelos aconselhamentos, incentivos e ajuda na elaboração deste trabalho.

Ao químico Juliano Bragatto, pelo auxílio nas análises de aminoácidos.

Ao colega Altamir Frederico Guidolin, pelo apoio e suporte na área de informática.

Aos colegas do curso de Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, pela amizade e companheirismo.

À bibliotecária Eliana Maria G. Sabino, pela revisão das referências bibliográficas e sugestões para melhoria deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	viii
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Fotossíntese.....	4
2.1.1 PSII, LHCII, proteínas LHCPs.....	5
2.1.2 Fluorescência da clorofila <i>a</i>	6
2.2 Metabolismo do nitrogênio.....	9
2.2.1 Ciclo do nitrogênio fotorrespiratório.....	11
2.3 Regulação do metabolismo fotossintético e do carbono.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Caracterização das plantas transgênicas e selvagens.....	18
3.2 Condições de cultivo.....	19
3.3 Análise de crescimento quantitativo.....	19
3.3.1 Índices fisiológicos.....	20
3.3.1.1 Índice de área foliar (IAF).....	21
3.3.1.2 Taxa de crescimento absoluto (TCA).....	21
3.3.1.3 Taxa de crescimento relativo (TCR).....	21
3.3.1.4 Taxa de crescimento relativo da área foliar (TCR _{AF}).....	21
3.3.1.5 Taxa assimilatória Líquida (TAL).....	21
3.3.1.6 Razão de área foliar (RAF).....	22

3.3.1.7 Área foliar específica.....	22
4 Análise de trocas gasosas.....	22
3.5 Análise da fluorescência da clorofila <i>a</i>	23
3.6 Coleta do material para determinação de metabólitos e análises enzimáticas.....	25
3.7 Determinação do conteúdo de clorofila total.....	25
3.8 Medida da porcentagem de ativação da sacarose fosfato sintase	26
3.9 Medida da atividade da fosfoenolpiruvato carboxilase.....	27
3.10 Extração com ácido perclórico para a quantificação de metabólitos.....	27
3.10.1 Determinação do conteúdo de metabólitos.....	28
3.10.1.1 Determinação do conteúdo de ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA).....	28
3.10.1.2 Determinação do conteúdo de triose fosfato (TP) e frutose 1,6-bisfosfato...	28
3.10.1.3 Determinação do conteúdo de hexoses-fosfato.....	29
3.10.1.4 Determinação do conteúdo de fosfoenolpiruvato (PEP), piruvato e 2-PGA.....	29
3.10.1.5 Determinação do conteúdo de malato.....	30
3.10.1.6 Determinação do conteúdo de 2-oxoglutarato.....	30
3.10.1.7 Determinação do conteúdo de feofitina	30
3.11 Coleta de material para determinação de amido e sacarose.....	31
3.11.1 Determinação do conteúdo de amido em folhas.....	31
3.11.2 Determinação do conteúdo de sacarose em folhas.....	31
3.11.3 Determinação de amido nas sementes.....	32
3.12 Determinação dos aminoácidos solúveis.....	32
3.13 Delineamentos e análise estatística.....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1 Produção de biomassa e análise de crescimento.....	34
4.2 Conteúdo de aminoácidos.....	42
4.3 Assimilação de CO ₂ e fluorescência da clorofila <i>a</i>	45
4.4 Conteúdo de carboidratos e metabólitos.....	48
5 CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Å	angstrom
AA	aminoácidos
ADP	adenosina 5-difosfato
AGPase	ADPglucose pirofosforilase
Ala	alanina
AMP	adenosina 5-monofosfato
Arg	arginina
Asp	aspartato
Asn	asparagina
ATP	adenosina 5-trifosfato
CAB	chlorophyl a/b binding protein
CO ₂	gás carbônico
CR	centro de reação
DHAP	dihidroxiacetona –fosfato
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido tetra acético etilenodiamino
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
F6P	frutose 6-fosfato
Fru1,6bisP	frutose 1,6-bisfosfato
Fru2,6bisP	frutose 2,6-bisfosfato
FBPase	frutose 1,6-bisfosfatase
Fru6P,2-Quinase	frutose 6-fosfato2-quinase
GAP	gliceraldeído 3-fosfato

GAP-DH	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
G1P	glucose 1-fosfato
G6P	glucose 6-fosfato
Glu	glutamato
Gln	glutamina
Gly	glicina
GS (E.C. 6.3.1.2)	glutamina sintetase
Hepes	ácido N-2-hidroxietilpiperazine-N'2-etanosulfônico
His	histidina
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Precisão
KDa	kilodaltons
Ile	isoleucina
LHC	Complexo coletor de luz
Leu	leucina
Lys	lisina
MES	ácido 2-(N-morfolino)etanosulfônico
Met	Metionina
MoCo	Molibdênio-pterina
Mops-NaOH	ácido 3-(morfolino)propanosulfônico
NAD ⁺	dinucleotídeo adenina nicotinamida
NADH	dinucleotídeo adenina nicotinamida (reduzido)
NADP ⁺	dinucleotídeo adenina fosfato nicotinamida
NADPH	dinucleotídeo adenina fosfato nicotinamida (reduzido)
GDH (E.C. 1.4.1.2.)	glutamato desidrogenase
NiR (E.C. 1.7.7.1)	nitrito redutase
NR (E.C. 1.6.6.1)	nitrato redutase
NRK	nitrato redutase quinase
NO ₃ ⁻	nitrato
OAA	oxalacetato

PEP	fosfoenolpiruvato
PEPC	fosfoenolpiruvato carboxilase
Phe	fenilalanina
2PGA	ácido 2-fosfoglicérico
3PGA	ácido 3-fosfoglicérico
PGK	fosfoglicerato quinase
Pi	fosfato inorgânico
PMSF	fenilmetilsulfonil fluorido
PS	fotossistema
RUBISCO	ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase
RuBP	ribulose 1,5-bifosfato
Ser	serina
SPS	sacarose fosfato sintase
Thr	treonina
TP	triose fosfato
Tris	2-amino 2-(hidroximetil)propano 1,3-diol
Tyr	tirosina
UDP	uridina 5-difosfato
UDPG	uridina 5-difosfato glucose
Val	valina

ANÁLISE DE CRESCIMENTO, PRODUÇÃO DE BIOMASSA, FOTOSSÍNTESE E BIOSÍNTESE DE AMINOÁCIDOS EM PLANTAS TRANSGÊNICAS DE TABACO (*Nicotiana tabacum* L.) QUE EXPRESSAM O GENE *Lhcb12 DE ERVILHA**

Autor: Marcelo Ribeiro Romano

Orientador: Carlos Alberto Labate

RESUMO

A biomassa vegetal, seja como produto de interesse econômico ou do ponto de vista ecológico, é estritamente dependente do processo fotossintético. O advento das técnicas de biologia molecular e transformação genética de plantas trouxe boas perspectivas para a alteração do processo fotossintético, já que pouco foi conseguido com o melhoramento vegetal tradicional. Modificações genéticas nos LHCs (estruturas responsáveis pela captação e transferência da energia luminosa) mostram-se promissoras. Plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*, L.) que expressam o gene quimérico *Lhcb1**2 de ervilha têm sido estudadas por apresentarem uma série de alterações no metabolismo fotossintético, além de um ganho genético em relação à planta selvagem original. Vários autores observaram mudanças morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e adaptativas que favorecem estas plantas em diversas condições de cultivo. Diversos experimentos foram realizados no intuito de melhor caracterizar as plantas transformadas com o gene *Lhcb1**2 de ervilha. O potencial produtivo foi avaliado através da análise de crescimento e produção de massa seca. O

metabolismo fotossintético foi analisado através de medidas de assimilação de CO₂, fluorescência da clorofila *a*, metabólitos do ciclo de Calvin-Benson, glicólise e ciclo de Krebs, carboidratos (amido e sacarose) e aminoácidos. Os resultados obtidos mostram uma redução da taxa de fotorrespiração pelas plantas transgênicas. Esta redução promoveu o aumento do período de crescimento vegetativo e produção de biomassa, à semelhança do que ocorre em plantas cultivadas sob baixa pressão de oxigênio (5%) ou alto CO₂. Entretanto, ao contrário do que ocorre nessas condições, a produção de sementes e o peso nas linhagens transgênicas não foram reduzidos.

GROWTH ANALYSIS, BIOMASS PRODUCTION, PHOTOSYNTHESIS AND AMINO ACID BIOSYNTHESIS IN TRANSGENIC TOBACCO (*Nicotiana tabacum* L.) PLANTS OVER EXPRESSING THE PEA *Lhcb1*2* GENE

Author: Marcelo Ribeiro Romano

Adviser: Carlos Alberto Labate

SUMMARY

Plant biomass, seen either from the economic or the ecological points of view, is highly dependent upon photosynthesis. The development of molecular biology and genetic engineering techniques brought great perspectives for the improvement of the photosynthetic process, since few progress had been achieved with traditional plant breeding. Genetic alteration of the LHCs (structures responsible for the capture and distribution of radiant energy) seems promising. Transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum*, L.) over expressing the pea *Lhcb1*2* gene have been studied. They present several alterations in the photosynthetic metabolism which lead to a genetic improvement of them in relation to the original plant. Many authors observed morphological, physiological, biochemical and adaptative changes which were beneficial to these plants to diverse growing conditions. Several experiments were carried out in order to better characterize these transgenic tobacco lines. The potential for production was evaluated, via dry weight and growth rate. The photosynthetic metabolism was analyzed through CO₂ assimilation, chlorophyll fluorescence, metabolites of the Calvin-Benson, glycolysis and Krebs cycles, carbohydrates (starch and sucrose) contents and amino acids. The results obtained show a reduction in photorespiration rate in the

transgenic plants. Such reduction lead to on extension of the plant growing period and on enlargment of the biomass, similar to what occurs in plants growing under low O₂ (5%) or high CO₂ conditions. However, in contrast to what normally happens under these conditions, dry weight and seed production were not reduced in the transgenic lines.

1 INTRODUÇÃO

Embora a fotossíntese seja fundamental para a produtividade das plantas, diversos outros fatores modificam a magnitude da produtividade no campo, ocasionando as variações da produção de alimentos, fibras, forragens e outros produtos vegetais . A fim de nos beneficiarmos do processo fotossintético, devemos entender o mecanismo das reações primárias, eventos de membrana e a sua regulação enzimática. Com o advento das técnicas de biologia molecular e transformação genética de plantas, novas oportunidades para o aumento da produtividade das plantas foram abertas, mas para que todo o seu potencial possa ser explorado, um bom conhecimento da fotossíntese é exigido.

A relação quantitativa entre fotossíntese e produtividade vegetal deve ser considerada primeiramente. Para qualquer cultura, quatro fatores determinam o ganho líquido de produtividade (**P_n**): a quantidade de luz incidente (**Q**), a proporção de luz interceptada pelos órgãos verdes das plantas (**β**), a eficiência de conversão fotossintética da luz interceptada em biomassa (**ε**) e as perdas respiratórias da biomassa (**R**). Conforme a equação : **P_n = Qβε - R**. A equação sugere três possibilidades para que a produtividade possa ser incrementada. A quantidade de luz incidente (**Q**) é determinada pelo clima e então independe da cultura. Entretanto, os três fatores remanescentes podem ser modificados. As perdas respiratórias pela biomassa (**R**) para manutenção dos tecidos já existentes e crescimento de novos tecidos, constitui em uma importante limitação na produtividade. Pesquisas recentes têm mostrado diferenças significativas em (**R**) entre genótipos de plantas forrageiras, sugerindo um promissor potencial na seleção de genótipos com alta produtividade e máximo potencial de produção. A eficiência da interceptação da luz (**β**) é uma função do tamanho, estrutura e coloração do

dossel vegetal. Usualmente o aumento de produtividade das culturas conseguido está associado a um incremento na interceptação luminosa (aumento da área foliar e/ou duração foliar). A eficiência da conversão de energia (ϵ) é determinada diretamente pelo processo fotossintético e expressa a relação direta entre produtividade e fotossíntese. Na teoria, o aumento de ϵ é o mais atrativo meio de aumentar a produtividade e produção econômica. Se isto for alcançado através da seleção genética, um incremento na produtividade poderá ser atingido sem o aumento do "input" de fertilizantes, no qual, recentemente, a maioria dos aumentos de produtividade tem se baseado. Enquanto o aumento de $\epsilon_{\max}$ em condições ideais de cultivo é uma incerteza, há pouca dúvida de que o aumento de ϵ , em condições sub-ótimas, pode ser atingido. Muitos estresses ambientais são reconhecidamente responsáveis por ocasionar um decréscimo na eficiência de conversão da luz, pelo menos temporariamente. Em particular, danos por fotoinibição do mecanismo fotossintético, produzidos pela combinação de alta luz e baixa temperatura ou estresse hídrico, podem ser significativos (Hall & Long, 1993).

O ganho genético de produtividade tem sido alcançado por seleção de genótipos em que a maior proporção da produtividade é distribuída (partida) nos componentes de colheita, e não necessariamente pela seleção de plantas com a maior biomassa total. Duas importantes áreas para aumentos futuros da produtividade das culturas deve ser a identificação de genótipos e a geração de plantas transgênicas que apresentem maior eficiência da conversão de energia fotossintética (ϵ), e menor sensibilidade aos estresses ambientais. Para entender como a (ϵ) pode ser aumentada, um completo entendimento de todos os níveis do processo fotossintético é requerido. Isto inclui aspectos que vão desde a captação da energia luminosa pelas antenas coletoras de luz (LHC) nos fotossistemas, passando pela conversão da energia de excitação para energia química, prontamente utilizável pelas reações celulares, até a bioquímica de assimilação de carbono e nitrogênio, e conseqüente metabolismo.

Ko et al. (1992) obtiveram plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) superexpressando o gene quimérico *Lhcb 1*2* de ervilha, que codifica uma proteína CAB ("Chlorophyll a/b Binding Protein) do LHCII ("Light Harvest complex" do PSII). O LHCII é o complexo proteína-pigmento mais abundante da membrana do tilacóide de

plantas superiores e é não apenas um componente-chave para a coleta e transferência de energia luminosa, como 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 resultados encontrados por vários autores (Real, 1997; Pinto, 2000; Brito, 2001) mostram que estas plantas apresentam alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas quando comparadas às plantas selvagens. Essas alterações se configuram como modelos para avaliação das correlações existentes entre a produtividade vegetal em determinada condição ambiental e aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos envolvidos na fotossíntese. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram:

- 1) Caracterizar as plantas quanto à produtividade vegetal, através de índices fisiológicos e morfológicos utilizados na análise de crescimento quantitativo de plantas;
- 2) Avaliar a dinâmica diária dos níveis de carboidratos (amido e sacarose) em tecido foliar de plantas crescidas em câmaras de crescimento sob intensidade luminosa intermediária;
- 3) Estudar as interações entre fotossíntese e os metabolismos do carbono (C) e nitrogênio (N) em plantas cultivadas em intensidade luminosa intermediária ($250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e analisadas em alta luz ($1200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e alto CO_2 (800 ppm) através dos níveis de metabólitos e atividade enzimática envolvidos nos ciclos de Calvin, glicólise e metabolismo de N.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fotossíntese

A vida na terra, em última instância, depende da energia fornecida pelo sol. A fotossíntese é o único processo biológico capaz de coletar esta energia. O termo fotossíntese significa literalmente "síntese pela luz". Os organismos fotossintéticos utilizam energia solar para sintetizar compostos orgânicos que não poderiam ser formados sem a captação de energia. A energia armazenada (quimicamente) na forma destes compostos pode ser usada posteriormente nas reações celulares das plantas, servindo também como fonte de energia para todas as demais formas de vida.

O mesofilo foliar é o tecido de maior atividade fotossintética em plantas superiores. As células do mesofilo contêm muitos cloroplastos, e neles estão os pigmentos verdes especializados na absorção de luz, as clorofilas. Na fotossíntese a planta usa energia solar para oxidar a água, resultando na evolução de O_2 e na redução de dióxido de carbono a carboidratos e açúcares primários. A complexa série de reações que culmina na redução de CO_2 pode ser dividida em duas fases: fotoquímica e bioquímica. A fase fotoquímica da fotossíntese acontece nas membranas internas do cloroplasto chamadas de tilacóides. Os produtos finais das reações dos tilacóides são o ATP e NADPH, compostos ricos em energia que são usados para a síntese de açúcares nas reações de fixação de carbono. Esta fase bioquímica de síntese acontece no estroma dos cloroplastos, uma região aquosa que circunda os tilacóides.

2.1.1 PSII, LHCII e proteínas LHCPs

As membranas dos tilacóides acomodam mais de cinquenta tipos de polipeptídeos (Westhoff et al, 1988), que estão organizados em quatro complexos supra-moleculares: fotossistema I (PSI), fotossistema II (PSII), citocromo *b₆f* e ATP sintase. Estes complexos apresentam uma distribuição definida ao longo da membrana para realizar adequadamente a coleta de luz e sua distribuição, o transporte vetorial de elétrons e prótons e a formação de ATP e NADPH (Foyer, 1984; Andersson & Styring, 1992).

O PSII de plantas superiores é composto de um complexo central (CCII) e um complexo coletor de luz (LHCII) (Andersson & Styring, 1992; Chitnis & Thornber, 1988; Thornber, 1986). O CCII atua na captação parcial da luz e na fotoquímica da separação de cargas usando o P680 como o doador primário no centro de reação. O LHCII serve como uma antena acessória para a coleta de luz e afunilamento desta energia para o P680 (Thornber, 1986).

O complexo CCII contém no mínimo 14 polipeptídeos (*PsbA-PsbP*), 60 moléculas de clorofila *a*, 2 feofitinas e 10-12 β -carotenos (Andersson & Styring, 1992). Duas proteínas do CCII, CP47 e CP43, contêm clorofila *a* e servem como uma antena interna do centro de reação do PSII. O centro de reação do CCII contém as proteínas D1 e D2, duas subunidades de Cyt *b₅₅₉* e a subunidade *PsbI* de baixo peso molecular (Barber et al., 1987; Nanba & Satoh, 1987).

O LHCII, a antena acessória do PSII, é composto por vários complexos proteína-clorofila, que são denominados de LHCIIa, LHCIIb, LHCIIc e LHCII d (Chitnis & Thornber, 1988). As apoproteínas do LHCII, denominadas LHCPs -"light harvesting chlorophyll *a/b* binding protein", anteriormente conhecidas como CAB- são codificadas por famílias de multigenes nucleares. Análises para caracterização das seqüências primárias das apoproteínas do LHCII indicam que estas proteínas contêm 3 domínios na extensão das membranas dos tilacóides, com a região amino-terminal da proteína exposta ao estroma do cloroplasto e a carboxi-terminal no lúmen do tilacóide (Chitnis & Thornber, 1988; Karlin-Neumann et al., 1985). O LHCIIb é o principal complexo

clorofila-proteína do LHCII, reunindo aproximadamente 43% do total de clorofilas e 30% do total de proteínas das membranas. Na membrana do tilacóide este complexo existe predominantemente como um trímero, contendo no mínimo três apoproteínas de 25-27-28 KD (Peter & Thornber, 1991). Os genes que codificam as apoproteínas do LHCIIb (*Lhcb 1,2,3*) já foram isolados de muitas espécies e sua expressão já está bem caracterizada (Chitnis & Thornber, 1988; White et al., 1992). A expressão gênica do LHCIIb é regulada em parte pelo fitocromo (Silverthorne & Tobin, 1984). Três outros componentes do LHCII (LHCIIa, LHCIIc e LHCIIId codificados pelos genes *Lhcb4*, *Lhcb5* e *Lhcb6*, respectivamente) estão associados com o PSII. Além da função de antena acessória do PSII, o LHCIIb está envolvido no empilhamento dos tilacóides para formar as regiões da lamela granar. Além disso, a fosforilação do LHCIIb está relacionada com a distribuição da energia de excitação absorvida entre os dois fotossistemas, isto é, a transição estado I-estado II (Allen et al., 1981). Recentemente a estrutura tridimensional do LHCII foi caracterizada pela análise de cristalografia com resolução de 3,4 Å. A partir da análise cristalográfica, a composição proposta para o LHCII tem 7 clorofilas *a*, 5 ou 6 clorofilas *b* e 2 moléculas de carotenóides (Kuhlbrandt et al., 1994).

2.1.2 Fluorescência da clorofila *a*

A energia luminosa é absorvida pelas moléculas de clorofila para a fotossíntese. Entretanto, parte da luz absorvida é perdida como calor ou emissão de fluorescência. A fluorescência que é medida na temperatura ambiente provém quase exclusivamente das clorofilas associadas às antenas do PSII. A fluorescência das clorofilas do PSII, entretanto, é muito variável. Ela é extremamente influenciada pelo estado fisiológico do vegetal, podendo assim ser utilizada como técnica de sensoriamento remoto de coberturas vegetais ou para prever a fixação fotossintética de CO₂ (Rodrigues, 1998). Um fóton de 670 nm (luz vermelha) contém energia suficiente para a molécula de clorofila atingir o primeiro estágio excitado, denominado singlete 1. A molécula de clorofila excitada é estável por menos de 10⁻⁹ s (Bolhàr-Nordenkamp & Oquist, 1993). Os estados excitados que são formados pela absorção da luz podem decair por 4

processos: a) Conversão da energia de excitação em energia fotossintética, que requer a transferência de energia para o centro de reação e subsequente transporte de elétrons seguido de interação com o PSI; b) Formação de estados tripleto; c) Processos não radiativos como liberação de calor e d) Fluorescência.

A emissão de fluorescência fornece informações sobre os processos fotoquímicos do PSII. Sob condição de baixa luz, ao redor de 95% dos fótons absorvidos são usados na fotoquímica, 4,5% são transformados em calor e 0,5% são re-emitidos como luz fluorescente. Se todos os centros de reação do PSII estiverem fechados por um bloqueio da fotossíntese, 95-97% da energia pode ser dissipada como calor e 2,5-5,0% via fluorescência (Bolhàr-Nordenkampf & Oquist, 1993).

A relação inversa entre fluorescência 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 uma atenuação (o denominado "quenching"). Normalmente a extensão do "quenching" é expressa por coeficientes que variam de 0 a 1, indicando a proporção atenuada da fluorescência máxima (Krause & Weis, 1991). A fluorescência basal ou mínima (F_0) é a fluorescência medida quando todos os centros de reação estão abertos. A fluorescência máxima (F_m) é a fluorescência quando todos os centros de reação estão fechados. A fluorescência variável (F_v) é determinada pelo estado do centro de reação (aberto ou fechado), e é definida como a diferença entre F_m e F_0 , ou seja, $F_v = F_m - F_0$. O estado dos centros de reação é influenciado por fatores ambientais como luz, condição nutricional, poluentes, salinidade e hidratação.

A indução da fluorescência modulada fornece informações sobre os efeitos transitórios que ocorrem na escala de minutos. A técnica consiste em aplicar, em uma folha adaptada ao escuro, um feixe de luz modulada de baixa intensidade para excitar as moléculas de clorofila mantendo todos os centros de reação abertos. A fluorescência detectada quando somente a luz de baixa intensidade é aplicada corresponde à

fluorescência basal (F_0). Para determinar-se a fluorescência máxima (F_m), aplica-se um pulso de luz de altíssima intensidade ($5 - 20.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de forma a fechar todos os centros de reação.

A partir desta técnica, cinco parâmetros podem ser calculados (Genty et al., 1989) :

a) Atenuação fotoquímica, q_p . A atenuação fotoquímica da fluorescência é causada pela transferência de energia dos estados excitados para os centros 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 o nível de redução da Q_A .

b) Atenuação não-fotoquímica, q_N . A atenuação não-fotoquímica engloba todos os processos de supressão de fluorescência que não estão relacionados com a fotoquímica. Envolve principalmente os processos dissipativos não radiativos, que são induzidos durante a iluminação do cloroplasto. Acompanhando a cinética de relaxamento da atenuação não-fotoquímica, a mesma pôde ser resolvida em três componentes, um de decaimento rápido, um de decaimento médio e o terceiro de decaimento lento. O componente de decaimento rápido foi identificado como sendo a atenuação não-fotoquímica induzida pela formação do gradiente de pH entre o lúmen do tilacóide e o estroma e pela síntese de zeaxantina. Ela é chamada de atenuação não-fotoquímica dependente de energia (q_E). Os componentes de decaimento médio e lento foram relacionados respectivamente à transição de estado (q_T) e a fotoinibição (q_I). A supressão não-fotoquímica é definida como o decréscimo normalizado do rendimento máximo de fluorescência em relação à situação da planta adaptada ao escuro, isto é, o quanto F_v' é menor que F_v ($F_v' = F_m' - F_0'$ e $F_v = F_m - F_0$) (Quick & Stitt, 1989).

c) Máximo rendimento quântico do PSII, F_v/F_m . Este parâmetro reflete a máxima capacidade fotoquímica e se relaciona com o número de complexos PSII ativos. O máximo rendimento fotoquímico é um bom indicador da fotoinibição. O fotodano do centro de reação resulta em uma diminuição do valor de F_v/F_m (faixa normal 0,75-0,85).

d) Eficiência quântica do PSII, (Φ_{PSII}). Φ_{PSII} é determinada pelo produto da fração de centros de reação abertos (q_p) pela eficiência de captura da energia de excitação pelos centros de reação abertos (F_v'/F_m'). Este último fator implica na ocorrência de dissipação de energia não-radiativa pelo sistema antena (Butler, 1978).

e) Taxa de Transporte Linear de Elétrons, ETR. ETR está relacionado diretamente com a resposta do Φ_{PSII} à determinada densidade de fluxo de fótons (PFD). A fórmula de cálculo é dada por: $ETR = PFD \times \Phi_{PSII} \times 0,84 \times 0,5$. O valor constante 0,84 é relativo à absorção de 84% da luz incidente e 0,5 porque na fotorreação estão envolvidos dois elétrons.

2.2 Metabolismo do Nitrogênio

O nitrogênio (N) é um dos mais limitantes fatores para o crescimento de plantas e, com exceção do dióxido de carbono (CO_2), é o nutriente mais requerido para o crescimento das plantas (Fernandes & Rossiello, 1995). O fornecimento adequado de N é necessário para a síntese de grande número de compostos vitais para a célula vegetal, como: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, poliaminas, clorofila e outros constituintes celulares (Ruiz et al., 1999 ; Lea, 1993). Apesar do N molecular (N_2) compor mais de 78 % da atmosfera, este não reage quimicamente em condições normais e só é utilizado por poucas espécies de plantas (principalmente leguminosas) que podem se associar simbioticamente com organismos fixadores de N_2 (Tischner, 2000).

A assimilação do nitrogênio em plantas superiores está intimamente ligada ao metabolismo de carbono (C). Tanto os esqueletos de C quanto o poder redutor (na forma de ferredoxina reduzida) produzidos pela fotossíntese são usados na assimilação de N inorgânico (Foyer, 1996).

Nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) são as maiores fontes de nitrogênio inorgânico absorvidas pelas raízes das plantas (Marschner, 1995). A maior parte do NH_4^+ na planta deve ser incorporada a compostos orgânicos já na raiz, pois não pode ficar livre nas células, uma vez que a amônia (NH_3), resultante da reação do NH_4^+ com OH^- , é tóxica, causando desacoplamento dos processos de fosforilação. As membranas cloroplástica e

mitocondrial são bastante permeáveis à amônia. Já o NO_3^- pode circular rapidamente na planta através do xilema e ser acumulado no vacúolo de células de raiz, parte aérea e órgãos de reserva, sem causar danos à planta, podendo então ser estocado para posterior utilização (Ritcher, 1993; Fernandes & Rossiello, 1995). A absorção de NO_3^- é ativa contra o potencial eletroquímico em um simporte associado à entrada de H^+ (Mc Clure et al., 1990).

O nitrato absorvido pode ser acumulado no vacúolo para posterior utilização, mas, para sua assimilação e utilização, precisa ser reduzido a NH_3 e então incorporado em compostos orgânicos (Pimentel, 1998). A redução do nitrato à amônia é mediada por duas enzimas: nitrato redutase (NR, EC 1.6.6.1), que catalisa a reação de redução do nitrato a nitrito com participação de 2 elétrons, e nitrito redutase (NiR, EC 1.7.7.1), que catalisa a redução de nitrito à amônia com a participação de 6 elétrons (Marschner, 1995). Em plantas superiores, essa redução do NO_3^- ocorre principalmente nas células verdes, onde a nitrato redutase se localiza no citoplasma e a nitrito redutase no cloroplasto. A fonte de elétrons, dependendo da enzima e do tipo de tecido, pode ser o nucleotídeo de pirimidina reduzido (NAD(P)H) (produzido pela fotossíntese ou oxidação de carboidratos) ou ferredoxina reduzida (produzida pela fotossíntese) (Lindblad & Guerrero, 1993).

A assimilação do nitrato em células fotossinteticamente ativas consome uma significativa fração do poder redutor gerado no processo fotossintético. Em microalgas e folhas jovens, com uma relação C/N abaixo de 10, a proporção de elétrons usados na assimilação do nitrato pode representar 25 % do requerido para a fixação de CO_2 . Em tecidos de folhas sem iluminação e em tecidos não verdes, como raízes, o poder redutor necessário para as reduções de nitrato e nitrito é fornecido pela oxidação de carboidratos (Lindblad & Guerrero, 1993).

A amônia presente na planta pode ser oriunda de vários processos: a) absorção de NH_4^+ pelas raízes ; b) redução de NO_3^- ; c) processo fotorrespiratório; d) metabolismo de proteínas e subsequente desaminação e e) síntese de lignina (Lea & Blackwell, 1993). Os primeiros resultados de pesquisa demonstraram a enzima glutamato desidrogenase (GDH, EC 1.4.1.2) como a responsável pela incorporação da amônia em compostos

orgânicos. Estudos recentes sugerem que a enzima opera na direção de quebra do glutamato, liberando 2-oxoglutarato requerido pelo ciclo de Krebs. Duas enzimas são consideradas chaves no processo de assimilação de amônia, a glutamina sintetase (GS, EC 6.3.1.2) e a glutamato sintase (GOGAT- glutamina-2-oxoglutarato aminotransferase). Ambas as enzimas podem ser encontradas em cloroplastos e em raízes. A GS, com alta afinidade por amônia, catalisa a primeira reação de assimilação, onde o glutamato é o receptor inicial para a NH_3 . O produto da reação é a formação de uma molécula de glutamina, com o consumo de ATP. Em seguida a GOGAT catalisa a transferência do grupamento amina ($-\text{NH}_2$) da glutamina para um 2-oxoglutarato, proveniente do ciclo de Krebs. A reação consome poder redutor (ferredoxina reduzida ou NADPH) e resulta na formação de duas moléculas de glutamato. Uma molécula de glutamato é requerida para a manutenção do ciclo e a outra pode ser exportada para sítios de assimilação, atuando como substrato para outros aminoácidos ou síntese de proteínas (Marschner, 1995; Lea & Blackwell, 1993).

2.2.1 Ciclo do nitrogênio fotorrespiratório

Fotorrespiração é um processo que ocorre predominantemente em plantas C_3 e que tem início com a atividade oxigenase da rubisco (ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase, EC 4.1.1.39). Em plantas crescidas sob condições atmosféricas normais, a 25 °C, existe uma relação de carboxilação para oxigenação pela rubisco da ordem de 3:1. O 2-fosfoglicolato é o primeiro produto formado pela oxigenação da ribulose 1,5-bisfosfato no cloroplasto. As enzimas fotorrespiratórias em plantas catalisam uma série de conversões metabólicas do 2-fosfoglicolato que ocorrem sequencialmente em três organelas: cloroplastos, peroxissomas e mitocôndrias (Lam et al., 1996).

A reação mais importante do ciclo é a conversão de duas moléculas de glicina em serina, com liberação de CO_2 e amônia. O CO_2 é perdido para a atmosfera, mas a amônia que é liberada pela reação na mitocôndria passa diretamente para o cloroplasto. A amônia é reassimilada rapidamente pelas enzimas do ciclo GS-GOGAT (Lea et al., 1978; Lea et al., 1990; Lea & Blackwell, 1993;). Em plantas C_3 , a amônia liberada

através da fotorrespiração pode exceder em dez vezes a amônia resultante da assimilação de nitrato (Keys et al., 1977).

As mitocôndrias de folhas de plantas contêm altos níveis de glutamato desidrogenase (GDH) e vários trabalhos sugerem que a enzima tem papel importante na reassimilação da amônia fotorrespiratória (Yamaya & Oaks, 1987). Posteriormente, Yu & Woo (1988) propuseram que a amônia liberada na mitocôndria é reassimilada no citosol de folhas de plantas que possuem a isoforma citosólica da glutamina sintase. A glutamina então formada pode ser transportada para o cloroplasto e sofrer novas reações.

As evidências da importância da fotorrespiração na produção de amônia têm sido obtidas através do uso de plantas C_3 mutantes (cevada, ervilha, *Arabidopsis*) que perderam uma ou mais das 11 enzimas do ciclo do N fotorrespiratório. Estas plantas têm a capacidade de crescer normalmente sob elevados níveis de CO_2 , quando a rota fotorrespiratória não está operando. Entretanto, quando as plantas são transferidas para condições atmosféricas normais, ocorre uma rápida queda na taxa de assimilação de CO_2 em resposta aos danos provocados pela desregulação do ciclo fotorrespiratório (Lea, 1993).

2.3 Regulação do metabolismo fotossintético e do carbono

A luz absorvida pela folha é usada para desenvolver gradientes de energia livre que são acoplados a numerosos processos. Estes incluem fixação de CO_2 , fotorrespiração e outras rotas metabólicas e reações dependentes da luz, como a reação de Mehler. O evento fotoquímico primário da fotossíntese é a separação de cargas nos centros de reação dos fotossistemas I e II (PSI e PSII). A separação de cargas resulta no acúmulo de espécies moleculares reduzidas e oxidadas que são a força motriz para o transporte de elétrons fotossintético. O fluxo de elétrons através da cadeia fotossintética de transporte eletrônico é acompanhado pelo fluxo de prótons (H^+). Essa associação resulta no estabelecimento de duas forças que fazem a ligação entre o transporte de elétrons (membrana do tilacóide) e o metabolismo estromal: a diferença de potencial eletroquímico transtilacoidal gerado pelo gradiente de prótons (ΔpH) e o estado redox do "pool" de ferredoxina (Genty & Harbinson, 1996). O gradiente de prótons é a força

motriz para a síntese de ATP (Ort & Melandri, 1981) e modula o transporte de elétrons (Horton & Lee, 1985). O estado redox do "pool" de ferredoxina é a força motriz para a redução de NADPH e, via tiorredoxina, para a ativação de enzimas no estroma (Foyer, 1993), e pode ser importante na modulação de ΔpH (Schreiber et al., 1991). Entretanto os gradientes redox gerados na cadeia transportadora de elétrons fotossintética também podem apresentar conseqüências negativas, levando à perda da eficiência fotoquímica e em alguns casos eles podem acarretar danos aos centros de reação, como a fotoinibição do PSII (Genty & Harbinson, 1996).

A maioria das plantas usa a via C_3 da fotossíntese, também chamada ciclo de redução do carbono fotossintético (PCR) ou ciclo de Calvin-Benson. Plantas C_3 apresentam um único tipo de cloroplasto onde ocorrem todas as reações que convertem a energia luminosa em energia química, que é usada para fixar CO_2 e sintetizar compostos de carbono reduzido necessários para todos os seres vivos. A enzima Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) cataliza a primeira reação de fixação de carbono, em que um açúcar-fosfato de cinco carbonos, ribulose 1,5-bisfosfato (RuBP), e CO_2 são convertidos a duas moléculas de três carbonos, o 3-fosfoglicerato (3-PGA). O Fosfoglicerato é então fosforilado e reduzido pelos produtos das reações fotoquímicas da fotossíntese (ATP e NADPH) para produzir trioses fosfato (TP). TP pode ser exportado para o citosol, via transportador de fosfato que faz o antiporte de fosfato inorgânico (P_i) para o cloroplasto. No citosol, a TP é usada para a síntese de sacarose que pode facilmente carregada no floema e dali seguir para qualquer região de dreno da planta. TP também pode ser retida dentro do cloroplasto para a síntese de amido ou reciclagem de RuBP. O ciclo de Calvin-Benson então é dividido em três fases: a fase de carboxilação catalizada pela Rubisco gerando 3-PGA, a fase de redução do 3-PGA formando TP e a fase de regeneração de RuBP, o receptor da molécula de CO_2 (Sonnewald et al., 1994; Furbank & Taylor, 1995).

Sob baixa luz a fotossíntese pode proceder com máxima eficiência quântica; esta eficiência quântica vai diminuindo com o incremento da luminosidade (Baker & Ort, 1992). Com o aumento da intensidade luminosa, em condições atmosféricas, a fixação

de CO_2 passa da região de luz limitante para a de luz saturante, em que a taxa de fotossíntese é limitada por fatores fisiológicos (Farquhar et al., 1980).

As análises da fixação de CO_2 em vários níveis da concentração interna de CO_2 (C_i) produziram informações sobre a limitação da fixação de CO_2 nas folhas. Baseado nas propriedades cinéticas da Rubisco, atribuiu-se à atividade da Rubisco a limitação em baixas concentrações internas de CO_2 e a regeneração de RuBP em altas concentrações internas de CO_2 (von Caemmerer & Farquhar, 1981). Embora a limitação da regeneração de RuBP seja atribuída à limitação no transporte de elétrons, ela também pode ser limitada pela atividade do dreno ou pelas reações do ciclo de Calvin-Benson (Stitt, 1991). O oxigênio (O_2) atua como um inibidor da fixação de CO_2 , pois compete pelo RuBP, gerando o processo fotorrespiratório. O tamanho do incremento na taxa de fixação de CO_2 com a eliminação da fotorrespiração dependerá da extensão dos fatores limitantes para a fixação de CO_2 . Estas limitações podem estar no próprio cloroplasto, sendo então diretamente associadas ao processo fotossintético como o suprimento de ATP e NADPH e o estado de ativação da Rubisco. A fixação de CO_2 também pode ser restringida pelo metabolismo de carboidrato no citosol da célula e pelos processos supracelulares de transporte de carboidratos, quando existe baixa atividade nas regiões de dreno dos fotoassimilados (Bel, 1992).

A fotossíntese inclui outros processos além da fotorrespiração e da fixação de CO_2 . A redução de nitrato e nitrito, redução de sulfato, biossíntese de aminoácidos e lipídeos são todos importantes processos metabólicos dependentes da luz. A reação de Mehler é um processo não metabólico em que o oxigênio molecular (O_2) é diretamente reduzido pelo transporte fotossintético de elétrons. Esta reação pode ocorrer em taxas de 1 a 10 % da taxa de fixação do CO_2 (Robinson, 1988). No entanto, a fixação de CO_2 e fotorrespiração, em folhas maduras, são os processos que mais influenciam na taxa de transporte de elétrons. Em condições que levam ao fechamento dos estômatos, a fotorrespiração é o dreno predominante dos equivalentes redutores (Cornic & Briantais, 1991).

Análises da eficiência quântica fotoquímica do PSI (Φ_{PSI}) e PSII (Φ_{PSII}) demonstram o declínio de Φ_{PSI} e Φ_{PSII} com o aumento da luminosidade. Esta resposta é

de ocorrência generalizada em tecidos, células e organelas fotossintéticas. Em alta luminosidade existe uma maior perda do Φ_{PSII} em comparação ao Φ_{PSI} . A perda de Φ_{PSII} está associada com a redução da Q_A , implicando em uma superexcitação do PSII em relação ao PSI. O incremento da oxidação do P_{700} com o aumento da luminosidade, mantidas estáveis as demais condições, indica que a limitação do transporte de elétrons é exercida no lado doador do PSI (Genty et al., 1990). Baseado no acompanhamento do estado de redução do "pool" de plastoquinonas, em cloroplastos e algas, Haehnel (1984) demonstrou que o passo limitante do transporte de elétrons é a redução do complexo citocromo *b₆f* pela plastoquinona reduzida (PQH_2), que têm consequências importantes para a operação do transporte de elétrons. Um efeito deste controle, sob alta luz, é o suprimento adequado de poder redutor para o estroma visando minimizar a taxa de produção de superóxido pela reação de Mehler. A taxa desta reação aumenta proporcionalmente ao aumento de ferredoxina e outros transportadores de elétrons do estroma. Radicais superóxido produzidos pela reação de Mehler são considerados as maiores fontes de estresse para sistemas fotossintéticos aeróbicos (Robinson, 1988).

O estabelecimento de forças diretivas pelo transporte de elétrons pode estimular a atividade metabólica, ou retroinibir a atividade do transporte de elétrons fotossintético. A força diretiva para a redução fotossintética do carbono é uma função da razão $[\text{NADPH}]/[\text{NADP}]$ e $[\text{ATP}]/[\text{ADP}][\text{Pi}]$ (Gerst et al., 1994). O incremento na força diretiva metabólica irá, por um lado, tender a produzir decréscimo de Φ_{PSI} e Φ_{PSII} , e por outro lado, aumentar o estado de ativação das enzimas do estroma. É o balanço entre processos de alimentação e retroinibição que determinará a eficiência da fotossíntese.

A cinética de ativação das enzimas frutose 1,6-bisfosfatase (FBPase) e sedoheptulose 1,7-bisfosfatase (SBPase) do ciclo de Calvin-Benson pelo sistema ferredoxina-tiorredoxina está no aumento da afinidade destas enzimas pelo substrato (Stitt, 1996).

Existem duas grandes razões para que o produto final da fotossíntese seja regulado. Primeiro, para coordenar a síntese do produto final com a taxa de fotossíntese. Se as trioses fosfato são consumidas muito lentamente, a fotossíntese será inibida porque os intermediários fosforilados acumulam e a disponibilidade de Pi diminui no ciclo. Se

trioses fosfato são consumidas muito rapidamente, a fotossíntese é inibida porque o nível dos intermediários do ciclo de Calvin-Benson diminuem e RuBP não pode ser regenerado. Segundo, a partição dos fotossintatos entre as rotas de síntese de sacarose, amido e aminoácidos deve ser ajustada em resposta ao estado fisiológico da folha ou planta (Stitt, 1991).

O aumento da taxa de fotossíntese leva à estimulação da FBPase citosólica em decorrência do decréscimo na concentração do inibidor metabólito regulatório frutose 2,6-bisfosfato (Stitt, 1990) e à ativação da sacarose fosfato sintase (SPS, EC 2.4.1.14) pela desfosforilação da enzima (Huber & Huber, 1992). Em ambos os casos, o resultado é um incremento da afinidade pelo substrato. Esse mecanismo altera a taxa de síntese da sacarose, sem exigir grandes mudanças no equilíbrio da concentração dos metabólitos (Stitt et al., 1983). A concentração de frutose 2,6-bisfosfato e o estado de fosforilação da SPS são regulados por um ciclo. Frutose 2,6-bisfosfato é sintetizada via frutose 2,6-bisfosfato quinase e degradada via frutose 2,6-bisfosfato fosfatase. Com o aumento da taxa de fotossíntese, frutose 2,6-bisfosfato diminui porque frutose 2,6-bisfosfato quinase é inibida pelo aumento da relação PGA/Pi, que é um bom indicador do desbalanço entre fixação de CO₂ e reciclagem de Pi (Walker & Sivak, 1986). O acúmulo de sacarose na folha leva à desativação da SPS e um incremento de frutose 2,6-bisfosfato. Como resultado, ocorre uma menor exportação de TP pelo cloroplasto, acarretando uma menor reciclagem de Pi. A síntese de amido é estimulada pela ativação da ADP-glucose pirofosforilase por altos níveis de PGA. (Stitt, 1991).

Pode ser assumido que ocorre competição entre a síntese de sacarose e aminoácidos, pois a assimilação da amônia exige uma alta demanda por esqueletos de carbono. O fluxo de carbono entre ambas as rotas parece ser regulado via proteína quinase citosólica que modula a atividade de duas enzimas chave, SPS e fosfoenopiruvato carboxilase (PEPC, EC 4.1.1.31), por fosforilação. O próprio nitrato funciona como um sinal metabólico (Scheible et al., 1997). Ambas as enzimas respondem à fosforilação, entretanto, de maneira inversa : SPS é inativada e PEPC é ativada favorecendo a rota para síntese de aminoácidos. A alta atividade da PEPC é

requerida para realimentar com ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs que proporciona ácidos orgânicos para a assimilação primária da amônia (Champigny, 1995).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização das plantas transgênicas e selvagem

As plantas transformadas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), variedade Petit Havana SR1, foram obtidas via transformação genética por *Agrobacterium tumefaciens*. O gene quimérico foi uma fusão de duas sequências de DNA da ervilha. A primeira é uma sequência codificadora do peptídeo trânsito da subunidade menor da Rubisco (*rbcS*) visando o direcionamento da proteína para o cloroplasto. A segunda é uma sequência codificadora da porção madura da proteína LHC do gene *Lhcb* Tipo I (*Lhcb1**2). Ligado ao inserto, o gene *nptII* (resistência à canamicina) foi utilizado como marcador de seleção. Tanto o gene marcador de seleção (*nptII*) quanto o gene quimérico (*rbcS:Lhcb1**2) estão sob controle do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) (Pinto, 2000).

Dois transformantes foram selecionados (TR1 e TR2) pela capacidade de enraizamento e crescimento em meio contendo canamicina. Os transformantes selecionados foram transferidos para solo, autofecundados e então, obtidas as sementes T1. As plantas foram selecionadas com elevado conteúdo de mRNA *Lhcb1**2 de ervilha, por densitometria a laser. A integridade do transgene foi monitorada em todos os estágios por análises de endonucleases de restrição e por técnicas de hibridação de DNA. Foi medido também o aumento da proteína LHC das linhagens selecionadas em relação às plantas selvagens, através de marcação simultânea de “blots” com anticorpo contra a proteína 33 kDa 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 hibridações do

DNA genômico das linhagens TR1 e TR2 com sonda específica do gene *nptII*, 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 (Labate et al., 2002)¹.

As sementes transgênicas e selvagem de tabaco foram gentilmente cedidas pelo Prof. Kenton Ko, do Departamento de Biologia da Universidade de Queen's, Kingston, Canadá.

3.2 Condições de cultivo

As sementes de tabaco transgênico (TR1 e TR2) e da linhagem parental selvagem (WTSR1) foram semeadas em bandejas de isopor contendo substrato organo-mineral (Plantmax). Para as análises de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, atividade enzimática, metabólitos, carboidratos e aminoácidos aos cerca de 30 dias após a semeadura, as plantas foram transplantadas para vasos plásticos preenchidos com 1 litro de uma mistura vermiculita–Plantmax em proporções iguais. Os vasos foram mantidos em câmaras de crescimento controlado (Conviron PGW36) sob um regime fotoperiódico de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, fluxo luminoso de $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de 25°C. Para as análises de crescimento quantitativo, as plantas foram transplantadas aos 21 dias após a semeadura para vasos plásticos com volume de 3,5 litros. A mistura utilizada foi a mesma descrita acima. Estes vasos foram distribuídos em casa-de-vegetação provida de luz suplementar para perfazer um total de 16 horas de luz (fotoperíodo). As plantas de todos os experimentos foram fertirrigadas diariamente com solução nutritiva completa de Hoagland & Arnon (1950).

3.3 Análise de crescimento quantitativo

Ao longo do crescimento das plantas foram feitas amostragens para determinação de massa da matéria seca e área foliar. Foram efetuadas 4 amostragens espaçadas de 15 dias, aos 15, 30, 45 e 60 DAT (dias após o transplântio). Em cada amostragem foram cortadas 3 plantas de cada genótipo e separadas em folhas, caule e raiz. A área foliar foi estimada, no mesmo dia, utilizando um medidor fotoelétrico (LI-3000, Li-Cor). Cada

parte da planta foi seca em estufa com circulação forçada de ar entre 65°C a 70°C , até atingirem massa constante, que foi determinada posteriormente gravimetricamente. Aos 170 DAT, fase de maturação das sementes, a fertirrigação foi suspensa para finalizar o ciclo vegetal. No estágio de frutos secos, as plantas foram coletadas e separadas em folhas, caule e frutos. As folhas e caule tiveram secagem suplementar em estufa. Avaliou-se a massa da matéria seca total, número de frutos, rendimento de sementes por planta, número de sementes por fruto e massa de 1000 sementes.

Os valores primários de matéria seca da parte aérea (folhas+caule), em g planta^{-1} , e área foliar, em $\text{m}^2 \text{ planta}^{-1}$, mensurados nas amostragens, foram ajustados pelo método dos quadrados mínimos em relação ao tempo (DAT $\rightarrow$ t), método funcional (Radford, 1967). Entre as funções testadas, a melhor modelagem foi conseguida com a função exponencial polinomial do 2º grau, tanto para matéria seca da parte aérea quanto para área foliar.

Foi feito também um acompanhamento diário da área foliar dos três genótipos estudados pelo método não destrutivo descrito por Francis et al.(1969). Este método preconiza a determinação de um fator de forma para cada genótipo experimentado, obtido pela divisão da área foliar real pela área do retângulo formado pelo comprimento e largura das folhas, em amostras de folhas colhidas com diferentes idades. A área foliar foi determinada por meio do produto do comprimento e da largura das folhas, multiplicado pelo fator de forma 0,685, 0,675 e 0,684 para os genótipos TR1, TR2, WTSR1, respectivamente.

3.3.1 Índices fisiológicos

Pela determinação da área foliar e da massa seca total, em quatro amostragens espaçadas de 15 dias, foi possível determinar os índices fisiológicos descritos a seguir, com as suas respectivas fórmulas matemáticas, de acordo com vários textos dedicados à análise quantitativa do crescimento (Radford, 1967; Reis & Muller, 1979; Causton & Venus, 1981; Hunt, 1982; Magalhães, 1985; Pereira & Machado, 1987).

3.3.1.1 Índice de área foliar (IAF)

Calculou-se a relação da área foliar total da planta (m^2), por unidade de terreno (m^2) disponível para a planta:

$$IAF = AF/S$$

Em que: AF = área foliar total S = superfície do solo

3.3.1.2 Taxa de crescimento absoluto (TCA)

A TCA ($g\ dia^{-1}$) avalia a produtividade primária líquida. É o somatório das taxas de crescimento dos diversos componentes das plantas (Reis & Muller, 1979; Pereira & Machado, 1987).

$$TCA = (W_2 - W_1) / (t_2 - t_1)$$

Em que: W = massa seca total t = tempo em dias 1 e 2 = duas amostragens sucessivas

3.3.1.3 Taxa de crescimento relativo (TCR)

A TCR ($g\ g^{-1}\ t^{-1}$) expressa o incremento na massa de matéria seca, por unidade de massa inicial, em um intervalo de tempo (Reis & Muller, 1979). Para valores médios, usa-se:

$$TCR = (Ln\ W_2 - Ln\ W_1) / (t_2 - t_1)$$

Em que: Ln = logarítmo neperiano

3.3.1.4 Taxa de crescimento relativo da área foliar (TCR_{AF})

A TCR_{AF} ($dm^2\ dm^{-2}\ t^{-1}$) expressa o incremento de área foliar, por unidade de área inicial, num determinado intervalo de tempo. Para valores médios, usa-se:

$$TCR_{AF} = (Ln\ AF_2 - Ln\ AF_1) / (t_2 - t_1)$$

3.3.1.5 Taxa assimilatória líquida (TAL)

A TAL ($g\ dm^{-2}\ dia^{-1}$) representa a taxa de incremento da massa de matéria seca por unidade de área foliar existente na planta, assumindo que tanto AF como W, aumentam exponencialmente (Briggs et al., 1920). Para valores médios, usa-se:

$$TAL = [(W_2 - W_1) / (t_2 - t_1)] \times [(Ln\ AF_2 - Ln\ AF_1) / (AF_2 - AF_1)]$$

3.3.1.6 Razão de área foliar (RAF)

A RAF ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$) representa a relação entre a área foliar e a massa seca total da planta. É também chamado quociente de área foliar (Briggs et al., 1920).

$$\text{RAF} = (\text{AF} / \text{W})$$

3.1.1.7 Área foliar específica (AFE)

A AFE ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$) representa a relação entre a área foliar e a massa seca foliar total. A AFE indica a espessura ou densidade da folha.

$$\text{AFE} = (\text{AF} / \text{W}_F)$$

Em que : W_F = massa seca foliar total

3.4 Análise de trocas gasosas

A determinação da taxa fotossintética das plantas analisadas (TR1, TR2 e WTSR1) foi feita com auxílio de dois analisadores de gás infra-vermelho (ADC 225 MK3), que medem a taxa de absorção do CO_2 e a transpiração foliar. Os analisadores estão acoplados a uma câmara de alumínio, com duas aberturas, onde a folha a ser analisada é inserida. A parte superior dessa câmara possui um anel de acrílico transparente, por onde a radiação fotossinteticamente ativa (PAR) emitida por uma fonte de luz atinge a folha, e a abertura inferior é vedada com "Parafilm". A intensidade luminosa utilizada foi de $1200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. A temperatura da câmara foi mantida em 20°C através da circulação de água (circulador TE 184 Tecnal) pelas cavidades da câmara. O déficit de pressão de vapor de água do ar na 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 de água (ADC-WG602). Dessa forma, a temperatura da folha foi mantida ao redor de 25°C , monitorada por um Termopar (Ni-Ca) aderido à face inferior da folha. As medidas de fotossíntese foram feitas com uma concentração de 760 ppm de CO_2 , obtida com auxílio de um cilindro enriquecido de CO_2 e um diluidor de CO_2 (ADC-GD600). Todo o sistema descrito funciona acoplado a um equipamento de congelamento rápido de folhas ("freeze clamp"), que permite a paralisação instantânea do metabolismo celular, à temperatura de

-190 °C. Os discos foliares congelados foram acondicionados em saquinhos de alumínio individuais, e armazenados em nitrogênio líquido para posterior extração de enzimas e metabólitos

A determinação da taxa de assimilação do CO₂ por unidade de área foliar foi obtida comparando-se as concentrações de CO₂ na mistura gasosa anterior à entrada na câmara, e após a passagem pela folha. A taxa de assimilação de CO₂ pela folha foi determinada pela seguinte fórmula (von Caemmerer & Farquhar, 1981; Long & Hällgren, 1985) :

$$A=(f/S) \times \Delta CO_2 \times [(1-e_e/P)/(1-e_0/P)]$$

em que:

A: taxa de assimilação líquida de CO₂ por unidade de área foliar (μmol CO₂ .m⁻².s⁻¹);

S: área foliar (10⁻³ m²);

ΔCO₂: diferencial de CO₂ (ppm);

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

e₀: pressão parcial de vapor d'água após a câmara (Kpa);

P: pressão atmosférica (Kpa);

f: fluxo molar (mol.s⁻¹), definido por:.

$$f= F \times (1/22.4) \times [273,15/(273,15 + T)] \times (P/101,3) \times (1/60)$$

em que:

F: vazão do ar (l/min);

T: temperatura da câmara (°C).

3.5 Análise da fluorescência da clorofila *a*

As avaliações da fluorescência da clorofila *a* das plantas transgênicas e selvagens também foram realizadas na câmara de análise da fotossíntese. Para isso, na parte superior da câmara de análise fotossintética foi acoplada a fibra óptica do fluorômetro “Portable Chlorophyll Fluorometer” (PAM 2000, Hinz 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 da fluorescência da clorofila *a* pela superfície superior das folhas e, usando as terminologias e cálculos propostos por Vankooten & Snel, (1990). O fluorômetro foi conectado a um computador (Compaq 486), que permitiu o registro de todas as medidas e o monitoramento contínuo durante as análises.

Antes do início das análises, as plantas foram mantidas no escuro por um período de 30 minutos para completa oxidação dos componentes do sistema de transporte de elétrons; a seguir, os seguintes parâmetros foram determinados: F_0 , F_M , q_P , NPQ , Φ_{PSII} , e F_v/F_M .

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

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

$$q_P: F_M' - F_0 / F_M' - F_0$$

$$F_v'/F_M' : (F_M' - F_0')/F_M'$$

$$\Phi_{PSII}: q_P \times F_v'/F_M' = q_P \times (F_M' - F_0')/F_M'$$

$$q_N: (F_M - F_M')/F_M'$$

em que :

q_P : "quenching" fotoquímico ou atenuação fotoquímica da fotossíntese;

q_N : "quenching" não fotoquímico ou atenuação não-fotoquímica da fotossíntese;

Φ_{PSII} : eficiência quântica do transporte de elétrons pelo PSII;

$F_v = (F_M - F_0)$: 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 ao 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 ao 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.

3.6 Coleta do material para determinação de metabólitos e análises enzimáticas

Após as determinações da fluorescência da clorofila *a* e das taxas de fotossíntese pela análise de absorção de CO₂, o metabolismo da folha foi interrompido pelo sistema de congelamento rápido ("freeze clamp") acoplado à câmara de análise de trocas gasosas. Este sistema consiste de um pistão pneumático, localizado na parte inferior da câmara de análise e acionado por ar comprimido, onde é encaixado, segundos antes do acionamento da válvula, um cilindro de cobre (Ø 2,5 cm x 2,5 cm) previamente imerso em N₂ líquido (-190°C). Em frações de segundo, o cilindro de cobre rompe a membrana de "Parafilm" que sela a extremidade inferior da câmara, congelando a folha, que é então armazenada em envelopes de alumínio devidamente identificados e mantidos em nitrogênio líquido. Estes discos foliares congelados foram então usados para a determinação dos metabólitos e atividade das enzimas avaliados do ciclo de Calvin-Benson e da glicólise.

3.7 Determinação do conteúdo de clorofila total

O conteúdo de clorofila total foi determinado segundo a metodologia de Porra et al. (1989). O método se baseia na utilização de 50µl do extrato macerado antes da 1ª centrifugação, dissolvido em 950µl de acetona tamponada 80%, a pH 7,8. A solução foi mantida protegida da luz por algumas horas, para completa extração da clorofila, e então centrifugada à 14000 rpm por 5 minutos, momentos antes da leitura em espectrofotômetro. As leituras de absorbância foram feitas a partir do sobrenadante, contra um branco de acetona tamponada 80% em 663.6 e 646.6 nm.

$$\text{Clorofila total (} \mu\text{g/ml)} = [(7.93 \times A_{663.6}) + (19.53 \times A_{646.6})]$$

3.8 Medida da porcentagem de ativação da sacarose fosfato sintase (EC 2.4.1.14)

Para a medida do percentual de ativação da enzima SPS foi necessária a realização de ensaios para determinar as atividades máxima ($V_{\max}$) e mínima ($V_{\lim}$) da enzima, de acordo com a metodologia modificada de Weiner et al. (1992) e Cheikh & Brenner (1992). O material vegetal na forma de discos foliares foi obtido na câmara de trocas gasosas através do sistema "freeze clamp". Os discos de 5 cm² foram macerados em cadinhos previamente resfriados inicialmente com 10 mg de PVPP em N₂ líquido até completa pulverização. Uma segunda maceração foi feita em N₂ líquido com 1,3 mL de tampão de extração composto por 50 mM de Mops-NaOH pH 7,5; 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2,5 mM DTT, 0,1% (v/v) Triton X-100, 0,35 mM PMSF, 2 mM benzamidina, 2 mM ácido amino copróico, 10% (v/v) glicerol. Do extrato bruto resultante foram retiradas duas alíquotas de 50 µl para análise de clorofila e o restante foi centrifugado a 12.000g por 5min a 4 °C. O sobrenadante foi desanilizado em coluna Sephadex G-25 (1 x 5 cm) equilibrada com o tampão de extração menos Triton X-100 e Glicerol, em câmara fria. O extrato desanilizado foi coletado em microtubos de 1,5 mL e mantidos no gelo até o ensaio de atividade.

A atividade da SPS foi analisada em condições limitantes de substrato na presença do inibidor Pi para determinação do $V_{\lim}$ e com saturação de substrato para determinação de $V_{\max}$. O percentual de ativação ou estado de ativação da enzima é dado pela razão $V_{\lim} / V_{\max}$ multiplicada por 100. A mistura de reação totalizou 70µl, sendo 45µl de extrato e 25µl de meio de ensaio. Para o ensaio de $V_{\lim}$ o meio continha 10 mM UDP-G, 3 mM Fru-6-P, 12 mM Glc-6-P, 50 mM Mops-NaOH pH 7,5; 15 mM MgCl₂, 2,5 mM DTT, 10 mM Pi (K₂HPO₄). O meio para $V_{\max}$ diferiu do acima por excluir o Pi e as concentrações de Fru-6-P e Glc-6-P serem de 10 e 40 mM, respectivamente. A reação foi desenvolvida por 10 min em banho-maria à temperatura de 30 °C e interrompida com adição de 70µl de 30% (p/v) KOH, seguida por imersão em água fervente por 10 min para eliminar o excesso de Fru-6-P que não reagiu. Após o resfriamento, a sacarose foi revelada adicionando-se 1 ml do reagente Antrona 0.14 % (p/v) em ácido sulfúrico e incubando por 20 min em banho-maria. A concentração do

produto da reação foi mensurada através da leitura em espectrofotômetro a 620 nm, comparando-se com uma curva padrão de sacarose.

3.9 Medida da atividade da fosfoenolpiruvato carboxilase

A atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC, EC 4.1.1.31) foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Ku et al. (1999). O material vegetal utilizado foi obtido da mesma forma como descrito para avaliação da sacarose fosfato sintase. A enzima foi extraída manualmente com o auxílio de cadinho e pistilo em nitrogênio líquido. Para um disco de 5 cm² foi utilizado um volume de 1,5 mL de tampão de extração composto por 50 mM Tris-HCl pH 7,0; 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 5mM DTT, 10 mg PVPP, 10% (v/v) glicerol. A amostra foi macerada até completa pulverização. O extrato bruto resultante foi centrifugado a 15.000g por 10 minutos a 4 °C. A atividade da PEPC foi mensurada com o auxílio de um espectrofotômetro acompanhando a reação de oxidação de NADH (absorbância em 340 nm) mediada por malato desidrogenase. A mistura de reação foi formada por 50 mM Tricina-KOH pH 8,0; 1mM DTT, 0,1 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 10 mM NaHCO₃, 0,2 mM NADH, 3 U NAD- malato desidrogenase, 50µl do sobrenadante de amostra centrifugada para 1 mL da mistura de reação. A reação teve início com a adição de 2 mM de fosfoenolpiruvato.

3.10 Extração com ácido perclórico para a quantificação de metabólitos

A extração foi realizada em ácido perclórico (HClO₄) 10% (v/v) conforme descrito por Labate & Leegood (1989). Em cadinho pré-resfriado, o disco foliar congelado foi macerado em nitrogênio líquido com 1 mL de HClO₄ 10% (v/v) até completa pulverização. O extrato obtido após a pulverização foi transferido para microtubos de centrífuga do tipo "Eppendorf ", previamente colocados no gelo. O microtubo foi centrifugado a 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

descrito a seguir. O sobrenadante foi ainda neutralizado a pH entre 6,5 e 7,0; com K_2CO_3 5 M 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 do carbono e nitrogênio.

3.10.1 Determinação do conteúdo de metabólitos

Todos os metabólitos foram medidos de acordo com a metodologia de (Lowry & Passonneau, 1972), em espectrofotômetro Hitachi U-3300 (Japão) através de reações enzimáticas acopladas que utilizam nucleotídeos de pirimidina (NAD^+ , NADP^+ , NADH , NADPH). As determinações baseiam-se nas mudanças de absorbância, no comprimento de onda de 340 nm, que ocorrem 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 100 μl , em um volume de ensaio de 1 mL. As enzimas utilizadas foram da Boehringer Mannheim (Alemanha) e da Sigma Chemical Co. (U.S.A).

3.10.1.1 Determinação do conteúdo de ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA)

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

3.10.1.2 Determinação do conteúdo de triose-fosfato e frutose-1,6-bisfosfato

O ensaio para determinação do conteúdo de triose-fosfato e frutose-1,6-bisfosfato continha 50 mM imidazole-HCl pH 7,0 e 150 μM NADH . Foram adicionadas 1,2 U de triose fosfato isomerase (TIM) e 0,16 U de glicerol-3-fosfato desidrogenase (GDH) para determinação de triose-fosfato e a seguir 0,02 U de aldolase para a determinação de frutose-1,6-bisfosfato.

É importante notar que a determinação de Fru-1,6-bisP inclui a formação de dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) que deriva da sedoheptulose-1,7-bifosfato, devido ao duplo papel da aldolase.

3.10.1.3 Determinação do conteúdo de hexoses-fosfato

O ensaio para a determinação do conteúdo de hexoses fosfato continha 100mM Tris-HCl pH 8,1 e 0,5 mM NADP^+ . Foi adicionado 0,06 U de glucose-6-fosfato desidrogenase (G6P-DH), seguido de 0,35 U de fosfogluco isomerase (PGI) e 0,2 U de fosfoglucomutase (PGluM).

3.10.1.4 Determinação do conteúdo de fosfoenolpiruvato, piruvato e 2-PGA

O ensaio para a determinação do conteúdo de fosfoenolpiruvato, piruvato e 2-PGA continha tampão fosfato (30 mM K_2HPO_4 , 20 mM NaH_2PO_4) pH 7,0; 2 mM MgCl_2 , 100 mM ADP e 40 mM NADH. Foi adicionado primeiramente 0,2 U de lactato desidrogenase (LDH) para determinação de piruvato, em seguida 0,15 U de piruvato kinase (PK) para determinação de fosfoenolpiruvato (PEP) e por último 0,8 U de enolase para 2-PGA.

3.10.1.5 Determinação do conteúdo de malato

O ensaio para determinação de malato continha 100 mM 2-amino-2metilpropanol pH 9,9; 2mM NAD^+ e 40 mM glutamato. Foram adicionados ao meio 0,9 U de glutamato-oxoglutarato transaminase (GOT) e 3,5 de malato desidrogenase (MDH).

3.10.1.6 Determinação do conteúdo de 2-oxoglutarato

O ensaio para determinação de 2-oxoglutarato continha 40 mM imidazole-acetato pH 7,0; 25 mM acetato de amônio, 100 μM ADP e 100 μM NADH. Foi adicionado ao meio 0,22 U de glutamato desidrogenase (GDH).

3.10.1.7 Determinação do conteúdo de feofitina

Em condições de extração ácida, a clorofila é convertida a 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. A solução foi centrifugada a 14000 rpm por 5 minutos. O pelete de coloração branca formado foi utilizado para a extração do amido que será descrito mais abaixo, e o sobrenadante foi lido a 666 nm e 655 nm de absorbância em espectrofotômetro, contra um branco de acetona 80 %. O conteúdo de feofitina foi determinado através da seguinte fórmula :

$$\text{mg de feofitina.ml}^{-1} = [(26,03 \times A_{655}) + (6,75 \times A_{666})] \times (V/1000) \quad (3.15)$$

em que:

A_{655} : absorbância a 655 nm;

A_{666} : absorbância a 666 nm;

V: volume de acetona 80 % (ml).

3.11 Coleta de material para determinação de amido e sacarose

As amostras para as determinações dos conteúdos de amido e sacarose constituíram-se de discos de 10 cm² retirados da quarta folha de tabaco com 40 DAT. Foram feitas duas coletas na mesma folha, a primeira no escuro momentos antes do início do período luminoso e a segunda amostragem após 12 horas de iluminação.

3.11.1 Determinação do conteúdo de amido em folhas

Para a extração do amido foi utilizado o pelete de coloração branca resultante da extração de feofitina descrito no item 3.7.1.7. A este pelete adicionou-se 0,5 mL de MES 0,5 M pH 4,5 e centrifugou-se por 2 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante foi descartado, repetindo-se o procedimento por mais duas vezes. Em seguida, o pelete foi ressuspenso em 0,5 mL de ácido 2- (N-morfolino) etanosulfônico (MES) pH 4,5 e tratado com 14 U de amiloglucosidase e 0,4 U de α -amilase. A mistura foi mantida à temperatura ambiente por uma noite, para completa digestão e, em seguida, centrifugada a 14000 rpm por 3 minutos. O pelete formado foi descartado e o sobrenadante utilizado para determinar o conteúdo de amido hidrolisado à glicose, de acordo com o método descrito por Jones et al. (1977). O ensaio continha 100 mM Hepes pH 7,0; 5 mM MgCl₂, 0,5 mM ditioneitol (DTT), 0,02 % (p/v) albumina de soro bovino (BSA), 0,4 mM NADP e 0,5 mM ATP. A esta reação adicionou-se 3 U de hexoquinase, seguido de 0,5 U de G6P-DH.

amido → glucose (amiloglucosidase + α -amilase)

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

glucose-6-P + NADP → 6-P-gluconato + NADPH (G6P-DH)

3.11.2 Determinação do conteúdo de sacarose em folhas

O extrato para determinação da sacarose foi obtido da forma como descrito para metabólitos (item 3.10.1). O ensaio continha 100 mM Hepes pH 7,0; 5 mM MgCl₂, 0,5

mM DTT, 0,02% (p/v) BSA, 0,4 mM NADP e 0,5 mM ATP. A esta reação adicionou-se 0,5 unidades de G6P-DH, seguido de 0,5 unidades de PGI, 3 U de hexoquinase e 100 U de invertase.

sacarose $\rightarrow$ glicose + frutose (invertase)

glicose + ATP $\rightarrow$ glicose-6-fosfato (hexoquinase)

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

frutose-6-fosfato $\rightarrow$ glicose-6-fosfato (PGI)

glucose-6-fosfato + NADP $\rightarrow$ 6-fosfogluconato (G6P-DH)

3.11.3 Determinação de amido nas sementes

Para determinação do conteúdo de amido nas sementes, 100 sementes de cada genótipo foram primeiramente pesadas e, em seguida, usadas para extração em nitrogênio líquido, seguindo procedimento descrito em 3.11.1. Em seguida, o pelete foi lavado com 0,5 ml de tampão MES 0,5 M pH 4,5 e, após acréscimo de 14 U de amiloglicosidase e 0,4 U de α -amilase, mantido a temperatura ambiente por uma noite, para completa digestão. A suspensão foi então centrifugada, o pelete foi descartado e o sobrenadante foi usado para determinação de glicose, seguindo a metodologia de Jones et al. (1977), conforme descrito acima.

3.12 Determinação dos aminoácidos solúveis

O protocolo de extração de aminoácidos foi adaptado a partir de Bieleski & Turner (1966). Aproximadamente 100 mg de tecidos foliares liofilizado foram macerados em N₂ líquido, procedendo-se à extração com MCA (metanol:clorofórmio:água; 15:5:3) na proporção de 2 mL para cada 100 mg de material. Após a incubação do extrato por 3 dias à temperatura de 4 °C, foi efetuada uma centrifugação a 2500 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e para cada 2 mL de sobrenadante foi adicionado 0,5 mL de clorofórmio e 0,75 mL de H₂O. Foi realizada uma nova centrifugação e após a coleta do sobrenadante foi determinado o volume final.

O sobrenadante foi colocado a 38 °C por 2 horas, centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos, e filtrado em filtro Millipore (0,22 µm).

A quantificação dos aminoácidos nas amostras foi efetuada como descrito no método de Bieleski & Turner (1966). O padrão usado foi "Amino Acids Standart" da Sigma onde cada aminoácido tem uma concentração de 2,5 mM/mL. Os aminoácidos foram separados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em um AKTA purifier Model 10/100 da Amersham Pharmacia Biotech em coluna de fase reversa C18 Supercap ODS-2 4 x 250 mm (Supelco), temperatura ambiente, com fluxo de 0,8 mL.min⁻¹. O eluente foi tampão fosfato de pH 7,25 (50 mM NaOAc, 50 mM Na₂HPO₄, 20 mL tetrahidrofurano, 20 mL metanol). O gradiente polar de arraste dos aminoácidos utilizado para construir a curva de arraste foi feito com metanol 65% preparado com água "milli-Q". O tampão fosfato e o metanol 65% foram desgaseificados e filtrados a vácuo com filtro para solventes orgânicos Millipore (0,45 µm). Após derivação dos aminoácidos com *o*-phthaldialdeído (OPA), os aminoácidos foram detectados por fluorescência com auxílio do detector de fluorescência da Shimatzu, modelo RF-551 regulado para excitação regulado para excitação (E_{ex} = 250 nm) e emissão (E_{em} = 480 nm).

O reagente OPA foi preparado diariamente a partir de soluções estoque: a) 2,4% (p/v) de ácido bórico pH 9,5 (ajustado com NaOH); b) 5% (p/v) *o*-phthaldialdeído em metanol. c) 6,5 mL da solução *a* mais 1 mL da solução *b*. E o reagente OPA foi então constituído com 2,5 mL da solução *c* + 20 µL de 2-mercaptoetanol (adicionado no dia).

A alíquota injetada no HPLC foi de 10 mL proveniente de uma mistura de amostra e reagente OPA na proporção 3:1.

3.13 Delineamento e análise estatística

Os experimentos foram montados segundo o delineamento experimental inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Dunnett a 0.1%, 1% e 5% de probabilidade. As análises foram feitas com o auxílio do programa computacional SAS - Statistical Analysis System, para as análises.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção de biomassa e análise de crescimento.

A fotossíntese é o processo primário para o acúmulo de biomassa. O aumento no ganho de biomassa pelo incremento da taxa de fotossíntese pode ser revertido diretamente em ganho econômico por algumas culturas agrícolas e florestais. No aspecto ecológico, ganho em biomassa pode se traduzir em maior captura de CO₂ da atmosfera.

A Tabela 1 apresenta os valores de massa seca dos diferentes componentes da parte aérea ao final do ciclo reprodutivo das plantas. Os resultados mostram diferenças significativas de matéria seca acumulada para folhas, caule e parte aérea total, entre as plantas de tabaco transgênicas (TR1 e TR2) e as plantas de tabaco selvagem (WTSR1). A massa seca acumulada das plantas transgênicas foi superior a das plantas selvagens em 60, 130 e 65 %, para folhas, caule e parte aérea total, respectivamente.

Tabela 1. Produção de massa seca de folhas, caule, frutificação (infrutescência com exceção das sementes) e parte aérea total, ao final do ciclo reprodutivo em g planta⁻¹. Relação frutificação/parte aérea (PA) ao final do ciclo reprodutivo e parte aérea/raiz (média de 4 amostragens aos 15, 30, 45 e 60 DAT) de plantas selvagem (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2). As plantas foram cultivadas em casa-de-vegetação. Os valores entre parênteses referem-se ao número de plantas analisadas.

Genótipos	Folhas	Caule	Frut.	PA Total	Frut./PA	PA/raiz
WTSR1	(3) 53,6	(3) 63,6	(3) 107,5	(3) 224,8	(3) 0,48	(12) 8,9
TR1	(2) 88,9 ^{**}	(2) 152,3 ^{***}	(2) 119,0 ^{ns}	(2) 360,3 ^{**}	(2) 0,33	(12) 7,4
TR2	(2) 98,8 ^{**}	(3) 154,6 ^{***}	(3) 129,9 ^{ns}	(3) 371,9 ^{**}	(3) 0,35	(12) 7,1
CV%	9,3	9,1	13,2	8,5	----	----

^{**} P = 0.01 e ^{***} P = 0.001 pelo T. de Dunnett. ns = não significativo estatisticamente

CV% = coeficiente de variação

Estes resultados refletem bem as diferenças morfológicas e fisiológicas entre as plantas transgênicas e selvagem, muitas já descritas por Real (1997), Pinto (2000), Brito (2001), Labate et al. (2002) e Barja et al. (2002). Na Figura 1 pode-se observar algumas diferenças morfológicas. As plantas transgênicas formam 23 folhas contra 17 da selvagem, até o período de florescimento. Elas também apresentam alto índice de área foliar e o diâmetro do caule é maior. O ciclo vegetativo das plantas transgênicas é alterado. Em condições de casa-de-vegetação, a diferença na visualização da inflorescência apical é de 15 dias entre as plantas. As transgênicas, mesmo florescendo depois, mantêm ainda um evidente crescimento vegetativo. Outra característica interessante observada nas plantas transgênicas, foi a manutenção do fenótipo "stay green", após o corte do fornecimento de água e nutrientes aos 170 DAT. Provavelmente, essa característica se deve ao promotor constitutivo 35S, responsável pela regulação do gene quimérico *Lhcb1*2* de ervilha. Resultado semelhante foi observado com essas plantas quando mantidas no escuro por 21 dias, com as folhas transgênicas permanecendo verdes (Pinto, 2000 e Labate et al., 2002).

Tabela 2. Rendimento de sementes (RS) em grama.planta⁻¹, número de frutos por planta (NF), número de sementes por fruto (NS/F), massa de 1.000 (mil) sementes (MS) em mg e conteúdo de amido nas sementes (AS) em μ mol hexose equivalente mg⁻¹ semente. As plantas foram cultivadas em casa-de-vegetação. Os valores entre parênteses referem-se ao número de plantas analisadas.

Genótipos	RS	NF	NS/F	MS	AS
WTSR1	(3) 76,5	(3) 755	(3) 1.315	(3) 77,0	(3) 257,8
TR1	(2) 70,5 ^{ns}	(2) 566 ^{ns}	(2) 1.518 ^{ns}	(2) 82,1 ^{**}	(2) 266,3 ^{ns}
TR2	(2) 81,9 ^{ns}	(3) 621 ^{ns}	(3) 1.594 ^{ns}	(3) 82,7 ^{**}	(3) 238,3 ^{ns}
CV%	17,9	15,4	9,1	1,6	9,7

** P = 0,01 pelo T. de Dunnett. ns = não significativo estatisticamente

CV% = coeficiente de variação

Em relação à massa seca da frutificação (Tabela 1), composta pela massa seca das hastes e dos frutos sem as sementes, não há diferenças significativas entre os genótipos. Os componentes de produção apresentados na Tabela 2 mostram que não houve diferença no rendimento de sementes. Os diferentes genótipos atingiram uma

produtividade de sementes semelhante, em torno de 75 g por planta. Apesar dos valores de NF e NS/F não apresentarem diferença estatística significativa, as plantas WTSR1 mostram uma tendência a apresentar maior número de frutos que as plantas transgênicas, que por sua vez tendem a apresentar maior NS/F que as WTSR1. As sementes das plantas transgênicas de tabaco são 7 % mais pesadas que as das selvagens. O teor de amido não variou entre os genótipos, ficando em torno de 250 μmol hexose equivalente mg^{-1} semente. Estes dados demonstram que as plantas transgênicas possuem carboidrato suficiente para suprir drenos reprodutivos, mas existe um direcionamento preferencial dos recursos para a formação de biomassa vegetativa em detrimento da parte reprodutiva, como pode ser observado pela relação massa seca da frutificação por massa seca da parte aérea total na Tabela 1. A parte reprodutiva das plantas selvagens foi responsável por aproximadamente 50 % da massa seca total da planta, enquanto nas transgênicas apenas 35 % da massa representa a parte reprodutiva.

A relação parte aérea/raiz apresentada na Tabela 1 mostra que as plantas selvagens alocam 20 % menos de carbono para as raízes em relação às transgênicas. Alguns fatores ambientais podem levar a alteração na relação parte aérea/raiz. Scheible et al. (1997) observaram que plantas crescidas em baixa disponibilidade de nitrogênio (N) apresentaram uma maior biomassa radicular em relação à biomassa da parte aérea.

Figura 1 - Plantas de tabaco selvagem (WTSR1) ao centro, à esquerda transgênico 1 (TR1) e à direita transgênico 2 (TR2). Plantas aos 50 DAT cultivadas em casa-de-vegetação.

A produtividade das plantas é determinada pela luz interceptada e pela conversão eficiente desta luz em produtos fotossintéticos (Gifford et al., 1984). A eficiência de conversão, que pode levar a um aumento de biomassa e produção de grãos, é determinada por uma malha de processos fisiológicos e bioquímicos complexos, incluindo a fotossíntese (Bansal et al., 1993). O aumento genético na produção de grãos, até hoje, é resultado da maior partição da matéria seca para grãos (Gifford et al., 1984), enquanto a produção de matéria seca tem permanecido mais ou menos constante (Austin et al., 1982).

Tabela 3. Valores médios para taxa de crescimento absoluto (TCA), taxa de crescimento relativo (TCR), taxa de crescimento relativo da área foliar (TCR_{AF}), taxa assimilatória líquida (TAL) e razão de área foliar (RAF), em três períodos de amostragem, área foliar específica (AFE) aos 60 DAT de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2). As plantas foram cultivadas em casa-de-vegetação. Os valores referem-se à média de três plantas.

Genótipos	DAT	TCA	TCR	TCR_{AF}	TAL	RAF	AFE
	(dias)	(g dia ⁻¹)	(g g ⁻¹ dia ⁻¹)	(dm ² dm ⁻² dia ⁻¹)	(g m ⁻² dia ⁻¹)	(m ² g ⁻¹)	(m ² g ⁻¹)
WTSR1	15-30	0,41	0,28	0,25	7,80	0,036	
	30-45	2,11	0,12	0,09	5,03	0,024	
	45-60	2,11	0,04	0,00	2,98	0,013	0,032
TR1	15-30	0,17	0,29	0,28	6,76	0,043	
	30-45	1,55	0,15	0,14	4,20	0,036	
	45-60	3,00	0,07	0,04	2,48	0,028	0,042
TR2	15-30	0,13	0,28	0,27	6,43	0,043	
	30-45	1,50	0,17	0,16	4,57	0,037	
	45-60	1,97	0,05	0,04	1,72	0,029	0,048

DAT = dias após o transplantio

Os resultados dos parâmetros avaliados na análise de crescimento são apresentados na Tabela 3 e Figuras 2 a 4. A taxa de crescimento absoluto (TCA), ilustrada na Figura 3, representa a taxa de variação da matéria seca no tempo (dMS/dT), Figura 3, é função do produto entre a taxa assimilatória líquida (TAL) e o índice de área foliar (IAF) representado na Figura 2. Há um aumento inicial, que acompanha o aumento do IAF até atingir um máximo, quando o IAF é ótimo. O incremento do IAF acima deste ótimo leva ao auto sombreamento, diminuindo a TAL, devido ao aumento da respiração e à degradação de folhas, o que se reflete em queda na TCA. As plantas selvagens apresentaram, nos dois primeiros intervalos de medida (15-30 e 30-45 DAT), valores médios de TCA superiores às plantas transgênicas. No último período, 45-60 DAT, o valor médio de TCA das plantas transgênicas foi superior à selvagem e com incremento expressivo em relação ao período anterior. A máxima TCA das plantas selvagens ocorre ao redor de 45 DAT, época do início do florescimento. As plantas transgênicas, mesmo florescendo aos 60 DAT, demonstram elevada TCA, o que se traduz no aumento de matéria seca observado.

Figura 2 - Índice de área foliar (IAF) de três genótipos de tabaco, em diferentes épocas de coleta. Plantas cultivadas em casa-de-vegetação. Linha vermelha: WTSR1; linha verde: TR1; linha azul: TR2; os pontos referem-se às médias amostrais de três plantas, ($r^2 > 0,98$).

A taxa de crescimento relativo (TCR) é considerada a medida mais apropriada para a avaliação do crescimento vegetal, pois representa a quantidade de material novo produzido por unidade de material já existente, por unidade de tempo. Esse conceito de relatividade foi introduzido por Blackman (1919), em analogia com a taxa financeira de juros compostos, como índice da eficiência de conversão de matéria seca.

Os valores médios da TCR (Tabela 3) são maiores no início do período vegetativo e decrescem com a evolução do ciclo para os três genótipos. O valor médio da TCR para os diferentes genótipos não apresentou diferença no primeiro período quinquenal. Para os outros dois períodos, as plantas transgênicas apresentaram valores

médios da TCR, superiores ao material selvagem. Esse resultado demonstra que TR1 e TR2 possuem uma maior eficiência na conversão de matéria seca.

Figura 3 - Massa seca da parte aérea (MS parte aérea) de três genótipos de tabaco, em diferentes épocas de coleta. Plantas cultivadas em casa-de-vegetação. Linha vermelha: WTSR1; linha verde: TR1; linha azul: TR2; os pontos referem-se às médias amostrais de três plantas ($r^2 > 0,98$).

A TCR considera toda a biomassa da planta como igualmente produtiva; no entanto, as folhas são as que mais contribuem para a produzir a matéria seca. Os valores da taxa de crescimento relativo da área foliar (TCR_{AF}), que representam o ganho de área foliar por área foliar já existente por unidade de tempo, e a razão de área foliar (RAF), representada pelo quociente entre a área foliar e a massa seca da planta, são bons parâmetros para avaliar-se a importância das folhas na TCR. Os valores de TCR_{AF} , RAF (Tabela 3) e IAF (Figura 2) mostram que a estratégia de crescimento das plantas transgênicas é voltada para a produção de folhas. Mesmo no início do período

vegetativo, a TCR_{AF} é maior nas plantas transgênicas. O valor médio da RAF, que no primeiro período não mostrou diferença entre os genótipos, é 50% maior para as plantas transgênicas, no segundo período e mais de 100% maior, no terceiro período (Tabela 3). Este comportamento de alocação de recursos para o desenvolvimento de folhas, é típico de plantas de sombra, onde a limitação por luz induz a um aumento da área foliar, como uma estratégia de aclimação. Long (1993) relata que a produtividade de muitas culturas está relacionada à eficiência da assimilação de CO_2 em condições de baixa intensidade luminosa. Durante um dia de sol, menos de 30% do dossel vegetal, em média, recebe luz saturante, possibilitando assim uma assimilação máxima (A_{max}). A maioria do dossel recebe apenas luz difusa onde a assimilação de CO_2 é limitante (A_{lim}).

Considerando a variação exponencial da área foliar e da massa seca da planta, com o mesmo expoente, a TCR é dada pelo produto da RAF pela TAL (Radford, 1967). A TCR das plantas transgênicas foi mais fortemente influenciada pelo padrão apresentado pela RAF, já que a taxa assimilatória líquida (TAL), que representa o balanço entre o material produzido pela fotossíntese e aquele que é perdido pela respiração, apresentou valores médios inferiores (Tabela 3). Em geral, há uma tendência para a diminuição da TAL com a expansão foliar, principalmente em virtude do autosombreamento (Hunt, 1982). A área foliar específica (AFE) está relacionada à espessura da folha ou à densidade foliar e tem estreita relação com o ambiente luminoso. O sombreamento causa um incremento da AFE, sendo parcialmente responsável pelo decréscimo da TAL (Hughes & Evans, 1962). Os valores de AFE apresentados na Tabela 3 são provenientes da amostragem feita aos 60 DAT. As plantas transgênicas apresentam valores de AFE 30 % superiores aos das plantas selvagens. O aumento da área foliar, nas plantas transgênicas, levou a uma diminuição da densidade da folha. Esse resultado indica que provavelmente as plantas selvagens apresentam uma estrutura de parede celular mais lignificada e um maior sistema de vasos condutores, e ainda podem ser decorrentes do aumento do número de células por unidade de área foliar, conforme relatado por Pinto (2000).

A Figura 4 apresenta a curva de IAF elaborada a partir do cálculo das medidas de dimensão da folha e de um fator de forma determinado para cada genótipo. Esta curva

de IAF foi feita com o intuito de verificar o aumento diário da área foliar dos genótipos e validar o método não destrutivo descrito por Francis et al. (1969) para a planta de tabaco. O método se mostrou válido pela proximidade dos valores calculados e medidos nas épocas de amostragem e pela similaridade do comportamento das curvas de IAF (Figura 2 e Figura 4), podendo ser utilizado em estudos futuros de análise do crescimento quantitativo de plantas.

Figura 4 - Índice de área foliar (IAF) de três genótipos de tabaco, calculados diariamente através de fator de forma. Plantas cultivadas em casa-de-vegetação. Linha vermelha: WTSR1; linha verde: TR1; linha azul: TR2; os pontos referem-se às médias amostrais de três plantas ($r^2 > 0,98$).

4.2 Conteúdo de aminoácidos

Algumas características apresentadas pelas plantas de tabaco transgênicas são muito similares às encontradas em plantas mantidas sob baixa pressão de O_2 . Quebedeaux & Hardy (1976) descreveram uma série de resultados de experimentos com soja (*Glicine Max*, L.) cultivada em câmaras-de-crescimento controlado sob diferentes

pressões de O₂. Plantas cultivadas em 5 % de O₂ apresentaram um incremento de 74 % na massa seca da parte aérea em relação às plantas mantidas em condições atmosféricas, ou seja, com 21 % de O₂. As plantas expostas a concentrações sub-atmosféricas de O₂, também apresentaram maior diâmetro do caule e atraso na senescência das folhas. Entretanto, dois aspectos observados nessas plantas de soja, em resposta ao baixo O₂, diferem das plantas transgênicas de tabaco. Diferentemente do tabaco, as plantas de soja, quando submetidas a 5% de O₂, não apresentaram nenhum desenvolvimento de vagens e sementes e, quando mantidas em 15 % de O₂, produziram somente 50 % em comparação às plantas mantidas sob condições atmosféricas. Além disso, nas plantas de soja o tempo de florescimento não foi alterado.

O comportamento das plantas transgênicas se assemelham aos efeitos descritos acima, indicando que uma alteração na taxa fotorrespiratória pode ser a causa do aumento da biomassa.

Dessa forma, um experimento foi montado para avaliar-se os níveis de aminoácidos solúveis em folhas analisadas sob condições fotorrespiratórias. Os três genótipos de tabaco (TR1, TR2 e WTSR1) foram avaliados em condições de luminosidade intermediária ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e pressão de CO₂, na câmara de análise, em torno de 110 ppm. A Figura 5 apresenta o conteúdo de aminoácidos. As plantas selvagens apresentaram um maior conteúdo de aminoácidos solúveis totais em relação às plantas transgênicas, como observado por Brito (2000). Houve diferença no conteúdo de aminoácidos totais entre as plantas transgênicas e as selvagens. As maiores diferenças foram encontradas para os aminoácidos glutamina e serina.

AAM=aminoácidos menores (tirosina, metionina, valina, fenilalanina, isoleucina e leucina)

Figura 5 - Conteúdo de aminoácidos solúveis em $\mu\text{mol g}^{-1}$ matéria seca em plantas analisadas em condições fotorrespiratórias, luminosidade de $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e pressão de CO_2 de 110 ppm. Os valores acompanhados do desvio padrão referem-se à média de três plantas.

Apesar de quase todos os aminoácidos apresentarem maior concentração nas plantas selvagens, algumas relações, importantes entre eles, apresentaram comportamentos diferentes entre as plantas. A relação entre serina/glicina é um bom indicativo do processo fotorrespiratório. A Tabela 4 mostra que a serina/glicina para as plantas selvagens é maior do que a encontrada para as plantas transgênicas indicando que a produção de serina nestas plantas está sendo favorecida. Serina e glicina são os principais aminoácidos formados durante a fotorrespiração nas plantas C_3 . Uma menor taxa de fotorrespiração nas plantas transgênicas poderia explicar as maiores taxas de crescimento relativo (TCR) encontradas nestas plantas, à semelhança do que ocorre com plantas cultivadas sob baixa pressão de O_2 ou alto CO_2 (Quebedeaux & Hardy, 1976).

Tabela 4. Relação entre os aminoácidos: serina/glicina e asparagina/aspartato (ASN/ASP) em plantas analisadas, em condições fotorrespiratórias, luminosidade de $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e pressão de CO_2 de 110 ppm. Os valores referem-se à média de três plantas.

Genótipos	glicina/serina	ASN/ASP
WTSR1	3,45	1,23
TR1	1,27	0,60
TR2	1,54	0,60

A relação asparagina/aspartato também apresenta uma diferença bem consistente entre as plantas transgênicas e as selvagens. As plantas selvagens apresentam uma relação asparagina/aspartato superior às plantas transgênicas. Geiger et al. (1999), em seu trabalho com plantas de tabaco, observou que quando o suprimento de N foi feito com nitrato de amônia, as plantas apresentavam uma relação asparagina/aspartato cerca de 2 a 3 vezes maior do que quando supridas apenas com nitrato. Estes dados sugerem que a principal via de assimilação do nitrogênio nessas plantas de tabaco transformadas é a da nitrato redutase (NR) e que para as plantas selvagens, existe uma grande contribuição da via de assimilação da amônia fotorrespirada. Esses indícios são sustentados pelo maior estado de ativação da enzima nitrato redutase observados por Brito (2000). A Tabela 8 mostra uma tendência para maior conteúdo de malato nas plantas transgênicas. O malato tem importante função na manutenção do equilíbrio iônico durante a redução do nitrato, evitando a alcalinização do citosol (Muller et al., 2001).

4.3 Assimilação de CO_2 e fluorescência da clorofila *a*

Os resultados da taxa de assimilação de CO_2 (A) em $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e dos parâmetros avaliados pela curva de indução modulada da fluorescência da clorofila *a* (F_v/F_m , Φ_{PSII} , q_N e $1-q_p$) são apresentados na Tabela 5. As plantas TR1, TR2 e selvagem foram cultivadas em câmaras-de-crescimento sob condições controladas de intensidade luminosa intermediária ($250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e pressão atmosférica de CO_2 , e as folhas,

foram analisadas em condições de alto CO_2 (870 ppm) e alta intensidade luminosa ($1250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

Tabela 5. Taxa de assimilação de CO_2 (A) em $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e parâmetros de fluorescência da clorofila (F_v/F_M , Φ_{PSII} , q_N e $1-q_p$) das plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2). Os valores entre parênteses referem-se ao número de plantas analisadas.

Genótipos	A	F_v/F_M	Φ_{PSII}	q_N	$1-q_p$
WTSR1	(17) 11,9	(11) 0,781	(16) 0,439	(15) 0,732	(15) 0,295
TR1	(17) 11,0 ^{ns}	(11) 0,786 ^{ns}	(16) 0,422 ^{ns}	(15) 1,138 ^{***}	(15) 0,208 ^{***}
TR2	(17) 11,1 ^{ns}	(11) 0,781 ^{ns}	(16) 0,429 ^{ns}	(15) 1,040 ^{***}	(15) 0,234 ^{***}
CV%	13,6	1,4	7,8	18,8	15,7

*** P = 0.001 pelo T. de Dunnett. ns = não significativo estatisticamente

CV% = coeficiente de variação

Os valores da taxa de assimilação de CO_2 não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os genótipos estudados. Esse resultado mostra que nestas condições, os fatores que atuam limitando a fotossíntese não estão interferindo na assimilação de CO_2 , pelos diferentes genótipos. Pinto (2000) e Barja et al. (2002), trabalhando com as mesmas plantas e em condições semelhantes, também não observaram diferenças neste parâmetro.

Os parâmetros determinados pela fluorescência da clorofila são bons indicadores dos processos envolvidos no transporte fotossintético de elétrons (Krause & Weis, 1991; Schreiber et al., 1994). O parâmetro F_v/F_M indica a máxima eficiência fotoquímica do PSII e se presta como um bom indicativo dos processos fotoinibitórios, de longo e curto prazo. Os valores desse parâmetro variam de 0,75 a 0,85 para folhas de plantas sadias de diferentes espécies (Havaux, 1992). F_v/F_M é o primeiro parâmetro a ser medido, e a sua determinação requer que a planta passe por um período (30 minutos) de adaptação, no escuro. Os valores de F_v/F_M (Tabela 5) mostram que as plantas não passaram por nenhum estresse antes das medidas. As plantas não diferiram quanto a esse parâmetro. O Φ_{PSII} foi outro parâmetro que também não diferiu entre as plantas transgênicas e selvagens, mostrando que os genótipos apresentaram eficiência quântica fotoquímica do PSII equivalente, nas condições da análise.

Os valores de $1-q_p$ (Tabela 5) representam a proporção de quinonas (Q_A) reduzidas nos tilacóides. Q_A é o primeiro receptor de elétrons do P_{680} . As plantas transgênicas apresentaram um valor para este parâmetro significativamente menor ($P = 0,001$) que as plantas selvagens. Isso indica que apresentam um "quenching" fotoquímico maior, ou seja, há menos Q_A no estado reduzido. O "quenching" não fotoquímico de energia de excitação, q_N , engloba os processos térmicos da supressão de fluorescência que não estão relacionados à fotoquímica. Na Tabela 5 podemos observar que os valores de q_N , entre as plantas transgênicas e selvagem apresentaram diferenças significativas ($P = 0,001$). A elevação de q_N nas plantas transgênicas pode ser decorrente de uma menor taxa fotorrespiratória. Com a redução da taxa de fotorrespiração, parte da energia (ATP e NADPH) que seria dissipada, via assimilação de O_2 , acaba sobrando. O mecanismo de dissipação deste excesso de energia é pela forma não radiativa (q_N). Os maiores valores de q_N apresentados pelas plantas transgênicas demonstram que essas plantas possuem mecanismos diferenciados de dissipação de energia, podendo levar a uma maior proteção do aparato fotossintético.

Genty et al. (1990) demonstrou em plantas de ervilha (*Pisum sativum*, L.) que o aumento da intensidade luminosa leva a um incremento na fração dos centros de reação do PSII fechados, indicado pelo decréscimo de q_p . Segundo estes mesmos autores, o fechamento dos centros de reação do PSII também é acompanhado pelo incremento de q_N . O aumento de q_N está relacionado ao decréscimo de F_V/F_M , ou seja, decréscimo na eficiência fotoquímica dos centros de reação do PSII abertos (Genty et al., 1989). O decréscimo de q_p e F_V/F_M com o aumento da intensidade luminosa resulta em decréscimo da eficiência quântica do PSII, Φ_{PSII} , que é determinado pelo produto de q_p e F_V/F_M (Genty et al., 1990).

Os dados da Tabela 5 mostram que não existe diferença significativa entre as plantas quanto à eficiência do PSII (Φ_{PSII}), como já mencionado. Como Φ_{PSII} é o produto de q_p e F_V/F_M , mecanismos compensatórios devem ocorrer para manter Φ_{PSII} inalterado entre as plantas. Nas plantas selvagens, como o q_p é menor, a compensação está no aumento de F_V/F_M . Já nas plantas transgênicas, onde o q_N é maior e, conseqüentemente

F_V/F_M menor (Genty et al., 1989), a elevação do q_p mantém os valores de Φ_{PSII} semelhantes aos das plantas selvagens.

Barja et al. (2002) fez a decomposição do q_N das plantas transgênicas de tabaco e observou que o principal componente é o q_E , o "quenching" relacionado à energia de excitação. A origem de q_E pode estar na dissipação térmica dos centros de reação do PSII que se tornaram inativos e/ou associada à dissipação térmica por pigmentos que compõem as antenas do PSII (Krause & Weis, 1991; Horton & Ruban, 1992). Ambos os modelos propostos para o aumento de q_N são dependentes do abaixamento do pH do lúmen (ΔpH). O baixo pH do lúmen é o fator de ativação do ciclo das xantofilas, no qual violaxantina sofre de-epoxidação formando zeaxantina. A formação de zeaxantina está relacionada ao aumento da dissipação da energia na forma não radiativa (Demming-Adams et al., 1990).

4.4 Conteúdo de carboidratos e metabólitos

Apesar das plantas transgênicas não apresentarem diferenças estatísticas significativas quanto à assimilação de CO_2 (A) e à eficiência do transporte de elétrons pelo PSII (Φ_{PSII}) em relação às plantas selvagens (WTSR1), muitas diferenças na concentração de aminoácidos, carboidratos, metabólitos e na atividade das enzimas foram encontradas entre elas. Os valores encontrados para os metabólitos relacionados ao ciclo de Calvin-Benson, glicólise e dos ácidos tricarboxílicos (TCA) estão apresentados nas Tabelas 6 e 8. Os valores são expressos por clorofila. As amostras analisadas se constituíram de folhas maduras provenientes de plantas submetidas a alto CO_2 (870 ppm) e alta intensidade luminosa ($1250 \mu mol m^{-2} s^{-1}$).

Tabela 6. Conteúdo dos metabólitos 3-PGA, TP, FBP, G6P, F6P e total de metabólitos fosforilados (3-PGA, TP, FBP, G6P, F6P) (TMP) em nmol mg⁻¹ clorofila e relação PGA/TP e G6P/F6P em mol/mol, de plantas selvagem (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2). As plantas foram cultivadas sob luminosidade intermediária (250 µmol m⁻² s⁻¹) e analisadas em alto CO₂ (870 ppm) e alta intensidade luminosa (1250 µmol m⁻² s⁻¹). Os valores referem-se à média de no mínimo três plantas.

Genótipos	3-PGA	TP	FBP	G6P	F6P	PGA/TP	G6P/F6P	TMP
WTSR1	228,1	72,5	30,9	242,1	111,4	3,1	2,2	685
TR1	455,6 [*]	100,1 ^{ns}	44,8 [*]	235,6 ^{ns}	173,4 ^{ns}	4,5	1,4	1009,5
TR2	315,4 ^{ns}	130,1 ^{**}	45,8 [*]	221,5 ^{ns}	155,7 ^{ns}	2,4	1,4	868,5
CV%	25,4	17,2	17,1	30,4	25,4	----	----	----

* P = 0.05 e ** P = 0.01 pelo T. de Dunnett. ns = não significativo estatisticamente

CV% = coeficiente de variação

O total de metabólitos fosforilados apresentados na Tabela 6 mostra uma tendência para o maior acúmulo de metabólitos fosforilados para as plantas transgênicas em relação às selvagens. Essa tendência indica que nas transgênicas, o balanço de fosfato inorgânico na célula entre a forma esterificada (metabólitos fosforilados) e a forma livre (Pi) pode estar deslocado em favor da forma esterificada, nas condições da análise. Segundo Gerhardt et al. (1987), a relação glucose 6-fosfato/frutose 6-fosfato (G6P/F6P) no citosol da célula é três vezes maior que no estroma do cloroplasto. Essa diferença é ocasionada pelo desequilíbrio da reação de interconversão no estroma, catalisada pela enzima fosfoglucoase isomerase. De acordo com esse mesmo autor, uma relação G6P/F6P com valores abaixo de 2 (dois) caracteriza a predominância do metabolismo de hexoses no estroma. As plantas transgênicas apresentam um valor de (1,4), enquanto as plantas selvagens, um valor de (2,2) para a relação G6P/F6P. A relação 3-fosfoglicerato/triose fosfato (3-PGA/TP) é um indicativo da disponibilidade de NADPH e ATP requerido para reduzir 3-PGA a TP (Stitt, 1990; Stitt et al., 1991). Os valores apresentados na Tabela 6 não mostram uma tendência clara para a relação 3-PGA/TP entre as plantas transgênicas e selvagens.

A síntese de amido, nas folhas das plantas, ocorre durante a fotossíntese, possivelmente como resposta ao aumento na concentração de 3-PGA (primeiro composto estável da assimilação fotossintética de CO₂) no estroma e redução no nível do

Pi, utilizado na fotofosforilação (Kleczkowski, 1999). A enzima regulatória ADP-glucose pirofosforilase (AGPase) catalisa a produção de ADP-glucose, substrato para a biossíntese de amido nas plantas. AGPase é altamente regulada por 3- PGA e Pi, que são ativador e inibidor, respectivamente (Kleczkowski, 1999). As plantas transgênicas apresentaram uma tendência a maiores valores de 3-PGA, com o TR1 apresentando diferença estatisticamente significativa em relação à planta selvagem.

A Tabela 7 mostra os valores dos carboidratos não estruturais, amido e sacarose. Esses carboidratos foram avaliados em folhas coletadas em dois instantes do dia, o primeiro ao final do período de escuro e o segundo ao final do período luminoso. As plantas desse experimento, foram cultivadas em câmaras-de-crescimento controlado sob condições controladas de ($250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e pressão atmosférica de CO_2 (360 ppm). As plantas transgênicas, em ambos os instantes avaliados, apresentaram um conteúdo de amido significativamente maior que as plantas selvagens. Os valores de amido mostram que, independentemente do genótipo, houve pouco consumo das reservas de amido durante o período de escuro. As plantas transgênicas, mesmo apresentando um conteúdo de amido superior, não diferiram das selvagens quanto ao conteúdo de sacarose ao final do período luminoso.

A sacarose fosfato sintase (SPS) é a principal enzima envolvida na regulação da síntese de sacarose (Huber & Huber, 1992). A SPS, para a maioria das plantas é controlada pela relação G6P/Pi, onde G6P é o efector positivo e Pi o inibidor (Doehlert & Huber, 1983). A Tabela 9 mostra que não houve diferença estatisticamente significativa da porcentagem de ativação da SPS entre os genótipos estudados.

Tabela 7. Conteúdo de sacarose (Sac), amido e carboidratos totais (amido e sacarose) (CT) em μmol hexose equivalente mg^{-1} clorofila de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2) em dois momentos do dia : ao final do período de escuro (PE) e ao final do período luminoso (PL). As plantas foram cultivadas em câmaras-de-crescimento sob luminosidade intermediária ($250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Os valores referem-se à média de no mínimo quatro plantas.

Genótipos	Sac. (PE)	Sac. (PL)	Amido (PE)	Amido (PL)	CT (PE)	CT (PL)
WTSR1	3,2	7,5	8,5	9,0	11,7	16,5
TR1	4,3*	7,5 ^{ns}	10,3**	10,7*	14,6	18,2
TR2	4,2*	8,2 ^{ns}	11,0**	10,6*	15,2	18,8
CV%	15,2	13,5	7,1	8,7	----	----

* P = 0.05 e ** P = 0.01 pelo T. de Dunnett. ns = não significativo estatisticamente CV% = coeficiente de variação

A quantidade de sacarose, ao final do período de escuro, apresentou uma diferença significativa ($P = 0,05$) entre os genótipos, com os maiores valores para as plantas transgênicas. Hausler et al. (2000), trabalhando com tabaco transgênico com redução da atividade do transportador de fosfato (TPT), e Zeeman & Rees (1999), trabalhando com mutantes de *Arabidopsis* com capacidade reduzida na degradação do amido, mostraram que a glucose proveniente da hidrólise do amido, durante o período de escuro, pode ser transportada para o citosol, via transportador de glucose, e servir de substrato para a síntese de sacarose. As plantas que apresentaram maiores quantidades de amido ao final do período luminoso são as mesmas que apresentaram maiores quantidades de sacarose ao final do período de escuro (Hausler et al., 1998; Hausler et al., 2000). Os resultados desses autores podem ser relacionados ao aumento do conteúdo de sacarose encontrado nas plantas transgênicas ao final do período de escuro, já que, essas plantas apresentam maior conteúdo de amido, ao final do período de luz. Maiores conteúdos de amido nas folhas das plantas transgênicas em relação às plantas selvagens também foram observados por Real (1997) e Pinto (2000).

A Frutose 1,6-bisfosfato (FBP) é encontrada principalmente no estroma (Gerhardt, 1987). Os valores encontrados para FBP foram significativamente maiores ($P = 0.05$) para as plantas transgênicas, reforçando a tendência de compartimentalização dos fotoassimilados em nível de plastídeos por essas plantas, nas condições de alto CO_2 e alta luminosidade da análise.

Tabela 8. Conteúdo dos metabólitos 2-fosfoglicerato (2-PGA), fosfoenolpiruvato (PEP), piruvato (PIR) e 2-oxoglutarato (2-OXO) em nmol mg^{-1} clorofila e malato (MAL) em $\mu\text{mol mg}^{-1}$ clorofila e relação PEP/PIR em mol/mol de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2). As plantas foram cultivadas sob luminosidade intermediária ($250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e analisadas em alto CO_2 (870 ppm) e alta intensidade luminosa ($1250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Os valores referem-se à média de no mínimo três plantas.

Genótipos	2-PGA	PEP	PIR	PEP/PIR	2-OXO	MAL
WTSR1	81,7	72,9	93,0	0,8	60,2	19,6
TR1	63,2 ^{ns}	63,2 ^{ns}	126,4 [*]	0,5	85,5 [*]	40,9 [*]
TR2	51,4 [*]	74,5 ^{ns}	122,6 ^{ns}	0,6	93,9 ^{**}	30,2 ^{ns}
CV%	18,1	16,0	16,1		16,3	28,8

* P = 0.05 e ** P = 0.01 pelo T. de Dunnett. ns = não significativo estatisticamente CV% = coeficiente de variação

A Tabela 8 apresenta os valores encontrados para alguns metabólitos da via glicolítica e do ácido tricarboxílico. A interconversão dos metabólitos 2-fosfoglicerato (2-PGA) e fosfoenolpiruvato (PEP) é feita pela enzima enolase. No citosol, 2-PGA e PEP tendem a um equilíbrio estequiométrico (Taiz & Zaiger, 1998). Partindo desse pressuposto, os valores de 2-PGA e PEP para as plantas transgênicas tendem a ser menores, em comparação com as plantas selvagens. O valor do conteúdo de 2-PGA para o TR2 foi significativamente ($P = 0,05$) menor que o apresentado pelas plantas selvagens. Marcuende (1998) mostrou que em folhas destacadas de tabaco imersas em solução de sacarose, ocorre um estímulo à síntese de ácidos orgânicos. A sacarose induziu um acentuado incremento de 2-oxoglutarato e decréscimo de 2-PGA e PEP. O aumento na concentração de piruvato (PIR) nas transgênicas, com a TR1 apresentando diferença significativa em relação às selvagens e as menores relações PEP/PIR, indicam que provavelmente a enzima regulatória piruvato quinase (PK) está operando como via principal para o fornecimento de substrato para o ciclo dos ácidos tricarboxílicos nessas plantas. Em plantas C_3 , a enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) tem função anaplerótica no fornecimento de ácidos orgânicos para a mitocôndria (Champigny & Foyer, 1992). Os valores de PEPC apresentaram diferenças significativas ($P = 0,01$) entre os genótipos, com as selvagens apresentando maior atividade (Tabela 9).

Malato é um importante inibidor da atividade de PEPC (Chollet et al., 1996). O aumento de malato nas plantas transgênicas (Tabela 8), com TR1 apresentando diferença significativa ($P = 0,05$) em relação às plantas selvagens, reforçam a idéia de que nessas plantas a rota de suprimento de ácidos orgânicos, para a mitocôndria, ocorre via piruvato quinase.

Tabela 9. Atividade da enzima PEPC em $\mu\text{mol h}^{-1}\text{mg}^{-1}$ clorofila e porcentagem de ativação da enzima SPS de plantas selvagens (WTSR1) e transgênicas (TR1 e TR2). As plantas foram cultivadas sob luminosidade intermediária ($250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e analisadas em alto CO_2 (870 ppm) e alta intensidade luminosa ($1250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Os valores referem-se à média de no mínimo quatro plantas.

Genótipos	PEPC	SPS
WTSR1	95,2	78,5
TR1	77,1 ^{**}	80,0 ^{ns}
TR2	78,6 ^{**}	74,2 ^{ns}
CV%	8,2	10,4

^{**} $P = 0.01$ pelo T. de Dunnett. ns = não significativo estatisticamente

CV% = coeficiente de variação

A PEPC é ativa na forma fosforilada e sua atividade está relacionado à demanda de esqueletos de carbono para a assimilação de N (Champigny & Foyer, 1992). O 2-oxoglutarato, formado no ciclo do ácido tricarboxílico, é o composto orgânico que atua como receptor primário para a assimilação do nitrogênio inorgânico, via redução do nitrato e a rota glutamina sintetase - glutamato sintase (GS-GOGAT) (Scheible et al., 2000). De acordo com Muller et al. (2001), a maior parte da amônia que entra na rota da GOGAT é liberada durante a fotorrespiração. Os níveis de 2-oxoglutarato e glutamato são mais estáveis, enquanto glutamina mostra grande variação durante o dia. A estabilidade nos níveis de glutamato e 2-oxoglutarato é importante para permitir uma eficiente reassimilação da amônia (Muller et al., 2001). Os valores do conteúdo de 2-oxoglutarato apresentados na Tabela 8 mostram que há diferenças estatisticamente significativas entre as plantas transgênicas e selvagens. Os menores valores apresentados pelas plantas selvagens podem estar relacionados com a maior demanda por esqueletos

de carbono para a assimilação de nitrogênio. Essa maior demanda por esqueleto de carbono é justificada pela maior atividade da PEPC (Tabela 9) e pelos maiores níveis de aminoácidos solúveis totais encontrados por Brito (2000) nas plantas selvagens em relação às transgênicas.

A introdução do gene *Lhcb1*2* de ervilha em plantas de tabaco selvagens levou a alterações não só no nível fotossintético. A introdução desse gene, resultou em plantas completamente distintas das plantas selvagens. Importantes aspectos precisam ainda ser elucidados no funcionamento destas plantas. Trabalhos recentes têm mostrado o papel de substâncias do metabolismo primário atuando como moléculas sinalizadoras para a expressão de genes e proteínas. Esses trabalhos têm mostrado também, uma grande variação no conteúdo de metabólitos, RNA-mensageiro, proteínas e atividade de rotas durante o ciclo circadiano das plantas. Pelas alterações fisiológicas apresentadas pelas plantas transgênicas, e pela expressão do gene *Lhcb1*2* constitutivamente, uma perspectiva de trabalho futuro seria a avaliação do metabolismo destas plantas durante o período de escuro.

5 CONCLUSÕES

A expressão constitutiva do gene *Lhcb1*2* de ervilha, resultou na redução do processo fotorrespiratório ocasionando alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, importantes nas plantas de tabaco.

- O maior número de folhas, o aumento no diâmetro do caule e extensão do ciclo vegetativo nas plantas transgênicas resultaram em maior produção de massa seca de folhas, caule e parte aérea total.
- As sementes das plantas transgênicas são mais pesadas, apesar de não haver diferença quanto aos demais componentes de produção, como rendimento de sementes, número de frutos e número de sementes por fruto e amido na semente.
- As plantas transgênicas apresentam maior área foliar, maior taxa de crescimento relativo e folhas de menor densidade.
- A relação entre os aminoácidos serina/glicina foi menor nas plantas transgênicas, demonstrando a redução da fotorrespiração.
- A assimilação de CO₂, em alta luz e alto CO₂, não diferiu estatisticamente entre os genótipos avaliados.
- Em alta luz e alto CO₂ as plantas transgênicas apresentaram maiores valores de *NPQ* e *q_p*, o que reflete um mecanismo de proteção do sistema fotossintético diferenciado, sem perda na eficiência do transporte de elétrons.
- A porcentagem de ativação da enzima sacarose fosfato sintase não variou entre os genótipos. Já a enzima fosfoenolpiruvato carboxilase, apresentou maior atividade nas plantas selvagens, o que se reflete no maior conteúdo de aminoácidos solúveis.
- As plantas transgênicas apresentam maiores quantidades de carboidratos totais e amido, independentemente do período do dia avaliado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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, n.5810, p.25-29, 1981.
- ANDERSON, J.M.; ANDERSSON, B. The dynamic photosynthetic membrane and regulation of solar-energy conversion. **Trends in Biochemical Sciences**, v.13, n.9, p.351-355, 1988.
- ANDERSSON, B.; STYRING, S. Photosystem II: Molecular organization, function and acclimation. In: LEE, C. P. (Ed.) **Current topics in bioenergetics**. San Diego: Academic Press, 1992. p.1-81.
- AUSTIN, R.B.; MORGAN, C.L.; FORD, M.A. Flag leaf photosynthesis of triticum-aestivum and related diploid and tetraploid species. **Annals of Botany**, v.49, n.2, p.177-189, 1982.
- BAKER, N. R.; ORT, D. R. Light and photosynthetic performance. In: BAKER, N. R.; THOMAS, H. (Ed.) **Crop photosynthesis**. Amsterdam: Elsevier Science, 1992 p.289-312.
- BANSAL, K. C.; UPRETY, D. C.; ABROL, Y. P. Genetic variation in photosynthetic wheat: causes and consequences. In: ABROL, Y. P.; MOHANTY, P.; GOVINDJEE (Ed.) **Photosynthesis: photoreactions to plant productivity**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1993. cap.22, p.527-545.
- BARBER, J.; CHAPMAN, D.J.; TELFER, A. Characterization of a PS-II reaction center isolated from the chloroplasts of *Pisum sativum* L. **Febs Letters**, v.220, n.1, p.67-73, 1987.
- BARJA, P.R.; LABATE, M.T.V.; GOMES, R.A.J.; KO, K.; BRUGNOLI, E.; AUGUSTI, A.; LABATE, C.A. Constitutive production of pea LHCII type I protein in tobacco triggers multiple responses II : photosynthesis in low and high irradiance and the impact of low photorespiration on thermal dissipation. **Plant Physiology**, 2002. /No prelo/

- BEL, V. A. J. E. Mechanism of sugar transfer. In: BAKER, N. R. ; THOMAS, H. (Ed.) **Crop photosynthesis** . Amsterdam: Elsevier Science, 1992 p.177-211.
- BIELESKI, R.L.; TURNER, N.A. Separation and stimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, v.17, n.2, p.278-293, 1966.
- BLACKMAN, V.H. The compound interest law and plant growth. **Annals of Botany**, v.33, p.353-360, 1919.
- BOLHÀR-NORDENKAMPF, H. R.; OQUIST, G. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: HALL, D. O.; SCURLOCK, J. M. O.; BOLHÀR-NORDENKAMPF, H. R.; LEEGOOD, R. C.; LONG, S. P. (Ed.) **Photosynthesis and production in a changing enviroment: a field and laboratory manual**. London: Chapman & Hall, 1993. cap.12, p.193-206.
- BRIGGS, G.E.; KIDD, F.A.; WEST, C. A quantitative analysis of plant growth. **Annals of Applied Biology**, v.7, p.202-223, 1920.
- BRITO, G.J.M. Estudo da assimilação do nitrato em plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. c.v. Petite Havana SR1) que expressam o gene *LhcbI*2* de ervilha constitutivamente. Piracicaba, 2001. 77p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- BUTLER, W.L. Energy-distribution in photochemical apparatus of photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.29, p.345-378, 1978.
- CAUSTON, D.R. ; VENUS, J. C. **The biometry of plant growth**. London: E. Arnold, 1981. 307p.
- CHAMPIGNY, M.L. Integration of photosynthetic carbon and nitrogen metabolism in higher plants. **Photosynthesis Research**, v.46, n.1, p.117-127, 1995.
- CHAMPIGNY, M.L.; FOYER, C. Nitrate activation of cytosolic protein-kinases diverts photosynthetic carbon from sucrose to amino-acid biosynthesis - basis for a new concept. **Plant Physiology**, v.100, n.1, p.7-12, 1992.
- CHEIKH, N.; BRENNER, M.L. Regulation of key enzymes of sucrose biosynthesis in soybean leaves-Effect of dark and light conditions and role of gibberellins and abscisic-acid. **Plant Physiology**, v.100, n.3, p.1230-1237, 1992.
- CHITNIS, P.R.; THORNER, J.P. The major light-harvesting complex of photosystem II: Aspects of its molecular and cell biology. **Photosynthesis Research**, v.16, n.1, p.41-63, 1988.

- CHOLLET, R.; VIDAL, J.; OLEARY, M.H. Phosphoenolpyruvate carboxylase: A ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.47, p.273-298, 1996.
- CORNIC, G.; BRIANTAIS, J.M. Partitioning of photosynthetic electron flow between CO_2 and O_2 reduction in a C_3 leaf (*Phaseolus-vulgaris* L) at different CO_2 concentrations and during drought stress. **Planta**, v.183, n.2, p.178-184, 1991.
- DOEHLERT, D.C.; HUBER, S.C. Regulation of spinach leaf sucrose phosphate synthase by glucose-6-phosphate, inorganic-phosphate, and pH. **Plant Physiology**, v.73, n.4, p.989-994, 1983.
- DEMMIGADAMS, B. Carotenoids and photoprotection in plants - a role for the xanthophyll zeaxanthin. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v.1020, n.1, p.1-24, 1990.
- FARQUHAR, G.D.; CAEMMERER, S.V.; BERRY, J.A. A biochemical-model of photosynthetic CO_2 assimilation in leaves of C_3 species. **Planta**, v.149, n.1, p.78-90, 1980.
- FERNANDES, M.S.; ROSSIELLO, R.O.P. Mineral nitrogen in plant physiology and plant nutrition. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.14, n.2, p.111-148, 1995.
- FOYER, C.H. **Wiley Series in cell biology - Photosynthesis**. London: Edwards Bittar, 1984. 219p.
- FOYER, C.H. Interactions between electron transport and carbon assimilation in leaves: Coordination of activities and control. In: ABROL, Y. P.; MOHANTY, P.; GOVINDJEE (Ed.) **Photosynthesis: photoreactions to plant productivity**. New Delhi: Oxford & IBH, 1993 p.199-224.
- FOYER, C. H.; GALTIER, N. Source-sink interaction and communication in leaves. In: ZAMSKI, E. ; SCHAFFER, A. A. (Ed.) **Photoassimilate distribution in plants and crops: source-sink relationships**. New York: Marcel Dekker, 1996 p.311-340.
- FRANCIS, C.A.; RUTGER, J.N.; PALMER, A.F.E. A rapid method for plant leaf area estimation in maize (*Zea mays* L.). **Crop Science**, v.9, n.5, p.537-539, 1969.
- FURBANK, R.T.; TAYLOR, W.C. Regulation of photosynthesis in C_3 and C_4 plants - a molecular approach. **Plant Cell**, v.7, n.7, p.797-807, 1995.
- GEIGER, M.; HAAKE, V.; LUDEWIG, F.; SONNEWALD, U.; STITT, M. The nitrate and ammonium nitrate supply have a major influence on the response of photosynthesis, carbon metabolism, nitrogen metabolism and growth to elevated carbon dioxide in tobacco. **Plant Cell and Environment**, v.22, n.10, p.1177-1199, 1999.

- GENTY, B.; HARBINSON, J. Regulation of light utilization for photosynthetic electron transport. In: BAKER, N. R. (Ed.) **Photosynthesis and the environment**. London: Kluwer Academic, 1996. cap.3, p.67-99.
- GENTY, B.; BRIANTAIS, J.M.; BAKER, N.R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron-transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v.990, n.1, p.87-92, 1989.
- GENTY, B.; HARBINSON, J.; BRIANTAIS, J.M.; BAKER, N.R. The relationship between nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence and the rate of photosystem-2 photochemistry in leaves. **Photosynthesis Research**, v.25, n.3, p.249-257, 1990.
- GERHARDT, R.; STITT, M.; HELDT, H.W. Subcellular metabolite levels in spinach leaves - regulation of sucrose synthesis during diurnal alterations in photosynthetic partitioning. **Plant Physiology**, v.83, n.2, p.399-407, 1987.
- GERST, U.; SCHONKNECHT, G.; HEBER, U. ATP and NADPH as the driving-force of carbon-reduction in leaves in relation to thylakoid energization by light. **Planta**, v.193, n.3, p.421-429, 1994.
- GIFFORD, R.M.; THORNE, J.H.; HITZ, W.D.; GIAQUINTA, R.T. Crop productivity and photoassimilate partitioning. **Science**, v.225, n.4664, p.801-808, 1984.
- HAEHNEL, W. Photosynthetic electron-transport in higher-plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.35, p.659-693, 1984.
- HALL, D. O.; LONG, S. P. Photosynthesis and the changing environment. In: HALL, D. O.; SCURLOCK, J. M. O.; BOLHÀR-NORDENKAMPF, H. R.; LEEGOOD, R. C.; LONG, S. P. (Ed.) **Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual**. London: Chapman & Hall, 1993. p.23-27.
- HAUSLER, R.E.; SCHLIEBEN, N.H.; SCHULZ, B.; FLUGGE, U.I. Compensation of decreased triose phosphate phosphate translocator activity by accelerated starch turnover and glucose transport in transgenic tobacco. **Planta**, v.204, n.3, p.366-376, 1998.
- HAUSLER, R.E.; SCHLIEBEN, N.H.; NICOLAY, P.; FISCHER, K.; FISCHER, K.L.; FLUGGE, U.I. Control of carbon partitioning and photosynthesis by the triose phosphate/phosphate translocator in transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). I. Comparative physiological analysis of tobacco plants with antisense repression and overexpression of the triose phosphate/phosphate translocator. **Planta**, v.210, n.3, p.371-382, 2000.

- HAVAUX, M. Stress tolerance of photosystem-II in vivo - Antagonistic effects of water, heat, and photoinhibition stresses. **Plant Physiology**, v.100, n.1, p.424-432, 1992.
- HAVAUX, M. Temperature-dependent modulation of the photoinhibition-sensitivity of photosystem-II in *solanum tuberosum* leaves. **Plant and Cell Physiology**, v.35, n.5, p.757-766, 1994.
- HOAGLAND, D.R. ; ARNON, D. I. **The water culture of growing plants without soil**. Berkeley: University of California, 1950. 75p.
- HORTON, P.; LEE, P. Observation of enhancement and state transitions in isolated intact chloroplasts. **Photosynthesis Research**, v.10, n.3, p.297-302, 1986
- HORTON, P.; RUBAN, A.V. Regulation of photosystem-II. **Photosynthesis Research**, v.34, n.3, p.375-385, 1992.
- HUBER, S.C.; HUBER, J.L. Role of sucrose-phosphate synthase in sucrose metabolism in leaves. **Plant Physiology**, v.99, n.4, p.1275-1278. 1992.
- HUGHES, A.P.; EVANS, G.C. Plant growth and the aerial environment. II. Effects of light intensity on *Impatiens parviflora*. **New Phytologist**, v.61, p.154-174, 1962.
- HUNT, R. **Plant growth curves: the functional approach to plant growth analysis**. London : Edward Arnold , 1982. 248 p.
- JONES, M.G.K.; OUTLAW, W.H.; LOWRY, O.H. Enzymic assay of 10^{-7} to 10^{-14} moles of sucrose in plant-tissues. **Plant Physiology**, v.60, n.3, p.379-383, 1977.
- KARLINNEUMANN, 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 Physiology**, v.88, n.4, p.1323-1331, 1988.
- KEYS, A.J.; SAMPAIO EVSB; CORNELIUS, M.J.; BIRD, I.F. Effect of temperature on photosynthesis and photorespiration of wheat leaves. **Journal of Experimental Botany**, v.28, n.104, p.525-533, 1977.
- KITAJIMA, M.; BUTLER, W.L. Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v.376, n.1, p.105-115, 1975.
- KLECZKOWSKI, L.A. A phosphoglycerate to inorganic phosphate ratio is the major factor in controlling starch levels in chloroplasts via ADP- glucose pyrophosphorylase regulation. **Febs Letters**, v.448, n.1, p.153-156, 1999.

- KO, K.; KO, Z. W.; TURPIN, D. H.; LABATE, C. A.; MOHANTY, N.; GRANELL, A. Overproduction of chlorophyll a/b binding protein enhances photosynthetic activity in transgenic tobacco. In: MURATA, N. (Ed.) **Research in photosynthesis**. Netherlands: Kluwer Academic, 1992. cap.3, p.445-448.
- KRAUSE, G.H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis : the basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.42, p.313-349, 1991.
- KU, M.S.B.; AGARIE, S.; NOMURA, M.; FUKAYAMA, H.; TSUCHIDA, H.; ONO, K.; HIROSE, S.; TOKI, S.; MIYAO, M.; MATSUOKA, M. High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants. **Nature Biotechnology**, v.17, n.1, p.76-80, 1999.
- KUHLBRANDT, W.; WANG, D.N.; FUJIYOSHI, Y. Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. **Nature**, v.367, n.6464, p.614-621, 1994.
- LABATE, C.A.; LEEGOOD, R.C. Influence of low-temperature on respiration and contents of phosphorylated intermediates in darkened barley leaves. **Plant Physiology**, v.91, n.3, p.905-910, 1989.
- LABATE, M.T.V.; KO, K.; KO, Z.W.; PINTO, L.S.R.; BRITO, G.J.M.; REAL, M.J.U.D.; GRANELL, A.; ROMANO, M.R.; BARJA, P.R.; SALVATIERRA, G.R.; LABATE, C.A. Constitutive production of pea LHCII type I protein in tobacco triggers multiple responses I : effects on plant development and the lowering of photorespiration. **Plant Physiology**, 2002. /No prelo/
- LAM, H.M.; COSCHIGANO, K.T.; OLIVEIRA, I.C.; MELOOLIVEIRA, R.; CORUZZI, G.M. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.47, p.569-593, 1996.
- LEA, P. J. Nitrogen Metabolism. In: LEEGOOD, R. C. ; LEA, P. J. (Ed.) **Plant biochemistry and molecular biology**. West Sussex: John Wiley, 1993. cap.7, p.155-180.
- LEA, P. J.; BLACKWELL, R. D. Amonia assimilation, photorespiration and aminoacid biosynthesis. In: HALL, D. O.; SCURLOCK, J. M. O.; BOLHÀR-NORDENKAMPF, H. R.; LEEGOOD, R. C.; LONG, S. P. (Ed.) **Photosynthesis and production in a changing enviroment: a field and laboratory manual**. London: Chapman & Hall, 1993. cap.20, p.313-336.

- LEA, P. J.; ROBINSON, S. A.; STEWART, G. R. The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate, and Asparagine. In: MIFLIN, B. J. ; LEA, P. J. (Ed.) **The biochemistry of plants: intermediary nitrogen metabolism**. San Diego: Academic Press, 1990. cap.4, p.121-152.
- LEA, P.J.; WALLSGROVE, R.M.; MIFLIN, B.J. Photorespiratory nitrogen cycle. **Nature**, v.275, n.5682, p.741-743, 1978.
- LINDBLAD, P.; GUERRERO, M. G. Nitrogen fixation and nitrate reduction. In: HALL, D. O.; SCURLOCK, J. M. O.; BOLHÀR-NORDENKAMPF, H. R.; LEEGOOD, R. C.; LONG, S. P. (Ed.) **Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual**. London: Chapman & Hall, 1993. cap.19, p.299-312.
- LONG, S. P. The significance of light-limiting photosynthesis to crop canopy carbon gain and productivity: a theoretical analysis . In: ABROL, Y. P.; MOHANTY, P.; GOVINDJEE (Ed.) **Photosynthesis: photoreactions to plant productivity**. Dordrecht: Kluwer academic, 1993. cap. 23, p.547-559.
- 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.
- LOWRY, O. ; PASSONNEAU, J. U. **A flexive system of enzymatic analysis**. New York: Academic Press, 1972. 291p.
- MAGALHÃES, A. C. N. Análise quantitativa do crescimento de vegetais. In: FERRI, M. G. (Ed.) **Fisiologia vegetal**. São Paulo: EPU, 1985. cap.1, p.333-350.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. San Diego: Academic Press, 1995. 889p.
- MCCLURE, P.R.; KOCHIAN, L.V.; SPANSWICK, R.M.; SHAFF, J.E. Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots. 1. Effects of nitrate on the membrane-potential. **Plant Physiology**, v.93, n.1, p.281-289, 1990.
- MORCUENDE, R.; KRAPP, A.; HURRY, V.; STITT, M. Sucrose-feeding leads to increased rates of nitrate assimilation, increased rates of alpha-oxoglutarate synthesis, and increased synthesis of a wide spectrum of amino acids in tobacco leaves. **Planta**, v.206, n.3, p.394-409, 1998.
- NANBA, O.; SATOH, K. Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome b-559. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.84, n.1, p.109-112, 1987.

- ORT, D. R.; MELANDRI, B. A. Mechanism of ATP synthesis. In: GOVINDJEE (Ed.) **Photosynthetic energy conversion by plants and bacteria**. New York: Academic Press, 1982 p.537-587.
- PEREIRA, A.R. ; MACHADO, E. C. **Análise quantitativa do crescimento de vegetais**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1987. 33p.
- PETER, G.F.; THORNER, J.P. Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light harvesting pigment-proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v.266, n.25, p.16745-16754. 1991.
- PIMENTEL, C. **Metabolismo de carbono na agricultura tropical**. Seropédica: Edur, 1998. 159p.
- PINTO, L.S.R.C. Avaliação do metabolismo fotossintético de plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que expressam o gene *lhcl*2* constitutivamente, em condições de alta luminosidade. Piracicaba, 2000. 140 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- PORRA, R.J.; THOMPSON, W.A.; KRIEDEMANN, P.E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous-equations for assaying chlorophyll-a and chlorophyll-b extracted with 4 different solvents - Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic-absorption spectroscopy. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v.975, n.3, p.384-394, 1989.
- QUEBEDEAUX, B.; HARDY, R. W. F. Oxygen concentration: regulation of crop growth and productivity. In: BURRIS, R. H. ; BLACK, C. C. (Ed.) **CO₂ metabolism and plant productivity**. Baltimore: University Park Press, 1976 p.185-204.
- QUICK, W.P.; STITT, M. An examination of factors contributing to non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in barley leaves. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v.977, n.3, p.287-296, 1989.
- RADFORD, P.J. Growth analysis formulae: Their use and abuse. **Crop Science**, v.7, n.3, p.171-175, 1967.
- REAL, M.J.U.D. Efeito do aumento do complexo protéico clorofila a/b no metabolismo fotossintético de plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). Piracicaba, 97. 150p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- REIS, G.G. ; MULLER, M. W. **Análise de crescimento de plantas e mensuração do crescimento**. Belém: CPATU, 1979. 35 p.
- RICHTER, G. **Métabolisme des végétaux: physiologie et biochimie**. Lousanne: Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, 1993. 526p.

- ROBINSON, J.M. Does O₂ photoreduction occur within chloroplasts invivo. **Physiologia Plantarum**, v.72, n.3, p.666-680, 1988.
- RODRIGUES, M. A. A. **Definição e ocorrência de fotoinibição**. <http://www.iq.ufrj.br/~almenara/fotoinibicao.html> (23 Jul. 1998)
- SCHEIBLE, W.R.; LAUERER, M.; SCHULZE, E.D.; CABOCHE, M.; STITT, M. Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. **Plant Journal**, v.11, n.4, p.671-691, 1997a.
- SCHEIBLE, W.R.; GONZALEZFONTES, A.; LAUERER, M.; MULLERROBER, B.; CABOCHE, M.; STITT, M. Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. **Plant Cell**, v.9, n.5, p.783-798, 1997b.
- RUIZ, J.M.; RIVERO, R.M.; GARCIA, P.C.; BAGHOUR, M.; ROMERO, L. Role of CaCl₂ in nitrate assimilation in leaves and roots of tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L). **Plant Science**, v.141, n.2, p.107-115, 1999.
- SCHREIBER, U.; BILGER, W.; NEUBAUER, C. Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: SCHULZE, E. D. ; CALAWELL, M. M. (Ed.) **Ecophysiology of photosynthesis**. London: Springer-Verlag, 1994. p.49-69.
- SCHREIBER, U.; REISING, H.; NEUBAUER, C. contrasting ph-optima of light-driven O₂-reduction and H₂O₂- reduction in spinach-chloroplasts as measured via chlorophyll fluorescence quenching. **Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences**, v.46, n.7, p.635-643, 1991.
- SCHREIBER, U.; SCHLIWA, U.; BILGER, W. Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. **Photosynthesis Research**, v.10, n.1, p.51-62, 1986.
- SILVERTHORNE, J.; TOBIN, E.M. Demostration of transcriptional regulation of specific genes by phytochrome action. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences**, v.81, n.4, p.1112-1116, 1984.
- SONNEWALD, U.; LERCHL, J.; ZRENNER, R.; FROMMER, W. manipulation of sink-source relations in transgenic plants. **Plant Cell and Environment**, v.17, n.5, p.649-658, 1994.
- SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel-electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, v.98, n.3, p.503-517, 1975.

- STITT, M. Fructose-2,6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.41, p.153-185, 1990.
- STITT, M. Rising CO₂ levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. **Plant Cell and Environment**, v.14, n.8, p.741-762, 1991.
- STITT, M. Metabolic regulation of photosynthesis. In: BAKER, N. R. (Ed.) **Photosynthesis and the environment**. London: Kluwer Academic, 1996. cap.6, p.151-190.
- STITT, M.; VONSCHAEWEN, A.; WILLMITZER, L. Sink regulation of photosynthetic metabolism in transgenic tobacco plants expressing yeast invertase in their cell-wall involves a decrease of the calvin-cycle enzymes and an increase of glycolytic-enzymes. **Planta**, v.183, n.1, p.40-50, 1991.
- STITT, M.; WIRTZ, W.; HELDT, H.W. Regulation of sucrose synthesis by cytoplasmic fructosebisphosphatase and sucrose phosphate synthase during photosynthesis in varying light and carbon-dioxide. **Plant Physiology**, v.72, n.3, p.767-774, 1983.
- TAIZ, L. ; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Sunderland: Sinauer Associates, 1998. 792p.
- THORNBUR, J. P. Biochemical characterization and structure of pigment-proteins of photosynthetic organisms. In: STAEHELIN, C. J. ; ARNTZEN, C. J. (Ed.) **Encyclopedia of plant physiology: photosynthesis III; photosynthetic membranes and light harvesting systems**. Berlin: Springer-Verlag, 1996. cap.19, p.98-142.
- TISCHNER, R. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. **Plant Cell and Environment**, v.23, n.10, p.1005-1024, 2000.
- VANKOOTEN, O.; SNEL, J.F.H. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. **Photosynthesis Research**, v.25, n.3, p.147-150, 1990.
- VERNON, L.P. Spectrophotometric determination of chlorophylls and pheophytins in plant extracts. **Analytical Chemistry**, v.32, n.9, p.1144-1150, 1960.
- VONCAEMMERER, S.; FARQUHAR, G.D. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas-exchange of leaves. **Planta**, v.153, n.4, p.376-387, 1981.
- WALKER, D.A.; SIVAK, M.N. Photosynthesis and phosphate - a cellular affair. **Trends in Biochemical Sciences**, v.11, n.4, p.176-179, 1986.
- WEINER, H.; MCMICHAEL, R.W.; HUBER, S.C. Identification of factors regulating the phosphorylation status of sucrose-phosphate syntase in vivo. **Plant Physiology**, v.99, n.4, p.1435-1442, 1992.

- WESTHOFF, P.; GRUNE, H.; SCHRUBAR, H.; OSWALD, A.; STREUBEL, M.; LJUNGBERG, U.; HERRMAN, R. G. Mechanisms of plastid and nuclear gene expression during thylakoid membrane biogenesis in higher plants. In: SCHEER, H. ; SCHEIDER, S. (Ed.) **Photosynthetic light-harvesting systems organization and function**. London: Springer-Verlag, 1988. p.261-276.
- WHITE, M.J.; FRISTENSKY, B.W.; FALCONET, D.; CHILDS, L.C.; WATSON, J.C.; ALEXANDER, L.; ROE, B.A.; THOMPSON, W.F. Expression of the chlorophyll a/b protein multigene family in pea (*Pisum sativum* L.) - Evidence for distinct developmental responses. **Planta**, v.188, n.2, p.190-198, 1992.
- YAMAYA, T.; OAKS, A. Synthesis of glutamate by mitochondria - an anaplerotic function for glutamate-dehydrogenase. **Physiologia Plantarum**, v.70, n.4, p.749-756, 1987.
- YU, J.W.; WOO, K.C. Glutamine transport and the role of the glutamine translocator in chloroplasts. **Plant Physiology**, v.88, n.4, p.1048-1054, 1988.
- ZEEMAN, S.C.; AP REES, T. Changes in carbohydrate metabolism and assimilate export in starch-excess mutants of Arabidopsis. **Plant Cell and Environment**, v.22, n.11, p.1445-1453, 1999.