

AMANDA DE SANTANA LOPES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FISIOLÓGICA DE PLANTAS
TRANSPLASTÔMICAS DE TABACO EXPRESSANDO DESSATURASES DE
CIANOBACTÉRIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

L864c
2014

Lopes, Amanda de Santana, 1990-
Caracterização molecular e fisiológica de plantas
transplastômicas de tabaco expressando dessaturases de
cianobactéria. / Amanda de Santana Lopes. – Viçosa, MG, 2014.
vii, 68f : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Marcelo Rogalski.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.55-67.

1. Fitotecnia. 2. Plantas transgênicas - Ácidos graxos -
Metabolismo. 3. Transformação plastidial. 4. Tabaco.
5. Cianobactéria . I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-graduação
em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 631.5233

AMANDA DE SANTANA LOPES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FISIOLÓGICA DE PLANTAS
TRANSPLASTÔMICAS DE TABACO EXPRESSANDO DESSATURASES DE
CIANOBACTÉRIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de julho de 2014

Andrea Mariana Giordano

Dimas Mendes Ribeiro

Adriano Nunes Nesi
(Coorientador)

Alice Pita Barbosa
(Coorientadora)

Marcelo Rogalski
(Orientador)

*À minha família,
Dedico.*

*“Não te desampares a benignidade e a fidelidade; ata-as ao pescoço;
escreve-as na tábua do teu coração e acharás graça e boa
compreensão diante de Deus e dos homens.”*

(Provérbios 3 - Bíblia)

AGRADECIMENTOS

A Deus, a Palavra Viva, que é desde a eternidade e sempre será a Fonte de Vida e Amor. Agradeço pela graça de desfrutar da Sua Santa Presença em minha vida.

À minha mãe (Edilza), minha irmã (Dielle, nonza!), meu cunhado (Thiago) e nossa querida Nina, sem vocês minha vida não teria tantas aventuras, confusões e alegrias! Amo vocês!

Aos queridos amigos de longa data, Débora, Léa e Toninho, pelo carinho, atenção e sábios conselhos.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal pela oportunidade e pelo suporte dado ao ensino e pesquisa.

À Capes pela concessão de bolsa de estudos.

Ao Prof. Marcelo Rogalski pela orientação atenciosa, por instigar o pensamento crítico nas discussões científicas e também pela amizade.

Ao Prof. Adriano Nunes Nesi e Dr. Alice Pita Barbosa, co-orientadores, pelas valiosas contribuições neste trabalho.

Ao Prof. Dimas Mendes Ribeiro e PhD. Andrea Mariana Giordano, pelo aceite em integrar a banca examinadora deste trabalho.

Aos meus colegas e amigos que me auxiliaram direta ou indiretamente na condução dos experimentos e análise de dados: Alice, Ana Carla, Dalton, David, Danielle Brito, Daniele Vidal, Franklin, Fernanda, Giuliana, Izabel, Kelly, Mireli, Renan e Túlio.

Aos membros do grupo do Prof. Marcelo Rogalski e do Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas pelo convívio e amizade.

Ao Prof. Fábio DaMatta, Prof. Marcelo Loureiro, Prof. Márcio Aredes e Prof. Raimundo Barros pela disponibilização de equipamentos e outras contribuições essenciais para a condução desta pesquisa.

A todos os professores que me deram aula, por compartilharem o conhecimento essencial para a minha formação acadêmica.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Vegetal, em especial Toninho, Carlos, Mercês e Luciene.

A todos, muito obrigada!

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	8
2.1 Material Vegetal	8
2.2 Condições de cultivo	12
2.3 Confirmação da homoplasma e herança materna do plastoma	12
2.4 Identificação dos transgenes por PCR	12
2.5 Parâmetros de fluorescência e trocas gasosas	13
2.6 Coleta de material vegetal e avaliação do crescimento	13
2.7 Análise de expressão gênica por PCR em Tempo Real	14
2.8 Análise de ácidos graxos	17
2.9 Análises bioquímicas	19
2.10 Estresse por temperatura	22
2.11 Delineamento experimental e análise estatística	23
3. RESULTADOS	24
3.1 Eficiência da transformação plastidial, herança dos transgenes e identificação das dessaturases de cianobactéria	24
3.2 Análise de crescimento das plantas cultivadas em casa de vegetação	25
3.3 Análise de expressão dos transgenes	27
3.4 Expressão de genes relacionados ao metabolismo de ácidos graxos	28
3.5 Conteúdo e perfil de ácidos graxos em folhas	31
3.6 Conteúdo e perfil de ácidos graxos em sementes	33
3.7 Análises bioquímicas	34
3.8 Avaliação do desempenho fotossintético	37
3.9 Tolerância a estresse por temperaturas alta e baixa	38
4. DISCUSSÃO	41
4.1 Transformação plastidial e expressão diferencial dos transgenes	41
4.2 A expressão do transgene <i>desB</i> em plastídios de tabaco resultou em acúmulo de ácidos graxos e menor crescimento	42
4.3 A expressão dos transgenes <i>desC</i> e <i>desA</i> em plastídios de tabaco não resultou em alterações moleculares, bioquímicas ou fisiológicas significativas	48

4.4 Perfil similar de ácidos graxos resultou em similar desempenho em condições de estresse por alta ou baixa temperatura	52
5. CONCLUSÃO	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXOS	68

RESUMO

LOPES, Amanda de Santana, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2014.
Caracterização molecular e fisiológica de plantas transplastômicas de tabaco expressando dessaturases de cianobactéria. Orientador: Marcelo Rogalski.
Coorientadores: Adriano Nunes Nesi e Alice Pita Barbosa.

Ácidos graxos de origem vegetal são as principais fontes de energia para a dieta humana, e configuram-se fontes potenciais de matéria-prima renovável para a indústria. Contudo, um fornecimento ideal para tais demandas, requer perfis distintos de insaturação de ácidos graxos, o que tem se tentado alcançar por meio da engenharia genética das vias de biossíntese e modificação de ácidos graxos, destacando-se as enzimas dessaturases responsáveis pela produção de ácidos graxos insaturados. Neste cenário o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a eficiência do uso da transformação plastidial em plantas de tabaco para expressar os genes *desC*, *desA* e *desB* de cianobactéria, os quais codificam as enzimas $\Delta 9$, $\Delta 12$ e $\Delta 15$ dessaturases, respectivamente. Os dados indicam que a expressão dos transgenes *desC* e *desA* em plastídios de plantas de tabaco, ainda que em níveis muito acima das dessaturases endógenas, resulta em pouco efeito sobre o conteúdo e perfil de ácidos graxos em folhas ou em sementes e por conseguinte nos demais parâmetros bioquímicos e fisiológicos avaliados. Por outro lado, a expressão do transgene *desB*, ainda que os transcritos tenham sido detectados em baixos níveis, resultou em um maior acúmulo de ácidos graxos em folhas de plantas com 8 semanas, embora sem alteração no perfil de ácidos graxos, com efeitos negativos sobre os teores de sacarose e amido e sobre o acúmulo de biomassa na raiz e na parte aérea. Em adição, elevadas taxas fotossintéticas, de respiração e de fluxo de elétrons no FSII foram registradas em folhas completamente expandidas o que pode estar relacionado a uma maior demanda por assimilados para alimentar a biossíntese de ácidos graxos. Em conjunto os dados apontam para uma fina regulação do perfil de insaturação em plantas de tabaco, possivelmente em nível pós-transcricional, e que o acúmulo de ácidos graxos em folhas pode afetar o crescimento da planta como um todo. Além disso, nossos resultados sugerem um controle da biossíntese *de novo* de ácidos graxos induzido pela atividade da enzima $\Delta 15$ desaturase, a qual é a última enzima envolvida na produção de ácidos graxos poliinsaturados nos plastídios.

ABSTRACT

LOPES, Amanda de Santana, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2014.
Molecular and physiological characterization of transplastomic tobacco plants expressing cyanobacterial desaturases. Adviser: Marcelo Rogalski. Co-advisers: Adriano Nunes Nesi and Alice Pita Barbosa.

Plant fatty acids are the main energetic resources for human diet and are potential renewable feedstock resources for different areas of industry. Nevertheless, for an ideal supply for such demands, distinct fatty acid profiles are required. Different strategies to reach specific fatty acid profiles have been studied by genetic engineering of the fatty acid biosynthesis and modification enzymes, focusing mainly on desaturases, which are the enzymes responsible for production of unsaturated fatty acids. In this scenario the present study aimed to evaluate the efficiency of the use of plastid transformation of tobacco plants to express cyanobacterial genes, *desC*, *desA* and *desB*, which encode $\Delta 9$, $\Delta 12$ and $\Delta 15$ desaturases, respectively. The data indicate that the expression of *desC* and *desA* cyanobacterial genes in plastids of tobacco plants, although the transcripts have accumulated at higher levels in comparison with endogenous desaturases, it resulted in little effect on the fatty acid content and profile in leaves or seeds and, consequently, on phenotypic, biochemical and physiological parameters evaluated. On the other hand, the expression of *desB* transgene, even at low transcript level, resulted in an increase of fatty acid accumulation in leaves of 8 weeks old plants, while the fatty acid profile was unchanged. *pSdesB* plants showed reduced sucrose and starch content, and, as a consequence, less shoot and root biomass accumulation. In addition, high photosynthetic, respiration and electron transport rates were observed in fully expanded leaves, which may be related to the enhanced demand of photosynthetic assimilates to feed the fatty acid biosynthesis. Taken together, the data suggest a fine regulation of the unsaturation profile in tobacco plants, possibly at post-transcriptional level. Interestingly, changes in fatty acid accumulation in leaves can affect significantly plant metabolism and whole plant growth. Moreover, our data suggest that fatty acid biosynthesis *de novo* could be induced by activity of $\Delta 15$ desaturase, which is the last enzyme involved in fatty acid unsaturation in plastids.

1. Introdução

Ácidos graxos são ácidos carboxílicos contendo uma cadeia hidrocarbonada que confere a tais compostos um caráter hidrofóbico (Nelson e Cox, 2008). Suas funções nas células vegetais são de naturezas diversas, atuando como componentes estruturais de membranas biológicas (Dowhan et al., 2008), precursores de moléculas sinalizadoras (Weber, 2002; Wasternack, 2007), reservas de carbono e energia (Mu et al., 2008; Baud e Lepiniec, 2010) e também servindo como barreiras hidrofóbicas sobre a superfície de células epidérmicas na forma de lipídeos cuticulares (Kunst e Samuels, 2009). As plantas são os organismos responsáveis pela produção de grande parte dos lipídeos biológicos no mundo, e muitos animais, incluindo o homem, são dependentes do consumo desses lipídeos como a principal fonte de energia e ácidos graxos essenciais (Gunstone, 2001; Schmid e Ohlrogge, 2008) tais como os ácidos graxos poli-insaturados ω -6 e ω -3, ácidos linoleico (LA) e α -linolênico (ALA), respectivamente (Graham et al., 2004; Burdge e Calder, 2005).

Uma dieta saudável de ácidos graxos deve manter uma relação de consumo de ácidos graxos ω -6 e ω -3 de no máximo 5:1 (Sargent, 1997). Todavia, esses valores têm sido desviados significativamente em direção aos ácidos graxos ω -6 nas dietas atuais, e de acordo com algumas estimativas, estão mais do que 30 vezes superiores aos valores recomendados (Simopoulos, 1999). Em função da importância dos ácidos poli-insaturados para a saúde humana, muitos esforços têm sido empregados no sentido de aumentar a produção desses ácidos graxos pelas plantas (Haslan et al., 2013), uma vez que a maior parte do consumo de lipídeos na dieta humana advém das reservas lipídicas de culturas oleaginosas comerciais (Gunstone, 2001) cujo perfil básico de ácidos graxos abrange apenas os ácidos graxos saturados palmítico e láurico, e os ácidos oleico e linoleico contendo uma e duas insaturações, respectivamente (Lands, 2005).

Além da importância nutricional, ácidos graxos de origem vegetal também constituem fontes valiosas de matérias-primas para a indústria e como um substituto das atuais fontes petroquímicas não sustentáveis (Vanhercke et al., 2013). Entretanto, perfis distintos de ácidos graxos são requeridos para cada demanda, nutricional ou industrial, o que tem se tentado alcançar por meio da engenharia genética das vias de biossíntese e modificação de ácidos graxos, destacando-se as enzimas dessaturases responsáveis pela produção de ácidos graxos insaturados (Rogalski e Carrer, 2011; Vanhercke et al., 2013). Porém, a produção de plantas geneticamente modificadas no sentido de alterar o

metabolismo de ácidos graxos nem sempre tem apresentado um padrão previsível (Vanhercke et al., 2013). Assim, destaca-se a necessidade de se conhecer com mais profundidade a via de biossíntese de ácidos graxos e sua interação com outras vias dependentes como a síntese de glicerolípídeos de membranas, triglicerídeos de reserva, ceras, moléculas sinalizadoras e, principalmente, como essa interação metabólica é regulada na planta como um todo (Haslam et al., 2012; Baud, 2013; Vanhercke et al., 2013).

A síntese *de novo* de ácidos graxos nas plantas ocorre nos plastídios e inicia-se com a síntese de malonil-CoA a partir de acetil-CoA pela acetil-CoA carboxilase (ACCase) que comumente, na grande maioria das eudicotiledôneas, apresenta-se como um complexo proteico heteromérico, do tipo procarioto (Sasaki e Nagano, 2004). A ACCase plastidial catalisa uma etapa comprometida com a síntese de ácidos graxos, uma vez que o malonil-CoA produzido nos plastídios é destinado exclusivamente para a produção da cadeia hidrocarbonada dos ácidos graxos por meio da atuação do sistema multienzimático da ácido graxo sintase (FAS) do tipo II, também do tipo procarioto (Heldt e Piechulla, 2011). O sistema FAS produz cadeias de ácidos graxos saturados de 16 e de 18 carbonos (16:0 e 18:0) esterificadas à proteína carreadora de grupos acil (ACP), sendo os ácidos graxos 18:0-ACP (estearoil-ACP) substratos para uma estearoil-ACP $\Delta 9$ desaturase solúvel no estroma a qual insere uma insaturação no carbono 9 da cadeia acila produzindo 18:1-ACP (oleil-ACP). Posteriormente, cadeias de acil-ACP são hidrolisadas por acil-ACP tioesterases liberando ácidos graxos livres, os quais por sua vez podem ser direcionados para o retículo endoplasmático, onde são usados, por exemplo, para a síntese de lipídios de membrana, triacilgliceróis e cutina, ou podem permanecer no plastídio e contribuir para a via procariótica de síntese de glicerolípídeos (Schmid e Ohlrogge, 2008; Baud, 2013). Além da estearoil-ACP $\Delta 9$ desaturase solúvel presente no estroma de plastídios, plantas também possuem dessaturases transmembranas localizadas nos plastídios e no retículo endoplasmático, as quais utilizam ácidos graxos esterificados a diacilglicerol como substrato (Heldt e Piechulla, 2011).

Apesar de se conhecer em detalhes a via de biossíntese *de novo* de ácidos graxos em plantas, pouco se conhece sobre os fatores que regulam a via e em que nível, se transcricional, pós-transcricional, traducional ou pós-traducional, essa via é regulada. Padrões de expressão de genes da biossíntese de ácidos graxos obtidos através de microarranjo de DNA têm indicado que muitas enzimas da via são co-reguladas em

nível transcricional (Schmid et al., 2005; Mentzen et al., 2008). Contudo, até agora, somente os fatores de transcrição WRINKLED (WRI) 1, 3 e 4 têm sido identificados e caracterizados como reguladores positivos da expressão de genes relacionados à biossíntese de ácidos graxos (Cernac e Benning, 2004; To et al., 2012), cuja expressão e atuação ocorre principalmente nas sementes em maturação, WRI1, e em tecidos florais em desenvolvimento, WRI 1, 2 e 3 (To et al., 2012). Expressão ectópica de *WRI1* de *Arabidopsis thaliana* em tabaco, em combinação com a superexpressão de diacilglicerol acil-transferase1 (Vanhercke et al., 2013) e de oleosina (Vanhercke et al., 2014) tem resultado em aumento significativo no conteúdo de triacilglicerol em folhas. Acúmulo de triacilglicerol também foi obtido em tecido vegetativo de plantas de tabaco transgênicas com expressão induzida do fator de transcrição *LEC2* (*LEAFY COTYLEDON 2*) de *A. thaliana*, um regulador chave da maturação de sementes e acúmulo de óleo (Andrianov et al., 2010).

Além da regulação transcricional, pesquisas tem sido realizadas a respeito da regulação da atividade enzimática com foco na ACCase plastidial, uma vez que a mesma catalisa a etapa comprometida com a biossíntese de ácidos graxos (Cronan e Waldrop, 2002). Em tecidos verdes, a síntese de ácidos graxos é estimulada pela luz, mediante ativação da ACCase heteromérica presente nos cloroplastos pelo aumento do pH e da concentração de íons de magnésio e também por ativação redox mediante atuação do sistema redutor ferredoxina-tiorredoxina (Geigenberger et al., 2005; Heldt e Piechulla, 2011; Sasaki e Nagano, 2004). Outros reguladores da atividade da ACCase heteromérica também tem sido apresentados em trabalhos recentes. Trabalhos realizados por Bourrelier et al. (2010) sugerem inibição da atividade da ACCase pela proteína PII, sendo esta completamente revertida na presença dos ácidos carboxílicos 2-oxoglutarato, oxaloacetato e piruvato. Além disso, evidências recentes sugerem a existência de uma regulação por retroalimentação negativa da atividade da ACCase pelo produto final 18:1-ACP (oleil-ACP) acumulado nos plastídios (Andre et al., 2012).

Para obter êxito e alcançar os objetivos propostos para alteração do metabolismo de lipídios em plantas e dessa forma potencializar a produção de ácidos graxos de interesse para a indústria, alimentação ou com fim de biocombustível, é também essencial discernir o papel dos diferentes tipos de ácidos graxos na produção de moléculas sinalizadoras, como essa via de biossíntese é desencadeada e quais são as consequências de sua produção. Ácidos graxos poli-insaturados, por exemplo, de grande interesse nutricional, são também importantes precursores de moléculas sinalizadoras

tais como derivados oxigenados denominados coletivamente de oxilipinas, como os jasmonatos (Weber, 2002; Gregg, 2004; Kachroo e Kachroo, 2009; McConn e Browse, 1996). O ácido jasmônico e seus derivados (metil jasmonato, cis-jasmona e jasmonato conjugado a isoleucina, por exemplo) são as moléculas sinalizadoras derivadas de ácidos graxos mais bem estudadas em plantas. A síntese de jasmonatos inicia-se com a mobilização do ácido graxo α -linolênico (ALA - $18:3\Delta^{9,12,15}$) esterificado a monogalactosil diacilgliceróis, componentes das membranas plastidiais, pela ação de lipases (Wasternack e Hause, 2013). Ainda nos plastídios, o ácido graxo trienóico ALA é convertido à ciclopentenona OPDA (ácido 12-oxo-fitodienóico), a qual é posteriormente reduzida a ciclopentanonas e β -oxidada a ácido jasmônico nos peroxissomos (Weber, 2002; Gregg, 2004; Wasternack e Hause, 2013). Além da função bem caracterizada indutora de genes relacionados à defesa, jasmonatos também regulam diversos processos do desenvolvimento vegetativo e reprodutivo das plantas tais como desenvolvimento de órgãos florais, senescência e inibição da germinação de sementes, do crescimento da raiz e da parte aérea (Jung et al., 2007; Wasternack, 2007; Chen et al., 2011; Wasternack e Hause, 2013). Outras oxilipinas também atuantes como moléculas sinalizadoras são os ácidos graxos ceto, hidroxí e hidroperoxidados. Essas oxilipinas são produzidas via diferentes lipoxigenases a partir de ácidos graxos dienóicos e trienóicos, e atuam como reguladores de genes relacionados à defesa contra patógenos, ao estresse oxidativo e morte celular (Weber, 2002).

Não obstante à atuação indireta em processos regulatórios na forma de precursor de moléculas sinalizadoras, alguns trabalhos tem sugerido um papel mais direto como regulador para determinados ácidos graxos. Nesse aspecto, mais uma vez é notável a importância dos ácidos graxos contendo insaturações para o funcionamento celular. Kachroo et al. (2003), por exemplo, através de um elegante estudo com mutantes duplos e triplos usando como pano de fundo o mutante *ssi2* (deficiente em estearoil-ACP $\Delta 9$ dessaturase) de *A. thaliana*, identificaram a necessidade de ácido oleico ($18:1\Delta^9$) livre no estroma de plastídios para a ativação de algumas respostas mediadas por jasmonatos e para a repressão da via de resposta do ácido salicílico. A presença de ácidos graxos insaturados nos lipídios de membranas de cianobactérias e de plantas é também imprescindível para a proteção dos complexos fotossintéticos contra o estresse luminoso e salino, e medeia a tolerância a altas e baixas temperaturas (Los et al., 2013; Moon et al., 1995). Ainda, experimentos recentes com mutantes com perda de função de dessaturases em *A. thaliana* têm demonstrado haver requerimentos específicos pelo

ácido graxo trienoico ALA para a manutenção da fotossíntese e do crescimento de plantas de *Arabidopsis* a temperaturas mais elevadas (Routaboul et al., 2012). Ácidos graxos poli-insaturados também têm sido caracterizados como moduladores da resposta de canais iônicos em células animais (Boland e Drzewiecki, 2008), e mais recentemente, em células vegetais (Gutla et al., 2012).

Em adição às informações obtidas através do estudo de mutantes com alterados perfis de ácidos graxos, como mutações com perda de função em genes codificantes de dessaturases (Kacharoo et al., 2001; Kacharoo et al., 2003; Routaboul et al., 2012), resultados interessantes têm sido fornecidos através da análise dos fenótipos apresentados por plantas com o metabolismo de ácidos graxos alterado, seja por inserção de transgenes, ou por superexpressão de genes endógenos relacionados. Madoka et al. (2002), por exemplo, ao superexpressarem o gene plastidial *accD* em plantas de tabaco, obtiveram como resultado um leve aumento no conteúdo de ácidos graxos nas folhas e um curioso aumento na longevidade das folhas e na produtividade de semente, embora estas apresentassem um conteúdo de ácidos graxos similar ao tipo selvagem.

Tentativas de modificar o perfil de ácidos graxos em plantas pela inserção de dessaturases de outros organismos também têm apresentado resultados interessantes. A expressão específica em sementes da dessaturase FAT-5 (uma palmitoil-lipídeo $\Delta 9$ dessaturase) de *Caenorhabditis elegans* em *A. thaliana* por transformação nuclear, por exemplo, reduziu o conteúdo do ácido graxo saturado 16:0 (ácido palmítico) paralelo ao aumento do conteúdo de 16:1 nas sementes, como previsto (Fahy et al., 2012). Houve, em contrapartida, uma inesperada redução no conteúdo total de ácidos graxos nas sementes. Diferentemente, a expressão, independente, de duas $\Delta 9$ dessaturases em plastídios de plantas de tabaco não resultou em grandes alterações no perfil de ácidos graxos individuais, apenas um leve aumento no conteúdo de 18:3 e diminuição de 18:2 nas folhas e um pequeno aumento no conteúdo de 18:2 nas sementes, sem alterações no teor de ácidos graxos totais (Craig et al., 2008). Esses trabalhos sugerem a existência de uma fina regulação da composição e do conteúdo de ácidos graxos nas plantas, o que é corroborado com a semelhança tanto morfológica quanto no nível de ácido oleico (18:1) de plantas superexpressando a esteroil-ACP $\Delta 9$ dessaturase em comparação com plantas do tipo selvagem (Kacharoo et al., 2007). Ademais, Kacharoo et al. (2007) demonstraram também que o nível de transcritos das isoformas da esteroil-ACP $\Delta 9$ dessaturase é reduzido em plantas com alto teor de 18:1 e que a atividade das mesmas é

inibida pelo próprio produto (18:1-ACP). A partir deste conjunto de informações expostas, nota-se que ainda existe um vasto campo a ser descoberto no que se refere ao metabolismo vegetal de lipídeos, sua regulação e consequências da manipulação da via de biossíntese sobre o conteúdo e perfil de ácidos graxos.

Grande parte dos trabalhos de manipulação da via de biossíntese de ácidos graxos tem feito uso da transformação nuclear para superexpressão de genes endógenos ou expressão heteróloga. Entretanto, com o advento da tecnologia de transformação plastidial, novas possibilidades de alteração dessa importante via metabólica surgem (Rogalski e Carrer, 2011), visto que os plastídios são organelas centrais na biossíntese de ácidos graxos. Todavia, apenas dois trabalhos foram publicados até a presente data relacionados com a manipulação genética da via metabólica supracitada através da transformação plastidial, são eles a expressão heteróloga de $\Delta 9$ dessaturases (Craig et al., 2008) e a superexpressão do gene *accD* (Madoka et al., 2002) em plantas de tabaco.

Nas últimas décadas a transformação de cloroplastos tem atraído o interesse de pesquisadores, uma vez que a mesma oferece várias características excepcionais quando comparada com a transformação nuclear (Maliga e Bock, 2011; Rogalski e Carrer, 2011). Elas incluem altos níveis de expressão do transgene, acúmulo da proteína de interesse a níveis superiores a 70% do total de proteína solúvel celular (Oey et al., 2009; Ruhlman et al., 2010); capacidade para inserção e expressão de vários genes em apenas um evento devido a tradução eficiente de mRNAs policistrônicos (Quesada-Vargas et al., 2005; Krichevsky et al., 2010); ausência de efeito de posição para inserção do transgene devido à falta de estrutura compacta de cromatina no genoma plastidial (Bock, 2001); integração eficiente e precisa dos transgenes através de recombinação homóloga (Cerutti et al., 1992); ausência de efeitos epigenéticos e de silenciamento de genes (Bock, 2001); e ausência da transmissão dos transgenes via pólen devido a herança materna na maioria das plantas superiores (Ruf et al., 2007; Svab e Maliga, 2007).

Neste cenário, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a eficiência do uso da transformação plastidial para expressar genes que codificam dessaturases de cianobactéria em plastídios de plantas de tabaco e estudar o efeito da expressão dos mesmos sobre o conteúdo e perfil de ácidos graxos em folhas e sementes, assim como avaliar características moleculares e fisiológicas apresentadas por tais plantas. As dessaturases inseridas no genoma plastidial foram as $\Delta 9$, $\Delta 12$ e $\Delta 15$, as quais atuam sequencialmente na inserção da primeira, da segunda e da terceira dupla

ligação em ácidos graxos de 18 carbonos (Sakamoto et al., 1994a; Sakamoto et al., 1994b; Sakamoto et al., 1994c). Uma vez que dessaturases de cianobactérias são monoxigenases que utilizam a ferredoxina reduzida como doador de elétrons (Los e Murata, 1998), assim como as dessaturases plastidiais de plantas, a atividade das dessaturases de cianobactéria em plastídios é favorecida pela disponibilidade de ferredoxina reduzida produzida pela etapa fotoquímica da fotossíntese (Heldt e Piechulla et al., 2011). Os dados indicam que a expressão de $\Delta 9$ e $\Delta 12$ dessaturases de cianobactérias em plastídios de plantas de tabaco, ainda que em níveis muito acima das dessaturases endógenas, resulta em pouco efeito sobre o conteúdo e perfil de ácidos graxos. No entanto, a expressão da $\Delta 15$ dessaturase de cianobactéria resultou em um maior acúmulo de ácidos graxos nas folhas, embora sem alteração no perfil, concomitante a reduzidos teores de sacarose e amido e menor acúmulo de biomassa na raiz e na parte aérea. Em conjunto os dados apontam para uma fina regulação do perfil de instauração em plantas, possivelmente em nível pós-transcricional, e que o acúmulo de ácidos graxos em folhas pode ser induzido pela expressão de $\Delta 15$ dessaturase de cianobactéria no genoma plastidial de plantas de tabaco.

2. Material e Métodos

2.1 Material Vegetal

Neste trabalho foram utilizadas sementes de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv Petit Havana) transplastômicas e do tipo selvagem (WT), anteriormente produzidas pelo prof. Dr. Marcelo Rogalski (manuscrito em preparação). Dentre os quatro genótipos transplastômicos cedidos para o presente estudo, três deles (*pSdesC*, vetor de transformação pMR1; *pSdesA*, vetor de transformação pMR2; *pSdesB*, vetor de transformação pMR3) são plantas expressando (em construções independentes) dessaturases da cianobactéria *Synechocystis* sp. PC6803 no genoma plastidial (Tabela 1).

Tabela 1: Enzima, via metabólica atuante e respectivo genótipo transplastômico gerado a partir de genes de *Synechocystis* sp PC6803 codificantes de dessaturases

Enzima	Função	Genótipo transplastômico
$\Delta 9$ dessaturase Gene: <i>desC</i> Número de acesso no banco de dados: <i>slI0541</i>	A enzima $\Delta 9$ dessaturase de cianobactéria catalisa a primeira insaturação dos ácidos graxos, de 18:0 (ácido esteárico) para 18:1 (ácido oleico). Esta enzima introduz a primeira ligação dupla na posição $\Delta 9$ do ácido graxo saturado (Sakamoto et al., 1994b).	<i>pSdesC</i>
$\Delta 12$ dessaturase Gene: <i>desA</i> Número de acesso no banco de dados: <i>slr1350</i>	A enzima $\Delta 12$ dessaturase introduz a segunda ligação dupla na posição $\Delta 12$ do ácido graxo. Esta enzima converte ácido oleico (18:1) em ácido linoleico (18:2) (Sakamoto et al., 1994c; Wada et al., 1993).	<i>pSdesA</i>
$\Delta 15$ dessaturase Gene: <i>desB</i> Número de acesso no banco de dados: <i>slI1441</i>	Esta enzima catalisa o primeiro passo para a produção de ácidos graxos ω -3 pela conversão do ácido linoleico (18:2) em ácido α -linolênico (18:3). A mesma introduz a terceira ligação dupla na posição $\Delta 15$ do ácido graxo (Sakamoto et al., 1994a).	<i>pSdesB</i>

O quarto genótipo transgênico (*pEnptII*, vetor de transformação pRB96) trata-se de plantas transformadas com o vetor pRB96 (Wurbs et al., 2007), o qual foi utilizado como vetor básico de clonagem para os genes de interesse (dessaturases). O genótipo *pEnptII* juntamente com o genótipo WT foram utilizados como controles nas análises que seguem.

2.1.1 Produção dos vetores de transformação

A partir do vetor básico de transformação pRB96, foram produzidos os vetores de transformação genética plastidial pMR1, pMR2 e pMR3, contendo os genes *desC*, *desA* e *desB*, respectivamente, para as dessaturases de interesse na região de inserção do cassete GOI (Figura 1).

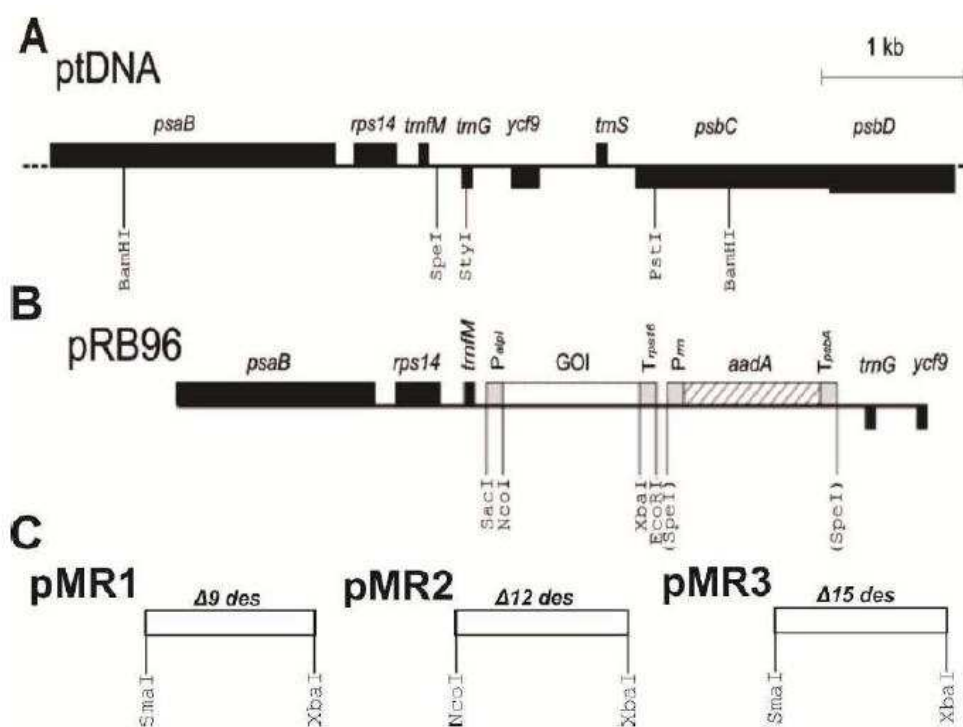


Figura 1: Clonagem dos vetores de transformação do genoma plastidial. A) Região do genoma plastidial de tabaco utilizada como alvo para a inserção dos transgenes. B) Vetor básico de transformação pRB96 utilizado para a inserção dos genes de interesse no cassete GOI (*gene of interest*). C) Vetores construídos para a transformação plastidial: pMR1, pMR2 e pMR3, contendo os genes *desC*, *desA* e *desB*, respectivamente.

Para a construção do vetor pMR1, primeiramente isolou-se o gene *desC* que codifica a enzima $\Delta 9$ dessaturase a partir do DNA de cianobactéria (*Synechocystis sp.* PC6803) fazendo uso de primers de clonagem específicos (Tabela 2). Na sequência dos primers foram adicionados os sítios de restrição das enzimas *SmaI* (região 5') e *XbaI* (região 3'). A inserção do sítio *SmaI* foi necessário devido a presença de sítios de restrição para a enzima *NcoI* (esta enzima é utilizada para a digestão do vetor de clonagem) dentro da sequência do gene $\Delta 9$ dessaturase. A presença desse sítio cria um novo segundo códon durante a síntese proteica trocando uma leucina por uma glicina. O aminoácido glicina como segundo códon aumenta a estabilidade da proteína de interesse expressa nos plastídios (Apel et al., 2010). O vetor pRB96 foi digerido com a enzima de restrição *NcoI* e tratado empregando o fragmento Klenow da enzima DNA polimerase I para preencher as extremidades coesivas produzidas pela digestão com *NcoI*. Posteriormente, o vetor linear foi digerido com a enzima *XbaI* (Figura 1). O fragmento de interesse foi então separado em gel de agarose (0,8%), excisado e purificado através do uso dos kits de coluna Invisorb® (Invitex) e de resina *Gel Extraction and PCR Purification* (Invitrogen). Finalmente, o vetor foi ligado ao gene de interesse através do uso da enzima T4 DNA ligase (Fermentas) para dar origem ao vetor de transformação pMR1.

O gene *desA* que codifica a enzima $\Delta 12$ dessaturase foi amplificado a partir do DNA de cianobactéria (*Synechocystis sp.* PC6803) usando primers de clonagem específicos (Tabela 2). Na sequência dos primers foram adicionados os sítios de restrição para as enzimas *NcoI* (região 5') e *XbaI* (região 3'). O vetor de transformação pRB96 foi digerido com as mesmas enzimas de restrição (Figura 1). Os fragmentos de interesse foram purificados com ajuda dos kits citados acima e ligados com a utilização da enzima T4 DNA ligase dando origem ao vetor de transformação pMR2.

Para a construção do vetor pMR3, o gene *desB* que codifica a enzima $\Delta 15$ dessaturase foi isolado a partir do DNA de cianobactéria (*Synechocystis sp.* PC6803), amplificado com primers de clonagem específicos (Tabela 2). Nas sequências dos primers foram adicionados os sítios de restrição para as enzimas *SmaI* (região 5') e *SpeI* (região 3'). Embora o padrão de digestão do vetor de transformação é feito com as enzimas de restrição *NcoI* e *XbaI*, essas duas enzimas cortam na sequência do gene *desB* e por isso foram substituídas por *SmaI* e *SpeI* (Figura 1). O sítio *SmaI* cria um novo segundo códon, ocorrendo uma troca de arginina para glicina. Essa troca de aminoácido na segunda posição da proteína proporciona um padrão similar de

estabilidade nos cloroplastos (Wiebke et al., 2010). A digestão com SpeI apresenta compatibilidade com outra sequência digerida com XbaI produzindo assim uma sequência compatível com a sequência obtida da digestão do vetor com a enzima XbaI. A sequência amplificada do gene *desB* foi digerida e o vetor de clonagem pRB96 digerido e tratado com o fragmento Klenow da enzima DNA polimerase I para preencher as extremidades coesivas produzidas pela digestão com NcoI. Os fragmentos de interesse foram purificados com ajuda dos kits citados acima e ligados com a utilização da enzima T4 DNA ligase, dando origem ao vetor de transformação pMR3.

Tabela2: Sequências dos primers de clonagem usados para o isolamento dos genes codificantes de dessaturases em cianobactérias

Gene	Sequência dos primers de clonagem (senso / reverso; 5'→3')
<i>desC</i>	TTTTCCCGGGTTAAACCCATTAAACATTGAATACCTATATTT AAAATCTAGACTAGGCTTTGTTGGCCATCGC
<i>desA</i>	AAAACCATGGGAAGTCCACGATTCCCCC TTTTTCTAGATTAACTTTTTTCAGGGAGCCGAAGGTG
<i>desB</i>	AAAACCCGGGCGTCTAGAAATTCATCGCCTCAAA TTTTACTAGTTTAAGGTTTCTTTTGATATCCACCATTGGAT

2.1.2 Transformação do genoma plastidial

Folhas jovens de tabaco obtidas de plantas mantidas *in vitro* (condições assépticas) em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) foram bombardeadas com partículas de ouro (0,6 µm) contendo os vetores de transformação (pMR1, pMR2, pMR3) utilizando bombardeador PDS1000He (Bio-Rad). As primeiras linhagens resistentes foram selecionadas de pedaços de folhas (5 x 5 mm) em meio de regeneração contendo 500 mg L⁻¹ de espectinomicina (Svab e Maliga, 1993). Mutantes espontâneos resistentes a espectinomicina foram eliminados pelo teste de dupla seleção em meio de cultura contendo 500 mg L⁻¹ de espectinomicina e estreptomicina (Svab e Maliga, 1993; Rogalski et al., 2006). Várias linhagens transplastômicas independentes, das construções citadas acima, foram sujeitas a 4 ciclos de regeneração em meio de seleção para enriquecer do genoma transplastômico e eliminar os genomas tipo selvagem, direcionando assim para a homoplasma de plantas transplastômicas. As diferentes plantas transplastômicas obtidas também foram analisadas quanto à presença do gene de interesse através de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com a utilização dos mesmos primers usados para a clonagem dos genes nas construções (Tabela 2).

2.2 Condições de cultivo

Sementes de três linhagens independentes dos genótipos de interesse *pSdesA*, *pSdesB* e *pSdesC* e dos genótipos controle (WT e *pEnptII*) foram germinadas em vasos plásticos pequenos contendo substrato para plantas Tropstrato HT hortaliças (Vida Verde) em condições semi-controladas em casa de vegetação com temperatura média de $26 \pm 3^\circ\text{C}$ e intensidade luminosa média de $519 \pm 360 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Uma semana após a germinação, as plântulas foram transplantadas e mantidas em vasos plásticos de 3,5 L contendo substrato para plantas Tropstrato HT hortaliças (Vida Verde) e areia (4:1), recebendo também adubação complementar de 50 mL de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), por vaso, duas vezes por semana. A irrigação foi realizada diariamente a fim de manter-se a umidade do substrato dos vasos próxima à capacidade de campo. O cultivo das plantas em casa de vegetação foi conduzido durante os meses de dezembro a abril de 2014 no Campo Experimental Diogo Alves de Mello, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa ($20^\circ 45'$ sul, $42^\circ 54'$ oeste, 650 m altitude), Minas Gerais.

2.3 Confirmação da homoplasma e herança materna do plastoma

Sementes produzidas pelas plantas cultivadas, conforme já descrito (tópico 2.2), foram avaliadas quanto à estabilidade do genótipo transplastômico germinando-as em meio de cultura MS suplementado (ou não) com os agentes seletivos espectinomicina e estreptomicina. Germinação *in vitro* com agentes de seleção também foi realizada em sementes obtidas por meio da polinização de plantas WT com os genótipos transplastômicos (*pSdesA*, *pSdesB*, *pSdesC* e *pEnptII*) e vice-versa, com o objetivo de confirmar a herança materna do genoma plastidial em tabaco (Rogalski et al., 2008b).

2.4 Identificação dos transgenes por PCR

Amostra foliar de todas as linhas dos genótipos cultivados em casa de vegetação (conforme descrito anteriormente, tópico 2.2) teve a presença dos transgenes confirmada por PCR. A partir do DNA total extraído pelo método CTAB (Doyle e Doyle, 1990), os transgenes foram amplificados através dos primers de clonagem (Tabela 2). A enzima GoTaq® DNA Polymerase (Promega) foi utilizada para a amplificação dos transgenes a partir de 50 ng de DNA total. O programa da reação da PCR foi composto de uma desnaturação inicial 3 min a 95°C seguido por 35 ciclos de 40 s a 95°C , 40 s a $63,7^\circ\text{C}$ (ou $64,8^\circ\text{C}$ para a amplificação do gene *desA*) e 70 s a 72°C ,

e uma extensão final de 5 min a 72°C. Ao final da PCR os amplicons foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1%.

2.5 Parâmetros de fluorescência e trocas gasosas

Parâmetros de fluorescência e trocas gasosas foram mensurados utilizando-se um analisador de gases no infravermelho acoplado a um fluorômetro (Li 6400XT, Li-Cor, Lincoln, EUA). A avaliação foi realizada em plantas cultivadas em casa de vegetação (tópico 2.2) com 4 semanas (terceira ou quarta folha a partir do ápice) e 8 semanas (a terceira e a sétima folha a partir do ápice) de idade.

Para as medidas de fluorescência da clorofila *a*, as folhas foram primeiramente adaptadas ao escuro (análise realizada entre 23:00 - 02:00 horas de noite) e, após, expostas a um fraco pulso de luz vermelho-distante ($0,03 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para a determinação da fluorescência inicial (F_0). Em seguida, um pulso de luz saturante ($6000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) com duração de 1 s, foi aplicado para a determinação da fluorescência máxima emitida (F_m). A partir dos dados obtidos de fluorescência inicial e máxima, foi calculado o rendimento quântico máximo do fotossistema II (FSII) que é estimado como $F_v / F_m = (F_m - F_0) / F_m$. Também foram medidas as fluorescências inicial (F_0') e máxima (F_m') da amostra adaptada à luz (entre 8:30-11:30 horas da manhã), através dos quais foram estimados os valores do rendimento quântico efetivo do FSII (Φ_{FSII}) e da taxa de transporte de elétrons (TTE) conforme DaMatta et al. (2002). Os rendimentos quânticos das dissipações de energias regulada (Φ_{NPQ}) e não regulada (Φ_{NO}) no FSII também foram calculados segundo Hendrickson et al. (2004), usando os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* medidos.

Na mesma área foliar que foi utilizada para a análise de fluorescência (entre 8:30-11:30 horas da manhã), também mediu-se a taxa de fotossíntese líquida (*A*) e de transpiração (*E*), a condutância estomática (g_s) e a razão entre as concentrações interna e do ambiente de CO_2 (C_i/C_a), em sistema aberto, sob radiação fotossinteticamente ativa de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (10% de luz azul) e temperatura controlada (25-27°C). Dados de respiração noturna (*R*) também foram obtidos a partir de plantas adaptadas ao escuro (entre 23:00 - 02:00 horas da noite).

2.6 Coleta de material vegetal e avaliação do crescimento

Após a obtenção dos parâmetros fotossintéticos em plantas de 4 e 8 semanas, coletou-se as folhas, terceira ou quarta a partir do ápice, entre 11:00-11:30 horas da

manhã, congelando-as instantaneamente em nitrogênio líquido e armazenando-as a -80°C para posteriores análises moleculares e bioquímicas.

Parâmetros de crescimento também foram medidos em plantas com 4 e 8 semanas. Para tanto, medidas do comprimento da haste (da base ao ápice) e do acúmulo de biomassa seca da raiz e da parte aérea foram tomadas. A partir dos dados de massa seca obtidos com 4 e 8 semanas foi também possível estimar a taxa de crescimento relativo (g dia^{-1}), dada pela razão entre a diferença dos logaritmos neperianos das massas secas e o intervalo de tempo no qual as massas secas foram obtidas (Hunt et al., 2002).

2.7 Análise de expressão gênica por PCR em Tempo Real

Amostras foliares de plantas de 4 e 8 semanas coletadas conforme descrito anteriormente (tópico 2.6) foram maceradas em nitrogênio líquido e submetidas à extração de RNA total pelo método Trizol (Life Technologies). Após a extração, o RNA foi tratado com DNase I (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante e então quantificado pelo kit Qubit RNA BR (Life Technologies). A qualidade do RNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% e também pelas razões de absorbância 260/280 nm e 260/230 nm.

A partir de 2 μg de RNA tratado com DNaseI procedeu-se à síntese do cDNA usando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) segundo protocolo da firma. As reações do PCR em tempo real foram montadas usando o sistema Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) e realizadas no instrumento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Todos os primers utilizados nesta análise foram sintetizados para a temperatura de anelamento de 60°C e para produzir amplicons em torno de 100pb. O programa de reação utilizado foi o Fast (desnaturação inicial de 20 s a 95°C seguido por 40 ciclos de 3 s a 95°C e 30 s a 60°C e uma desnaturação final de 20 s a 95°C) com a adição do estágio da curva de desnaturação (30 s a 60°C seguidos de incrementos na temperatura com leitura de fluorescência a cada 0,4°C até alcançar a temperatura de 95°C). A curva de desnaturação foi utilizada para verificar a especificidade dos primers.

Antes de proceder à análise de expressão, todos os primers desenhados para este experimento foram validados quanto à eficiência de amplificação por meio da construção de curvas de amplificação de diluições seriadas de cDNA conforme Real-Time PDC Application Guide (Bio-Rad). Primers que amplificaram seus respectivos

genes com eficiência em torno de 90-110% foram considerados aptos para a condução dos experimentos de expressão gênica. As curvas de amplificação também permitem avaliar qual é o melhor intervalo de diluição a ser usado na análise de expressão. Para a presente análise, foi utilizado a diluição 1/50 a partir do cDNA inicial (equivalente a 2 ng de cDNA por reação).

Além da validação da eficiência dos primers, três genes endógenos plastidiais (*atpI*, *accD* e *matK*) e três genes endógenos nucleares (*L17*, *L25* e *PP2A*) foram avaliados quanto ao uso dos mesmos como genes de referência para o plastídio e para o núcleo. Para tanto, reações em triplicatas biológicas para todos os genótipos foram montadas (além de replicatas técnicas) e os valores de estabilidade avaliados usando o suplemento NormFinder. Segundo o NormFinder, o gene plastidial *atpI* é o melhor candidato a gene de referência e os genes *L25* e *PP2A*, a melhor combinação de genes a serem usados como referência.

Após a conclusão das reações de PCR em tempo real, os valores de Ct foram corrigidos pelo Real-Time PCR Miner (<http://www.miner.ewindup.info/>) e o nível relativo de mRNA calculado pelo método de Pfaffl (Real-Time PDC Application Guide, Bio-Rad).

2.7.1 Análise da expressão dos transgenes

Os níveis de mRNA dos transgenes *desC*, *desA*, *desB* e *aadA* (marcador de seleção das linhagens transplastômicas) foi avaliado tomando-se como referência os genes plastidiais endógenos *atpI*, *matK* e *accD*. Apesar de o gene *atpI* ter sido apontado pelo NormFinder como melhor candidato a gene de referência, nesta análise optamos por usar os três genes candidatos, uma vez que *matK* e *accD* apresentaram alta eficiência de amplificação e valores de expressão constantes entre os genótipos avaliados. Além disso, também foi feita uma comparação entre o nível de expressão do gene *atpI* e das dessaturases transgênicas, as quais foram clonadas com o mesmo promotor do gene *atpI* (Figura 1), usando *matK* e *accD* como referência. Os primers desenhados para os genes citados acima estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Sequência dos primers desenhados para a análise de expressão de genes plastidiais em plantas de tabaco transplastômicas e do tipo selvagem

Gene	Primers (senso / reverso; 5'→3')
<i>atpI</i>	CCGGGGGTCAGAATTTCTTC / ACCCAGGGCCCATATTCTTC
<i>matK</i>	TTTGAAAAGATCGGGCTCGG / AGAAGAAGCTCGTGGAAGG
<i>accD</i>	GAACCCAACGCCTACATTGC / CAGCTGCTTGTGAACCTTCG
<i>desC</i>	CGTTGTATTTCCCACCGCAG / AGCCGACCCACTCAAATACG
<i>desA</i>	CACGATTCCCCCGTTGACAC / CCTTGGGCAGGGTTTTAATGATG
<i>desB</i>	GACTGAAGCCATCAAGCCCAT / AAAATGGCAAGCCCAGTAGGAC
<i>aadA</i>	TCCCCTGGAGAGAGCGAGAT / CAGTTCGCGCTTAGCTGGAT

Programas usados para o desenho dos primers: Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>);

Oligo calc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>);

OligoPerfect™ Designer – Invitrogen (<http://tools.lifetechnologies.com/content.cfm?pageid=9716>).

2.7.2 Análise da expressão de genes nucleares

A expressão de genes relacionados à biossíntese de ácidos graxos, codificados pelo genoma nuclear, também foi avaliada no presente estudo como forma de identificar as consequências da expressão dos transgenes sobre o metabolismo de ácidos graxos em nível transcricional. Para tanto foram construídos primers para o cDNA de genes nucleares que codificam as subunidades da ACCase heteromérica plastidial (BCCP, BC, α -CT homólogos aos respectivos genes *CAC1*, *CAC2* e *CAC3* em *A. thaliana*) e para genes que codificam dessaturases endereçadas para o retículo endoplasmático e para o plastídio (homólogos aos genes *FAD2*, *FAD4*, *FAD5*, *FAD6* e *SSI2* em *A. thaliana*). Para os genes *FAD3*, *FAD7* e *FAD8*, codificantes de $\Delta 15$ dessaturases em *A. thaliana*, as mesmas sequências homólogas foram encontradas em tabaco (TA17352_4097, TA15380_4097 e TA20957_4097) através do banco de dados TIGR Plant Transcript Assemblies database. Contudo, apenas a sequência TA17352_4097 alcançou um alinhamento significativo usando um banco de dados de sequências de nucleotídeos de *A. thaliana* através do Basic Local Alignment Search Tool (Blast). O maior score de alinhamento, cobrindo 70% da sequência, deu-se com a sequência de mRNA da dessaturase FAD7 ($\Delta 15$ dessaturase plastidial). Dessa forma, primers foram desenhados para a sequência TA17352_4097 homóloga à dessaturase FAD7 em *A. thaliana*.

Também foi avaliado o efeito da expressão dos transgenes sobre a biossíntese de jasmonatos mediante análise da expressão de genes regulados por metil-jasmonato,

segundo estudo de expressão gênica realizada por Jung et al. (2007) em *A. thaliana*. Os genes analisados foram os genes codificantes das enzimas OPDA redutase (homólogo ao gene *OPR3* de *Solanum lycopersicum*), 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase (homólogo ao gene *ACO2* de *A. thaliana*) e a subunidade de 5kDa do Fotossistema II (homólogo ao gene *AT1G51400* de *A. thaliana*).

Todos os primers usados para essa análise de expressão gênica estão descritos na abaixo (Tabela 4).

Tabela 4: Sequência dos primers desenhados para a análise de expressão de genes nucleares em plantas de tabaco transplastômicas e do tipo selvagem

Gene	Primers (senso / reverso; 5'→3')
<i>L17</i>	CGCCGATAACACTGGTGCAA / CACAAGCTGATGGCAACCTG
<i>L25</i>	GAAACCCCAAGTACCCTCGTA / ATTGCAGACTCTGTGGTGAGG
<i>PP2A</i>	TTGGGCCCACGATCAAAAGG / CGCTCCCTGGAATCATCAAC
<i>CAC1</i>	CTGCAGCAAAGCCATCTGAC / CCAACCTTCACAAATGGTGGT
<i>CAC2</i>	GCACCTTCCCCTGCATTAAC / CCACGGTACCAACACCAATG
<i>CAC3</i>	CGGCTTCAGACCTTCTTCGT / TGCAGAGACGGCAAAATCTC
<i>FAD2</i>	GTGACTACCAGTGGGTCGATGA / GCGACGATGACTATATTTCCAAGAG
<i>FAD4</i>	GTGGTTCTTGGCTTTGTTGGTG / CAACCACTAGAGGAGGAAGTTTAC
<i>FAD5</i>	TGGATTTGGGCTCAGCTGCT / CCAACAGCAGCCCAATTGAAG
<i>FAD6</i>	GCGTCTTCGCTTTTATGGCA / TGATAACCCAACCACGGCAT
<i>FAD7</i>	TCCAAGTGCTTAAGCTCTATGGC / CCATGGTGATGCAAGTAGGTAAC
<i>SSI2</i>	GTTCTAGTTGGGGATATGATCACAGA / CTTGCTCCGGTTTCATCACG
<i>OPR3</i>	ATTTCTCCAACCTTCAGCTGGG / ACAGCACCTTTTGAATGTACTAC
<i>ACO</i>	GGACACTGTGGAGAAGCTAAC / CAGCCTGAACAGCCTCAAGT
<i>PSII5kDa</i>	CTGTTGCCGCTAGCTCAGT / TTGATAGTACTTCTTCTTGGCTTCC

Programas usados para o desenho dos primers: Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>);

Oligo calc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>);

OligoPerfect™ Designer – Invitrogen (<http://tools.lifetechnologies.com/content.cfm?pageid=9716>)

2.8 Análise de ácidos graxos

Amostras foliares coletadas em plantas de 4 e 8 semanas (conforme tópico 2.6) e sementes foram analisadas quanto ao conteúdo e o perfil de ácidos graxos através de

cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização de chama (GC-FID) conforme Laurens et al (2012).

A extração e derivatização de ácidos graxos (transformação de ácido graxo em éster metílico através da metilação do terminal carboxílico) de amostras foliares foram realizadas em uma etapa única, utilizando tecido foliar liofilizado. Cerca de 20 mg de tecido liofilizado foram colocados em um tubo de vidro com tampa e ao mesmo adicionou-se 425 μ L de metanol-clorofórmio (1:2) contendo 250 μ g de padrão interno (ácido heptadecanoico, 98% Sigma) para uma pré-embrição da amostra. Em seguida foram adicionados 600 μ L de HCl 5% em metanol, sendo a reação de derivatização procedida a 85°C por 1 h em banho-seco. Após o período de incubação, o tubo foi resfriado à temperatura ambiente e adicionou-se ao mesmo 2 mL de hexano (Chromasolv[®], para HPLC, Sigma-Aldrich) para extrair os ésteres metílicos derivados de ácidos graxos, sendo, em seguida, transferida uma alíquota da fase em hexano para vials de vidro com septos de PTFE/silicone, compatíveis com a análise por GC-FID.

Semelhantemente, a extração e derivatização de ácidos graxos de sementes foram realizadas em uma etapa única, a partir de sementes intactas, diferindo apenas na quantidade de material utilizado (10 mg de sementes) e na quantidade de hexano na qual os ésteres metílicos foram dissolvidos na etapa final (4 ml ao invés de 2ml).

Todos os ácidos graxos extraídos e derivatizados (a partir de folhas e sementes) foram analisados em GC-FID usando a coluna Agilent HP-88. Para cada análise foi injetado no cromatógrafo 1 μ l da amostra dissolvida em hexano, com o modo de entrada *Splitless*, a 260°C, pressão constante (363 kPa) e purga em 90 s. A programação de temperatura do forno usada foi de 60°C por 1 min, rampa de 130°C a 20°C por minuto, rampa de 240°C a 5°C por minuto e permanência por 10 minutos a 240°C. A temperatura da chama foi de 270°C com fluxo de gás padrão.

A identificação dos diferentes tipos de ácidos graxos presentes nas folhas foi baseada na comparação entre os fatores de retenção dos picos obtidos nos cromatogramas de cada amostra e no cromatograma gerado por uma amostra padrão contendo uma mistura de vários metil-ésteres de ácidos graxos de cadeia conhecida (Supelco[®] 37 Component FAME Mix, Sigma-Aldrich). Uma vez identificados, os ácidos graxos foram quantificados pelo método da padronização interna (Christie, 1989; Visentainer e Franco, 2006) fazendo uso do fator de correção teórico (F_{CT}), que corrige a resposta diferencial do DIC para os diferentes ésteres metílicos em relação ao padrão interno, e do fator de conversão éster metílico para ácido graxo (F_{CEA}). Usando a

fórmula $M_x = (A_x \times M_p \times F_{CT}) / (A_p \times F_{CEA} \times M_A)$, os ácidos graxos foram quantificados (expressos em mg g⁻¹ de massa seca, M_x) a partir das massas do padrão interno (M_p) e da amostra (M_A) e das áreas (integrais dos picos no cromatograma) do padrão interno (A_p) e do ácido graxo X (A_x).

2.9 Análises bioquímicas

Folhas de plantas com 4 e 8 semanas (coletadas conforme tópico 2.6) foram submetidas a análises bioquímicas conforme Nunes-Nesi et al. (2007). Para tanto, cerca de 25 mg de tecido foliar fresco macerado em nitrogênio líquido foi submetido a extrações seriadas à quente (80°C) em etanol 98, 80 e 50%. Em cada etapa de extração, o tempo de incubação foi de 20 min, seguido por centrifugação (10 min a 17000 *g*) e coleta do sobrenadante. Os sobrenadantes das extrações em série foram reunidos em um mesmo microtubo, sendo denominado de extrato etanólico, o qual foi utilizado para as quantificações de clorofilas, nitrato, aminoácidos totais, malato, fumarato, glicose, frutose e sacarose. O material que não foi extraído com as soluções de etanol formou um precipitado, a partir do qual, posteriormente, quantificou-se proteínas e amido. Toda a extração foi realizada ao abrigo da luz e o extrato etanólico e o precipitado resultante, conservados a -20°C.

2.9.1 Clorofilas *a* e *b*

Para a determinação de clorofilas *a* e *b* utilizou-se o extrato etanólico imediatamente após o seu preparo e ao abrigo da luz. Foram adicionados a 50 µL do extrato etanólico diluído (1/2) e 120 µL de etanol 98% em uma microplaca de 96 poços. Após, foram realizadas leituras de absorbância (*A*) nos comprimentos de onda de 645 e 665 nm em um leitor de microplacas (VersaMax Tunable Microplate Reader) e as concentrações das clorofilas foram determinadas segundo Porra et al. (1989)

2.9.2 Nitrato

O conteúdo de nitrato foi determinado segundo Fritz et al. (2006). Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 10 µL do extrato etanólico, 10 µL de tampão fosfato 1M pH 7,5 (KH₂PO₄ / K₂HPO₄), 0,5 µL de NADPH 50mM, 0 ou 5 µL de nitrato redutase (5 U mL⁻¹) e o volume completado para 100 µL com água ultrapura. A reação foi incubada a 25°C por 30 min e em seguida foram adicionados 15 µL de PMS 0,25mM (metossulfato de fenazina) e incubado novamente a 25°C por 20 min. Após

esse intervalo, 60 µL de sulfanilamida 1% m/v em ácido fosfórico 3M e 60 µL de NNEDA 0,2% m/v (ácido N-naftil etilenodiamina) foram adicionados em cada reação e incubados por 10 min a 25°C. Como o nitrato é quantificado com base no nitrito formado através da enzima nitrato redutase, duas reações diferentes foram feitas, uma contendo a enzima e outra sem adição da mesma, e a diferença de absorbância entre as reações é utilizada para estimar o teor de nitrato na amostra. Leituras de absorbância foram feitas a 540 nm e a quantificação do nitrato realizada com base em uma curva-padrão construída com diferentes concentrações de nitrato.

2.9.3 Aminoácidos totais

O conteúdo de aminoácidos totais foi determinado segundo Gibon et al (2004). Em uma microplaca de 96 poços, foram adicionados em cada poço 25 µL do extrato etanólico, 25 µL de etanol 70%, 50 µL de tampão citrato (ácido cítrico / citrato de sódio 1M pH 5,2 + 0,2% de ácido ascórbico) e 100 µL de ninhidrina 1% (m/v) em etanol 70%. Em seguida, a microplaca foi incubada a 95°C por 20 min (ao abrigo da luz) e após, determinou-se a absorbância a 570 nm. Para a quantificação dos aminoácidos na amostra, uma curva-padrão a partir de diferentes concentrações do aminoácido leucina foi feita.

2.9.4 Ácidos orgânicos

O conteúdo dos ácidos orgânicos malato e fumarato foi determinado conforme Nunes-Nesi et al. (2007). Segundo esse método, o malato e o fumarato são quantificados indiretamente a partir da detecção, no comprimento de onda de 570 nm, de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) reduzido na medida em que as enzimas L-malato desidrogenase (L-MDH) e fumarase são adicionadas em série. Para tanto, preparou-se a seguinte reação em microplaca de 96 poços: 10 µL de extrato etanólico, 50 µL de tampão tricina (tricina/KOH 0,2M, MgCl₂ 10mM, pH 9,0), 10 µL de MTT 10mM, 2 µL de PES 20 mM (etossulfato de fenazina), 10 µL de NAD⁺ 30 mM, 5µL de triton X100 10% e 3 µL de água ultrapura. Em seguida, leituras a 570 nm foram feitas a cada 1 min por cerca de 15 min, até a estabilização da linha de base. Uma vez alcançada uma linha de base estável, adicionou-se em cada reação (poço) 1 unidade da enzima L-malato desidrogenase (L-MDH) e a cinética da reação foi monitorada por leituras de absorbância a 570 nm a cada 1 min, até alcançar-se novamente um nível de absorbância constante. Após essa etapa, foi adicionado 0,1

unidade da enzima Fumarase e leituras de absorbância a 570 nm a cada 1 min foram realizadas até não haver mais variações na absorbância. A quantificação de malato e fumarato foi realizada com base em uma curva-padrão construída a partir de diferentes concentrações conhecidas de ácido málico e de ácido fumárico, respectivamente.

2.9.5 Açúcares

Os monossacarídeos glicose e frutose e o dissacarídeo sacarose foram determinados segundo Fernie et al. (2001). A quantificação desses açúcares é obtida de forma indireta a partir da absorbância do NADPH formado na medida em que as enzimas glicose-6 fosfato desidrogenase (G6PDH), hexocinase, fosfoglicoisomerase (PGI) e invertase são adicionadas sequencialmente. A reação de quantificação foi preparada em microplaca de 96 poços e para cada reação foi usado 25 μ L do extrato etanólico, 25 μ L de etanol 80% e 160 μ L do mix de reação formado por 15,5 mL de tampão Hepes 0,1M pH 7,0 + MgCl_2 30mM, 480 μ L de ATP 60 mg mL^{-1} , 480 μ L de NADP 36 mg mL^{-1} e 80 μ L de G6PDH (grade II, 5 mg mL^{-1}). Em seguida foi feita a leitura de absorbância a 340 nm em intervalos de 1 min até a estabilização da linha de base (cerca de 15 min). Após esse período, a concentração de glicose foi determinada adicionando-se 1,5 unidades da enzima hexocinase. A cinética da reação foi monitorada por leituras de absorbância a 340 nm a cada 1 min, até alcançar-se novamente um nível de absorbância constante. Na sequência, 0,7 unidades de PGI foi adicionada para a quantificação de frutose e após a estabilização da absorbância, 5 unidades de invertase foram adicionadas à reação para a determinação de sacarose.

2.9.6 Proteínas solúveis

A concentração de proteínas solúveis foi determinada segundo Gibon et al. (2004). O precipitado obtido na etapa de extração foi ressuspensionado em 0,4 mL de NaOH 0,1M, incubado por 60 min a 90°C e em seguida centrifugado a 17000 *g* por 10 min. Retirou-se 3 μ L do sobrenadante e ao mesmo foi adicionado 180 μ L do reagente Bradford diluído (1:5) em microplaca de 96 poços. Após 5 min, leitura de absorbância foi realizada no comprimento de onda de 595 nm. Através de uma curva-padrão com diferentes concentrações de albumina sérica bovina (BSA), determinou-se a concentração de proteínas na amostra.

2.9.7 Amido

A partir do precipitado ressuspendido em NaOH 0,1 M (descrito anteriormente), determinou-se o conteúdo de amido conforme Fernie et al. (2001). Primeiramente, 70 μL de ácido acético 1M foi adicionado à solução de NaOH para a neutralização da mesma. Em seguida, retirou-se uma alíquota de 40 μL da solução neutralizada e o amido foi degradado nesta alíquota pela adição das enzimas amiloglicosidade (0,14 U) e α -amilase (0,12 U) solubilizadas em tampão acetato 50mM pH 4,9 (ácido acético/acetato de sódio) e incubadas a 55°C por 60 min. Após a degradação, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante foi utilizado para a determinação da glicose (resultante da degradação do amido). Para isso, em uma microplaca de 96 poços, foram adicionados 25 μL do sobrenadante, 25 μL de ácido acético 1M, 160 μL do mix de reação composto por 15,5 mL de tampão Hepes/KOH 0,1M pH 7,0 + MgCl_2 30 mM, 480 μL de ATP 60 mg mL^{-1} , 480 μL de NADP 36 mg mL^{-1} e 80 μL de G6PDH (grade II, 5 mg mL^{-1}). Em seguida foi feita a leitura de absorbância a 340 nm em intervalos de 1 min até a estabilização da linha de base (cerca de 15 min). Após esse período, a concentração de glicose foi determinada adicionando-se 1 unidade da enzima hexocinase. A cinética da reação foi monitorada por leituras de absorbância a 340 nm a cada 1 min, até alcançar-se novamente um nível de absorbância constante. A concentração de glicose foi determinada indiretamente com base na quantidade de NADPH produzido após a adição de cada enzima.

2.10 Estresse por temperatura

Para a avaliação da tolerância a estresse por alta e baixa temperatura, sementes de plantas WT e transplastômicas foram germinadas e crescidas, até determinados estádios de desenvolvimento, em solo em casa de vegetação (conforme descrito anteriormente). A análise de tolerância à condição estressante deu-se em três diferentes estádios de desenvolvimento das plantas: estágio cotiledonar, plantas com duas semanas e com quatro semanas após germinação.

Plantas no estágio cotiledonar (3-4 dias após germinação) e com duas semanas (3-4 folhas) foram transferidas para câmaras de crescimento a 4°C ou 40°C, sob intensidade luminosa constante (150 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Durante o período de incubação, foram realizadas observações quanto ao aparecimento de danos nas plântulas. Após determinados períodos de incubação, as plântulas foram transferidas

novamente para a condição inicial (casa de vegetação) e a recuperação do crescimento foi avaliado.

Os mesmos procedimentos anteriormente citados também foram feitos em plantas com 4 semanas de idade, com a adição da mensuração de parâmetros de fluorescência e de trocas gasosas na terceira folha (a partir do ápice) de plantas controle (na condição inicial em casa de vegetação) e após 2 dias na condição estressante.

2.11 Delineamento experimental e análise estatística

Todo experimento conduzido em casa de vegetação e em câmaras de crescimento foi organizado de modo inteiramente casualizado. Para a análise de crescimento e parâmetros fotossintéticos das plantas crescidas em casa de vegetação foram utilizadas 9 repetições para cada genótipo em estudo. As análises bioquímicas e de ácidos graxos foram conduzidas com 6 repetições biológicas por genótipo. Para a avaliação de expressão gênica, 3 repetições biológicas por genótipo foram utilizadas.

Para avaliar possíveis diferenças entre os tratamentos foi feita análise de variância ($P < 0,05$) e, quando necessário, diferenças entre as médias foram examinadas pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK) a 5% de probabilidade.

3. Resultados

3.1 Eficiência da transformação plastidial, herança dos transgenes e identificação das dessaturases de cianobactéria

A eficiência da inserção do cassete de transformação foi confirmada através da germinação de sementes em meio de cultura MS com os antibióticos espectinomicina e estreptomicina (Figura 2).

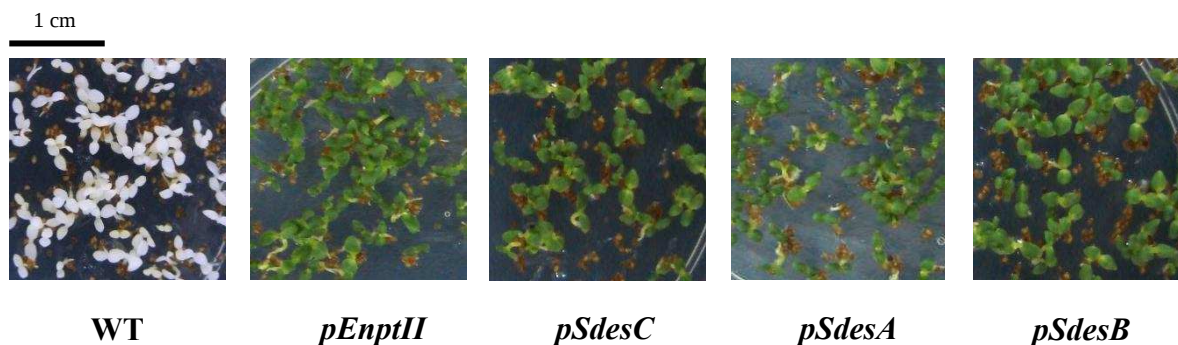


Figura 2: Teste de germinação de sementes transplastômicas (*pEnptII*, *pSdesC*, *pSdesA* e *pSdesB*) e do tipo selvagem (WT) em meio de cultura contendo espectinomicina e estreptomicina como agentes seletivos.

Os antibióticos espectinomicina e estreptomicina bloqueiam a síntese de proteínas nos cloroplastos e, por consequência, inibem a biossíntese de clorofila conferindo uma coloração branca às plântulas que não contêm o gene de resistência *aadA*. Dessa forma, sementes WT produziram plântulas brancas, albinas, enquanto todas as sementes dos genótipos transplastômicos geraram plântulas verdes, confirmando o estado de homoplasma. O uso dos dois antibióticos, espectinomicina e estreptomicina, como agentes seletivos se faz necessário para eliminar mutantes espontâneos que são insensíveis à espectinomicina, porém não à presença dos dois agentes seletivos (Svab e Maliga, 1993; Rogalski et al., 2006).

O mesmo padrão de coloração de plântulas foi observado em sementes geradas a partir do cruzamento entre plantas do tipo selvagem e transplastômicas e vice-versa. Sementes geradas por plantas WT a partir de pólen de plantas transplastômicas geraram plântulas brancas em meio de cultura contendo antibióticos, enquanto sementes geradas por plantas transplastômicas a partir de pólen WT geraram plântulas completamente verdes em meio seletivo. Tais resultados confirmam a herança materna do genoma

plastidial em plantas de tabaco (Ruf et al., 2007; Svab e Maliga, 2007) e, consequentemente, dos transgenes (Rogalski et al., 2008b).

O teste de germinação em meio seletivo avalia apenas a presença ou ausência do transgene que confere resistência (*aadA*), assim, para avaliar a inserção das dessaturases transgênicas, fez-se uso do PCR a partir de DNA extraído de amostras foliares de plantas cultivadas em casa de vegetação. Amplicons correspondentes aos transgenes *desC* (0,9 Kb), *desA* (1,0 Kb) e *desB* (0,9 Kb) foram identificados nos genótipos *pSdesC*, *pSdesA* e *pSdesB*, respectivamente, conforme esperado (Figura 3).

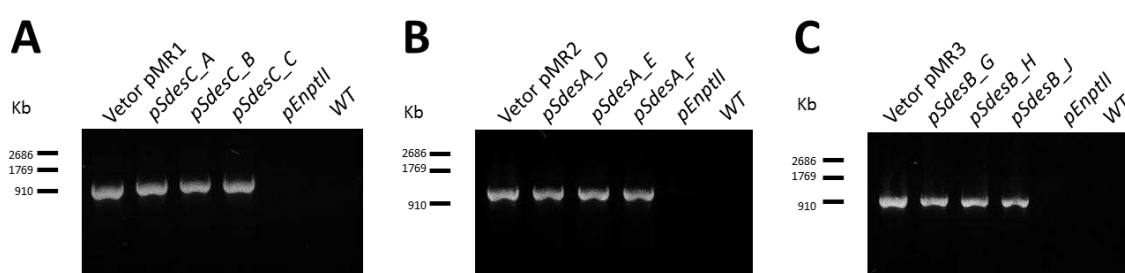


Figura 3: Identificação das dessaturases transgênicas por PCR. **A)** O transgene *desC* foi amplificado em todas as linhas de *pSdesC* (linhas A, B e C) e no vetor pMR1 (controle +). **B)** O transgene *desA* foi amplificado em todas as linhas de *pSdesA* (linhas D, E e F) e no vetor pMR2 (controle +). **C)** O transgene *desB* foi amplificado em todas as linhas de *pSdesB* (linhas G, H e J) e no vetor pMR3 (controle +).

3.2 Análise de crescimento das plantas cultivadas em casa de vegetação

O fenótipo das plantas *pSdesC* e *pSdesA* quando crescidas em condições de casa de vegetação foi similar ao das plantas controles (WT e *pEnptII*) em todos os estádios de desenvolvimento. Diferentemente, plantas *pSdesB* claramente apresentaram uma altura reduzida da parte aérea em relação aos demais genótipos. Imagens representativas dos diferentes genótipos nos estádios em que foram feitas as análises fisiológicas, bioquímicas e moleculares são indicadas nas Figuras 4 e 5.

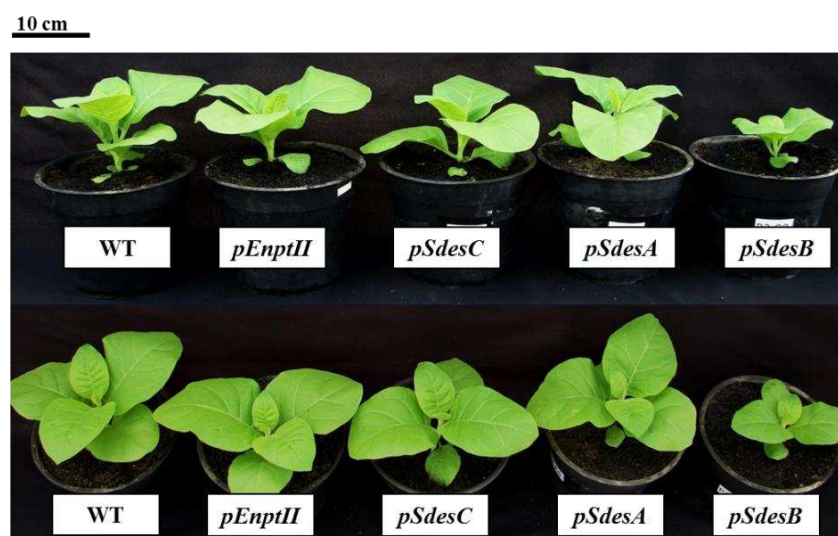


Figura 4: Plantas com 4 semanas cultivadas em condições de casa de vegetação.



Figura 5: Plantas com 8 semanas cultivadas em condições de casa de vegetação.

Os parâmetros de crescimento avaliados (Tabela 5) confirmam o reduzido crescimento da parte aérea, tanto em altura como em acúmulo de biomassa seca das plantas *pSdesB*. Ademais, plantas expressando o gene *desB* apresentaram também uma reduzida biomassa seca da raiz, refletindo em uma partição de biomassa entre parte aérea e raiz similar aos genótipos controle. Tais dados indicam que nas plantas *pSdesB* o

acúmulo de biomassa seca é reduzido na planta como um todo. A menor taxa de crescimento relativo (TCR) corrobora este fato.

Em síntese, a análise de crescimento sugere que a inserção dos genes de cianobactéria *desC* e *desA* no genoma plastidial de tabaco não afetou o crescimento das plantas quando cultivadas em casa de vegetação. Por outro lado, plantas expressando *desB* apresentaram um fenótipo de crescimento reduzido, acumulando apenas cerca de 30% da massa seca acumulada em plantas WT, no estágio de 8 semanas.

Tabela 5: Parâmetros de crescimento de plantas com 4 e 8 semanas cultivadas em casa de vegetação

Idade	Parâmetros	Genótipos				
		WT	<i>pEnptII</i>	<i>pSdesC</i>	<i>pSdesA</i>	<i>pSdesB</i>
4 semanas	Altura (cm)	7,80 ± 0,56 ^a	8,67 ± 0,56 ^a	7,41 ± 0,34 ^a	8,24 ± 0,62 ^a	5,20 ± 0,75 ^b
	MS da raiz (g)	0,13 ± 0,01 ^a	0,14 ± 0,02 ^a	0,11 ± 0,01 ^a	0,12 ± 0,01 ^a	0,07 ± 0,01 ^b
	MS da PA (g)	1,13 ± 0,09 ^a	1,37 ± 0,12 ^a	1,06 ± 0,07 ^a	1,29 ± 0,12 ^a	0,67 ± 0,11 ^b
	PA / Raiz (g / g)	9,23 ± 0,55	10,71 ± 1,07	9,46 ± 0,47	10,66 ± 0,40	9,79 ± 0,32
8 semanas	Altura (cm)	34,38 ± 1,56 ^a	33,55 ± 2,04 ^a	32,47 ± 2,02 ^a	33,99 ± 1,30 ^a	16,28 ± 2,16 ^b
	MS da raiz (g)	1,79 ± 0,12 ^a	1,56 ± 0,25 ^a	1,77 ± 0,22 ^a	1,55 ± 0,14 ^a	0,53 ± 0,09 ^b
	MS da PA (g)	8,53 ± 0,48 ^a	7,56 ± 0,78 ^a	7,78 ± 0,85 ^a	7,66 ± 0,58 ^a	2,56 ± 0,45 ^b
	PA / Raiz (g / g)	4,81 ± 0,15	5,17 ± 0,44	4,46 ± 0,19	5,02 ± 0,17	4,81 ± 0,21
TCR (g dia ⁻¹)		0,076 ± 0,004 ^a	0,064 ± 0,005 ^a	0,074 ± 0,003 ^a	0,068 ± 0,004 ^a	0,050 ± 0,003 ^b

Os valores são apresentados como médias ± EP de 9 repetições; letras diferentes correspondem a médias que diferem significativamente segundo teste SNK, $P < 0,05$. MS, massa seca; PA, parte aérea; TCR, taxa de crescimento relativo.

3.3 Análise de expressão dos transgenes

O nível de expressão dos transgenes foi avaliado em comparação ao nível de mRNA do gene *atpI*, cujo promotor foi utilizado para a expressão das dessaturases transgênicas nas plantas *pSdesC*, *pSdesA* e *pSdesB*. A análise de expressão foi realizada em duas idades distintas das plantas, 4 e 8 semanas. Em ambas as análises, observou-se uma forte redução da expressão dos transgenes que codificam dessaturases de cianobactéria em relação ao gene *atpI*, principalmente nos genótipos *pSdesA* e *pSdesB*. Além disso, os dados sugerem que essa redução é dependente do genótipo, uma vez que é seguida por uma proporcional redução dos níveis de mRNA do transgene *aadA* (Figura 6).

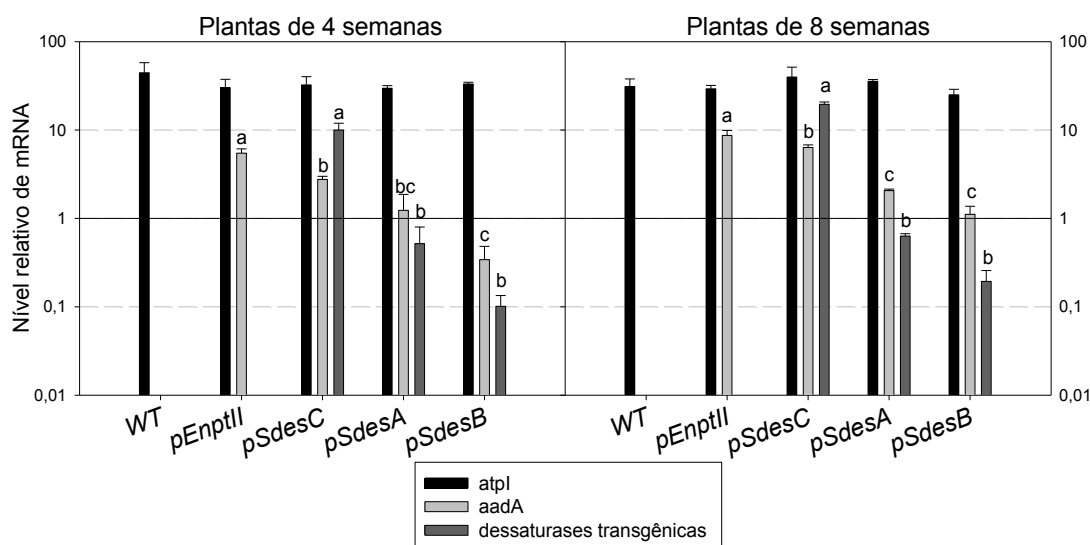


Figura 6: Nível de expressão das dessaturases transgênicas (*desC*, *desA* e *desB* presentes, respectivamente, em plantas *pSdesC*, *pSdesA* e *pSdesB*) e do agente de seleção *aadA*. O nível de expressão do gene endógeno *atpI* é também mostrado em comparação com os transgenes. O nível de mRNA apresentado no gráfico é relativo ao gene de referência *accD*. Resultado similar foi obtido usando o gene de referência *matK*. Os valores são apresentados como médias $\pm$ EP de 3 repetições; letras diferentes correspondem a médias que diferem significativamente segundo teste SNK, $P < 0,05$.

Um perfil semelhante de expressão é em geral esperado para plantas transplastômicas que ainda não alcançaram a homoplasma, ou seja, estão em estado heteroplásmico em que parte dos genomas são transformados e parte ainda permanece não transformado, tipo WT (Drescher et al., 2000; Kode et al., 2005; Rogalski et al., 2006). Contudo, o estado de homoplasma foi confirmado para todos os genótipos em estudo através do teste de germinação de sementes, conforme mostrado anteriormente (Svab e Maliga, 1993).

3.4 Expressão de genes relacionados ao metabolismo de ácidos graxos

Para verificar se a expressão das dessaturases de cianobactéria em plantas de tabaco exerce influência sobre o metabolismo de ácidos graxos em nível transcricional, diversos genes atuantes nessa via metabólica foram selecionados para análise de expressão gênica por PCR em tempo real em plantas com 8 semanas (Figura 7). Os dados indicam que a presença das dessaturases transgênicas não afeta, em nível transcricional, as dessaturases endógenas FAD2 ($\omega 3$ acil-lipídio dessaturase do retículo

endoplasmático, produz principalmente 18:2 $\Delta^{9,12}$), FAD4 (t Δ^3 palmitoil-lipídio dessaturase plastidial, produz 16:1 Δ^3), FAD7 (ω^3 acil-lipídio dessaturase plastidial, produz 18:3 $\Delta^{9,12,15}$) e SSI2 (Δ^9 acil-ACP dessaturase, produz 18:1 Δ^9). Entretanto, um nível significativamente maior de transcritos dos genes *FAD5* (codifica a enzima Δ^7 palmitoil-lipídio dessaturase plastidial, produz 16:1 Δ^7) e *FAD6* (codifica a enzima ω^6 acil-lipídio dessaturase plastidial, produz 18:2 $\Delta^{9,12}$ e 16:2 $\Delta^{7,10}$) foi apresentado pelos genótipos *pSdesB* e *pSdesC* em relação a WT. Porém, é importante ressaltar que níveis altos desses transcritos também foram apresentados por plantas *pEnptII*, similares a *pSdesB* e *pSdesC*, o que exclui uma possível influência das dessaturases transgênicas no nível de mRNA dessas desaturases endógenas.

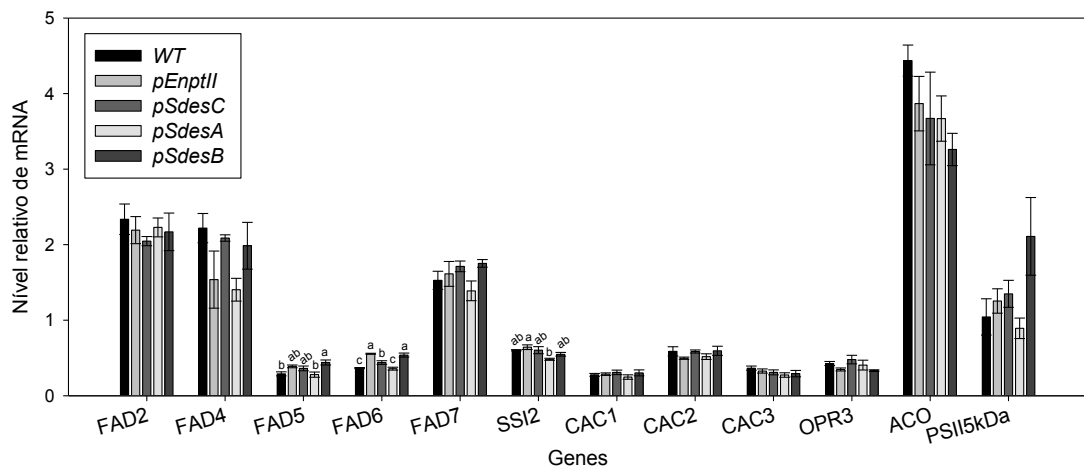


Figura 7: Expressão de genes relacionados ao metabolismo de ácidos graxos em plantas de 8 semanas dos genótipos controle (WT e *pEnptII*) e de plantas expressando diferentes dessaturases de cianobactéria (*pSdesC*, *pSdesA* e *pSdesB*). O nível de mRNA foi normalizado usando o gene de referência *PP2A*. Resultado similar foi obtido usando o gene de referência *L25*. Os valores são apresentados como médias $\pm$ EP de 3 repetições; letras diferentes correspondem a médias que diferem significativamente segundo teste SNK, $P < 0,05$.

Semelhantemente, as subunidades da enzima acetil-CoA carboxilase (ACCase) codificadas pelo pelos genes nucleares *CAC1* (subunidade BCCP, proteína transportadora da carboxil biotina), *CAC2* (subunidade BC, biotina carboxilase) e *CAC3* (α -CT, subunidade α da carboxil transferase) não tiveram seus níveis de mRNA alterados pela expressão dos transgenes. Igualmente, nenhuma diferença de expressão entre os genótipos avaliados foi observada para os genes regulados por jasmonatos

OPR3 (codifica a enzima 12-oxofitodienoato redutase, atuante na via de biossíntese de jasmonato), *ACO* (codifica a enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase, atuante na via de biossíntese de etileno) e *PSII5kDa* (codifica uma subunidade de 5kDa do fotossistema II).

A análise de expressão gênica também foi realizada em plantas com 4 semanas, onde o perfil de expressão obtido foi semelhante entre os genótipos em estudo (dados não mostrados). Dessa forma, para os genes analisados, os dados obtidos indicam que os mesmos não sofreram alterações transcricionais significativas entre os genótipos transplastômicos e WT, mesmo nas plantas *pSdesB*, as quais tiveram um grande comprometimento do crescimento quando cultivadas em condições de casa de vegetação.

Os níveis de transcritos das dessaturases transgênicas também foram comparados com o nível de mRNA das dessaturases endógenas (Figura 8), além da comparação com transcritos plastidiais anteriormente apresentada (Figura 6). Transcritos do transgene *desC* alcançaram níveis muito acima de todas as outras dessaturases, enquanto mRNA dos transgenes *desA* e *desB* acumularam-se na mesma faixa de variação das dessaturases endógenas.

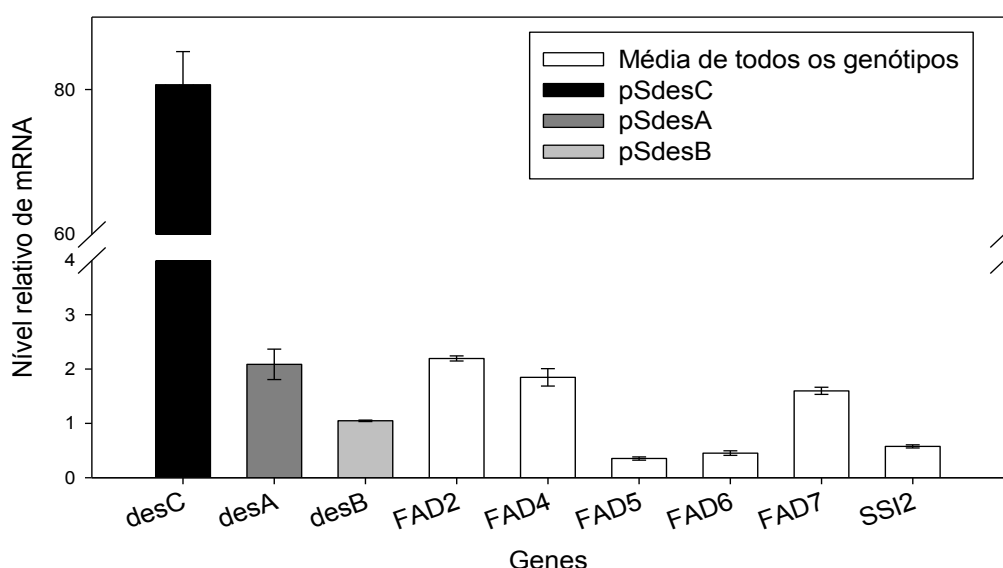


Figura 8: Nível relativo de mRNA das dessaturases transgênicas *desC*, *desA* e *desB* nos respectivos genótipos *pSdesC*, *pSdesA* e *pSdesB* em comparação com os níveis de expressão das dessaturases endógenas (nível médio entre todos os genótipos) em plantas de 8 semanas. O nível de mRNA apresentado no gráfico é relativo ao gene de referência *PP2A*. Os valores são apresentados como médias $\pm$ EP de 3 repetições.

3.5 Conteúdo e perfil de ácidos graxos em folhas

O conteúdo médio de ácidos graxos totais em plantas transplastômicas expressando os genes de cianobactéria *desC* e *desA* foi similar ao de plantas controle (WT e *pEnptII*) nos dois estádios de desenvolvimento avaliados (Figura 9). Em contrapartida, plantas transplastômicas expressando o gene *desB* de cianobactéria apresentaram um aumento no conteúdo de ácidos graxos totais de um modo dependente do estágio de desenvolvimento das plantas *pSdesB*. Isto é, enquanto plantas mais jovens (4 semanas) mostraram um conteúdo de ácidos graxos similar aos controles, plantas de 8 semanas alcançaram em média 30% mais ácidos graxos do que plantas WT (Figura 9).

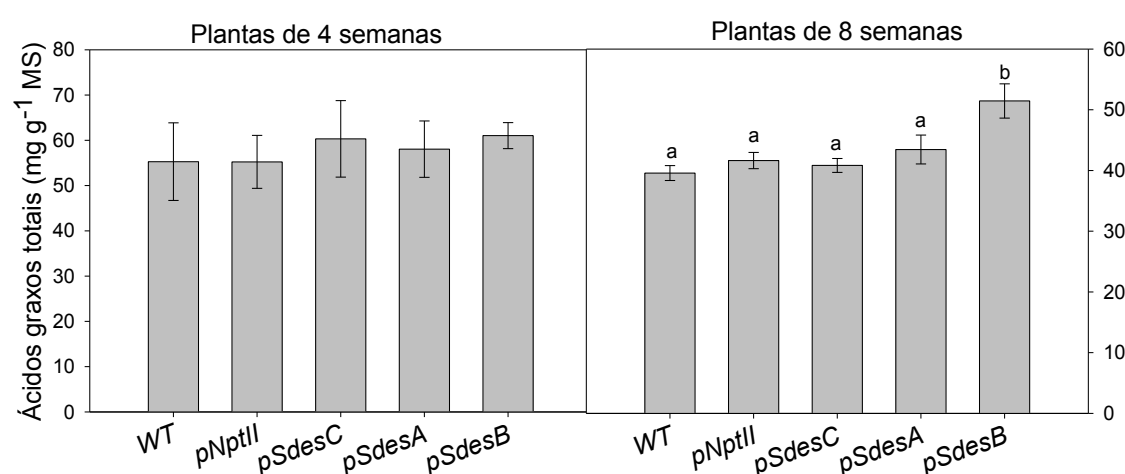


Figura 9: Conteúdo de ácidos graxos totais em plantas com 4 e 8 semanas dos genótipos controle (WT e *pEnptII*) e expressando dessaturases de cianobactéria (*pSdesC*, *pSdesA* e *pSdesB*). Os valores são apresentados como médias $\pm$ EP de 6 repetições; letras diferentes correspondem a médias que diferem significativamente segundo teste SNK, $P < 0,05$.

Por outro lado, nenhum dos genótipos transplastômicos expressando dessaturases transgênicas apresentou um perfil médio de ácidos graxos significativamente diferente dos genótipos controle (Tabela 6). A avaliação do perfil de ácidos graxos agrupados nas classes saturados, insaturados e trienoicos também mostrou que os genótipos *pSdesC*, *pSdesA* e *pSdesB* não sofreram qualquer tipo de modificação no perfil de instauração dos ácidos graxos, tanto no estágio de 4 (dados não mostrados) como no de 8 semanas (Figura 10).

Tabela 6: Perfil de ácidos graxos em folhas de plantas com 4 e 8 semanas dos genótipos controle (WT e *pEnptII*) e expressando dessaturases de cianobactéria (*pSdesC*, *pSdesA* e *pSdesB*)

Genótipo	Ácido graxo (% mol)						
	16:0	16:1	16:3	18:0	18:1	18:2	18:3
4 semanas							
WT	17,71 ± 0,23	3,20 ± 0,05	5,85 ± 0,13	2,17 ± 0,18	2,37 ± 0,27	14,49 ± 0,43	52,22 ± 0,61
<i>pNptII</i>	18,40 ± 1,00	3,14 ± 0,07	5,73 ± 0,21	2,69 ± 0,63	2,29 ± 0,22	13,85 ± 0,64	53,90 ± 1,25
<i>pSdesC</i>	17,19 ± 0,24	3,24 ± 0,05	5,85 ± 0,12	1,72 ± 0,07	2,35 ± 0,25	14,37 ± 0,39	55,26 ± 0,70
<i>pSdesA</i>	17,44 ± 0,36	3,25 ± 0,04	6,02 ± 0,06	1,91 ± 0,26	2,45 ± 0,16	14,47 ± 0,41	54,46 ± 0,30
<i>pSdeB</i>	18,80 ± 0,91	3,10 ± 0,01	5,35 ± 0,13	2,70 ± 0,51	2,33 ± 0,19	14,13 ± 0,53	53,58 ± 0,90
8 semanas							
WT	17,71 ± 0,23	2,51 ± 0,14	4,80 ± 0,11 ^{ab}	2,63 ± 0,14	2,09 ± 0,08	15,58 ± 0,27	54,68 ± 0,51
<i>pNptII</i>	18,58 ± 0,35	2,47 ± 0,10	4,79 ± 0,06 ^{ab}	2,98 ± 0,38	1,95 ± 0,07	15,43 ± 0,30	53,80 ± 0,86
<i>pSdesC</i>	18,26 ± 0,58	2,49 ± 0,11	5,04 ± 0,06 ^a	2,80 ± 0,34	1,99 ± 0,07	15,47 ± 0,23	53,94 ± 0,87
<i>pSdesA</i>	18,12 ± 0,63	2,30 ± 0,09	5,00 ± 0,11 ^a	2,88 ± 0,36	2,10 ± 0,14	16,08 ± 0,30	53,52 ± 1,05
<i>pSdeB</i>	19,58 ± 0,93	2,46 ± 0,07	4,55 ± 0,13 ^b	3,06 ± 0,61	1,91 ± 0,30	15,71 ± 0,61	52,73 ± 1,41

Os valores são apresentados como médias ± EP de 6 repetições; letras diferentes correspondem a médias que diferem significativamente segundo teste SNK, $P < 0,05$.

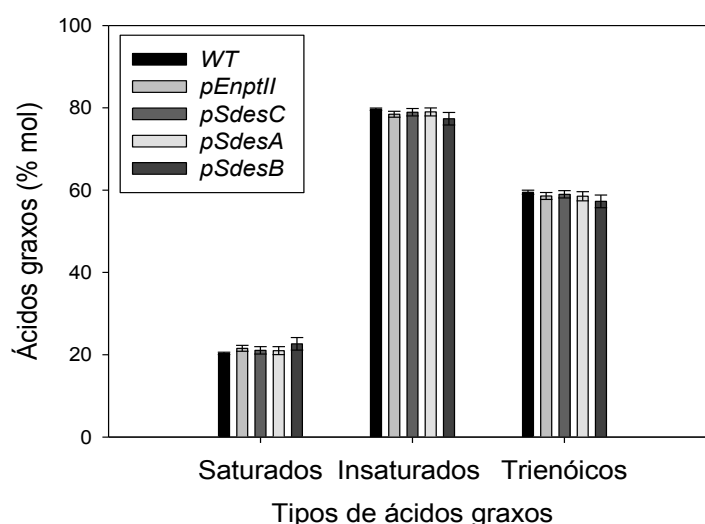


Figura 10: Perfil de ácidos graxos agrupados em saturados, insaturados e trienoicos em plantas com 8 semanas dos genótipos controle (WT e *pEnptII*) e expressando dessaturases de cianobactéria (*pSdesC*, *pSdesA* e *pSdesB*). Os valores são apresentados como médias ± EP de 6 repetições; as médias não diferem significativamente segundo ANOVA, $P < 0,05$.

3.6 Conteúdo e perfil de ácidos graxos em sementes

O conteúdo total de ácidos graxos em sementes foi similar entre os genótipos controle e plantas transplastômicas expressando dessaturases de cianobactéria (Figura 11). Da mesma forma, nenhuma alteração do perfil de ácidos graxos foi observada entre os genótipos em estudo (Tabela 7).

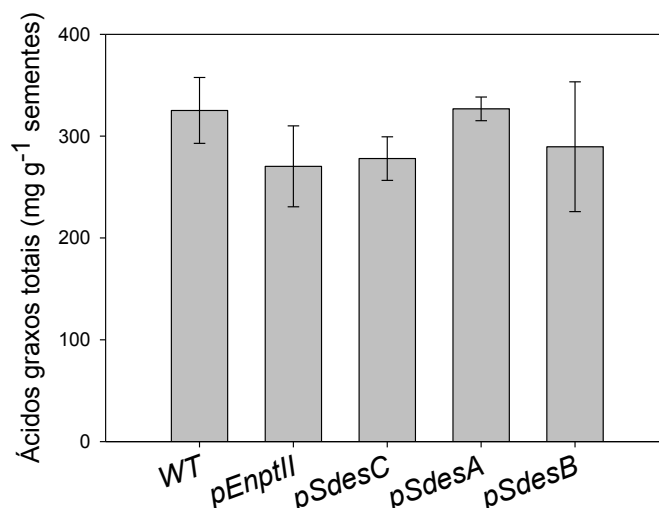


Figura 11: Conteúdo de ácidos graxos totais em sementes dos genótipos controle (WT e *pEnptII*) e expressando dessaturases de cianobactéria (*pSdesC*, *pSdesA* e *pSdesB*). Os valores são apresentados como médias $\pm$ EP de 6 repetições; as médias não diferem significativamente segundo ANOVA, $P < 0,05$.

Tabela 7: Perfil de ácidos graxos em sementes dos genótipos controle (WT e *pEnptII*) e expressando dessaturases de cianobactéria (*pSdesC*, *pSdesA* e *pSdesB*)

Genótipo	Ácido graxo (% mol)						
	16:0	18:0	18:1	18:1t	18:2	18:2t	18:3
WT	10,26 $\pm$ 0,084	3,04 $\pm$ 0,068	9,89 $\pm$ 0,072 ^b	0,41 $\pm$ 0,008	75,39 $\pm$ 0,219	0,20 $\pm$ 0,003 ^{ab}	0,80 $\pm$ 0,017
<i>pNptII</i>	10,53 $\pm$ 0,128	3,15 $\pm$ 0,088	10,36 $\pm$ 0,144 ^a	0,44 $\pm$ 0,037	74,47 $\pm$ 0,289	0,21 $\pm$ 0,008 ^a	0,83 $\pm$ 0,024
<i>pSdesC</i>	10,40 $\pm$ 0,219	3,16 $\pm$ 0,105	10,1 $\pm$ 0,128 ^{ab}	0,42 $\pm$ 0,008	74,97 $\pm$ 0,349	0,20 $\pm$ 0,003 ^{ab}	0,83 $\pm$ 0,03
<i>pSdesA</i>	10,37 $\pm$ 0,098	3,20 $\pm$ 0,119	10,29 $\pm$ 0,047 ^{ab}	0,39 $\pm$ 0,011	74,74 $\pm$ 0,189	0,20 $\pm$ 0,005 ^{ab}	0,80 $\pm$ 0,032
<i>pSdesB</i>	10,25 $\pm$ 0,156	2,83 $\pm$ 0,093	9,88 $\pm$ 0,065 ^b	0,42 $\pm$ 0,015	75,54 $\pm$ 0,273	0,18 $\pm$ 0,004 ^b	0,90 $\pm$ 0,02

Os valores são apresentados como médias $\pm$ EP de 6 repetições; letras diferentes correspondem a médias que diferem significativamente segundo teste SNK, $P < 0,05$.

3.7 Análises bioquímicas

Plantas de tabaco expressando dessaturases de cianobactéria apresentaram teores de clorofilas totais e de proteínas solúveis a níveis similares ao de plantas controle nos dois estádios de desenvolvimento vegetativo analisados (Figura 12). O conteúdo de aminoácidos totais também não diferiu entre os genótipos controle e transplastômicos *pSdesA* e *pSdesB*. Entretanto, plantas expressando o gene *desC* exibiram um conteúdo médio de aminoácidos maior do que o conteúdo dos demais genótipos, na idade de 8 semanas (Figura 12). Nenhuma diferença significativa foi registrada quanto ao conteúdo de nitrato em plantas jovens, enquanto apenas traços de nitrato foram identificado em plantas de 8 semanas (dados não mostrados).

Nenhuma diferença significativa foi observada entre plantas transplastômicas e WT com 4 semanas quanto ao conteúdo de amido e açúcares solúveis determinados no meio do período de luz (Figura 13). Todavia no estádio de 8 semanas, plantas *pSdesB* exibiram cerca de 30% menos amido e 20% menos sacarose em relação ao conteúdo de amido e sacarose em plantas WT. Ademais, níveis aumentados de frutose foram observados em todos os genótipos expressando dessaturases transgênicas, sendo, por sua vez, maiores em plantas *pSdesB*, as quais acumularam cerca de 30% mais frutose em comparação a plantas WT (Figura 13).

A concentração dos ácidos orgânicos malato e fumarato foi analisada nas plantas em estudo nos dois estádios de desenvolvimento supracitados. A concentração média de malato não diferiu entre os genótipos em nenhum dos estádios analisados. Já o teor médio de fumarato foi cerca de 140% maior em plantas *pSdesB* comparado a plantas WT no estádio de 8 semanas (Figura 14). Apenas traços de fumarato foram observados nas plantas com 4 semanas.

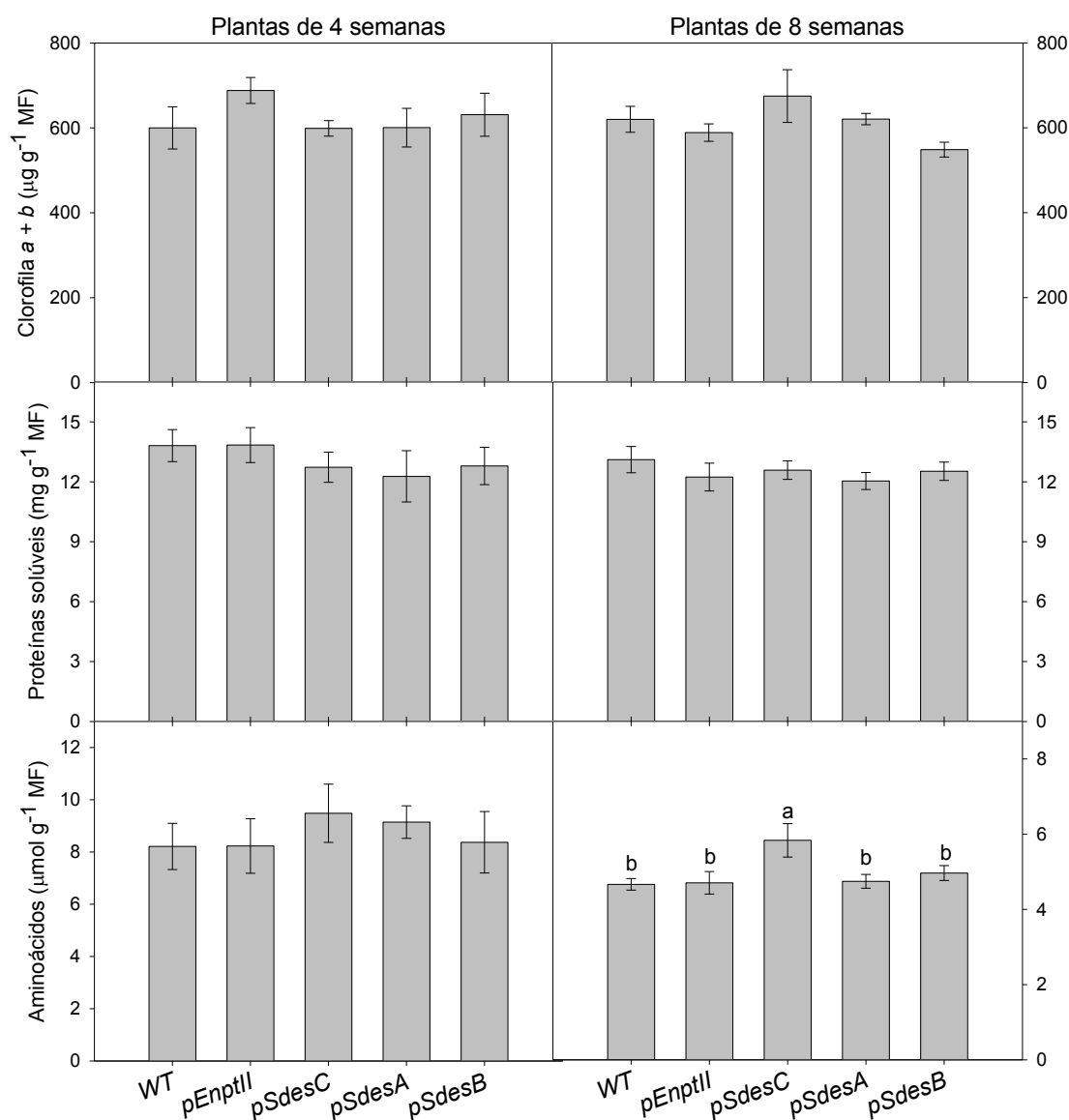


Figura 12: Teores de clorofilas totais, proteínas solúveis e aminoácidos em folhas, coletadas entre 11:00-11:30 horas da manhã, de plantas controle (WT e *pEnptII*) e expressando dessaturases de cianobactéria (*pSdesC*, *pSdesA* e *pSdesB*) nos estádios de 4 e 8 semanas. Os valores são apresentados como médias $\pm$ EP de 6 repetições; letras diferentes correspondem a médias que diferem significativamente segundo teste SNK, $P < 0,05$.

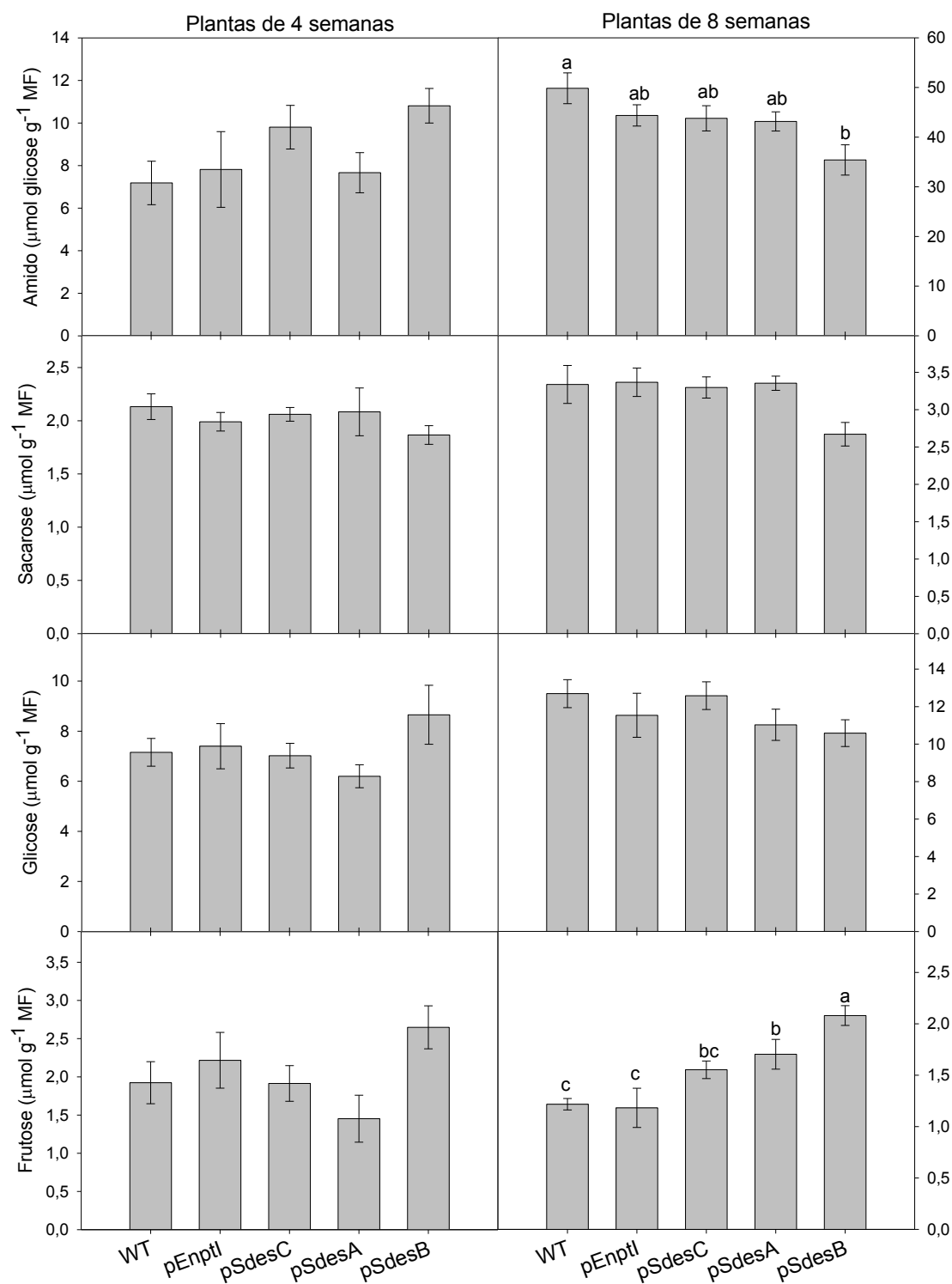


Figura 13: Conteúdo de amido e açúcares solúveis (sacarose, glicose e frutose) em folhas, coletadas entre 11:00-11:30 horas da manhã, de plantas controle (WT e *pEnptII*) e expressando dessaturases de cianobactéria (*pSdesC*, *pSdesA* e *pSdesB*) nos estádios de 4 e 8 semanas. Os valores são apresentados como médias $\pm$ EP de 6 repetições; letras diferentes correspondem a médias que diferem significativamente segundo teste SNK, $P < 0,05$.

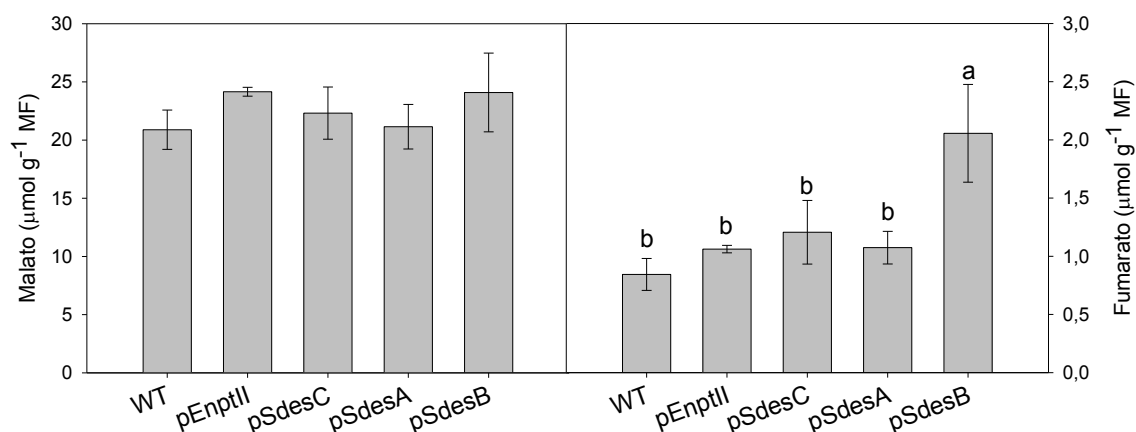


Figura 14: Conteúdo dos ácidos orgânicos malato e fumarato em folhas, coletadas entre 11:00-11:30 horas da manhã, de plantas controle (WT e *pEnptII*) e expressando dessaturases de cianobactéria (*pSdesC*, *pSdesA* e *pSdesB*) no estágio de 8 semanas. Os valores são apresentados como médias $\pm$ EP de 6 repetições; letras diferentes correspondem a médias que diferem significativamente segundo teste SNK, $P < 0,05$.

3.8 Avaliação do desempenho fotossintético

O desempenho fotossintético de plantas de tabaco transplastômicas expressando dessaturases transgênicas foi similar ao de plantas controle (WT e *pEnptII*) segundo parâmetros de fluorescência da clorofila *a* e de trocas gasosas medidos em plantas com 4 semanas (terceira ou quarta folha a partir do ápice). Igualmente, folhas jovens de plantas de 8 semanas também apresentaram valores médios dos parâmetros obtidos semelhantes entre os genótipos avaliados (Tabela 8).

Em contrapartida, medidas realizadas em folhas completamente expandidas indicam uma taxa aumentada de fotossíntese líquida e de respiração noturna em plantas *pSdesB*, cerca de 40% e 90% maior, respectivamente, do que em plantas WT. O genótipo *pSdesB* também apresentou um leve aumento (cerca de 4%) no rendimento quântico máximo do FSII e um aumento de mais de 40% na taxa de transporte de elétrons, indicando uma maior eficiência do aparato fotoquímico. Os demais genótipos transplastômicos (*pSdesC* e *pSdesA*) não mostraram diferenças significativas em relação às plantas controle (Tabela 8).

Tabela 8: Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* e de trocas gasosas em plantas com 8 semanas. Os parâmetros foram medidos na terceira e sétima folha a partir do ápice (folhas jovem e madura, respectivamente)

Parâmetros	Genótipos				
	WT	<i>pEnptII</i>	<i>pSdesC</i>	<i>pSdesA</i>	<i>pSdesB</i>
<u>Folha jovem</u>					
<i>A</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	14,10 $\pm$ 0,59	14,19 $\pm$ 0,22	15,32 $\pm$ 0,46	14,39 $\pm$ 0,21	15,46 $\pm$ 0,34
<i>R</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	-0,83 $\pm$ 0,07	-0,85 $\pm$ 0,11	-0,82 $\pm$ 0,07	-0,95 $\pm$ 0,11	-1,13 $\pm$ 0,17
<i>g</i> _s ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,48 $\pm$ 0,03	0,51 $\pm$ 0,03	0,55 $\pm$ 0,02	0,49 $\pm$ 0,02	0,54 $\pm$ 0,02
<i>C</i> _i / <i>C</i> _a	0,85 $\pm$ 0,009	0,86 $\pm$ 0,008	0,86 $\pm$ 0,005	0,85 $\pm$ 0,006	0,86 $\pm$ 0,003
<i>E</i> ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	4,74 $\pm$ 0,22	4,77 $\pm$ 0,13	5,05 $\pm$ 0,13	4,67 $\pm$ 0,15	4,92 $\pm$ 0,11
<i>A</i> / <i>E</i>	2,99 $\pm$ 0,08	2,98 $\pm$ 0,09	3,04 $\pm$ 0,09	3,11 $\pm$ 0,10	3,15 $\pm$ 0,05
<i>F</i> _v / <i>F</i> _m	0,76 $\pm$ 0,003 ^b	0,76 $\pm$ 0,003 ^{ab}	0,77 $\pm$ 0,001 ^a	0,76 $\pm$ 0,002 ^{ab}	0,77 $\pm$ 0,002 ^a
Φ_{FSII}	0,52 $\pm$ 0,01	0,53 $\pm$ 0,01	0,54 $\pm$ 0,01	0,53 $\pm$ 0,01	0,55 $\pm$ 0,01
Φ_{NPQ}	0,32 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,01	0,29 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,01
Φ_{NO}	0,16 $\pm$ 0,003	0,16 $\pm$ 0,004	0,17 $\pm$ 0,003	0,16 $\pm$ 0,005	0,16 $\pm$ 0,003
TTE ($\mu\text{mol e}^- \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	123,72 $\pm$ 4,6	123,20 $\pm$ 2,3	130,17 $\pm$ 2,9	123,59 $\pm$ 1,6	133,90 $\pm$ 2,7
<u>Folha madura</u>					
<i>A</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	7,17 $\pm$ 0,66 ^b	8,27 $\pm$ 0,70 ^b	7,80 $\pm$ 0,56 ^b	7,48 $\pm$ 0,56 ^b	10,46 $\pm$ 0,58^a
<i>R</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	-0,53 $\pm$ 0,03 ^a	-0,66 $\pm$ 0,11 ^a	-0,56 $\pm$ 0,05 ^a	-0,68 $\pm$ 0,09 ^a	-1,03 $\pm$ 0,05^b
<i>g</i> _s ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,22 $\pm$ 0,04	0,29 $\pm$ 0,05	0,24 $\pm$ 0,04	0,21 $\pm$ 0,04	0,39 $\pm$ 0,04
<i>C</i> _i / <i>C</i> _a	0,81 $\pm$ 0,02	0,84 $\pm$ 0,03	0,82 $\pm$ 0,02	0,80 $\pm$ 0,02	0,85 $\pm$ 0,02
<i>E</i> ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	2,62 $\pm$ 0,41	3,16 $\pm$ 0,41	2,74 $\pm$ 0,34	2,50 $\pm$ 0,35	3,84 $\pm$ 0,3
<i>A</i> / <i>E</i>	3,05 $\pm$ 0,26	2,77 $\pm$ 0,29	3,04 $\pm$ 0,22	3,25 $\pm$ 0,25	2,81 $\pm$ 0,17
<i>F</i> _v / <i>F</i> _m	0,75 $\pm$ 0,004 ^b	0,76 $\pm$ 0,002 ^b	0,76 $\pm$ 0,004 ^b	0,76 $\pm$ 0,002 ^b	0,78 $\pm$ 0,002^a
Φ_{FSII}	0,41 $\pm$ 0,01	0,44 $\pm$ 0,02	0,42 $\pm$ 0,01	0,43 $\pm$ 0,01	0,46 $\pm$ 0,01
Φ_{NPQ}	0,44 $\pm$ 0,01	0,41 $\pm$ 0,03	0,43 $\pm$ 0,01	0,42 $\pm$ 0,01	0,40 $\pm$ 0,01
Φ_{NO}	0,15 $\pm$ 0,003	0,15 $\pm$ 0,005	0,15 $\pm$ 0,004	0,16 $\pm$ 0,003	0,14 $\pm$ 0,002
TTE ($\mu\text{mol e}^- \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	60,81 $\pm$ 3,61 ^b	68,77 $\pm$ 6,21 ^b	65,06 $\pm$ 3,61 ^b	61,23 $\pm$ 3,73 ^b	88,84 $\pm$ 4,01^a

Os valores são apresentados como médias $\pm$ EP de 9 repetições; letras diferentes correspondem a médias que diferem significativamente segundo teste SNK, $P < 0,05$. *A*, Taxa líquida de fotossíntese; *R*, taxa de respiração noturna; *g*_s, condutância estomática; *C*_i / *C*_a, razão entre a concentração interna e externa de CO₂; *E*, taxa transpiratória; *A* / *E*, eficiência do uso da água dada pela razão entre as taxas de fotossíntese líquida e de transpiração; *F*_v / *F*_m, rendimento quântico máximo do FSII; Φ_{FSII} , rendimento quântico efetivo do FSII; Φ_{NPQ} , rendimento quântico da dissipação da energia regulada no FSII; Φ_{NO} , rendimento quântico da dissipação da energia não regulada no FSII; TTE, taxa de transporte de elétrons.

3.9 Tolerância a estresse por temperaturas alta e baixa

O grau de injúrias sofrido pelo tecido foliar foi similar entre as plantas transplastômicas expressando dessaturases de cianobactéria e plantas controle quando

incubadas a 4°C ou a 40°C, no estágio cotiledonar e com 2 semanas (Figura 15). A 4°C, todos os genótipos apresentaram paralisação do crescimento vegetativo, enquanto a 40°C, além de um reduzido crescimento, todas as plantas avaliadas apresentaram clorose seguida por necrose nas folhas mais velhas. A recuperação pós-estresse entre os genótipos supracitados também foi similar em todos os estádios de desenvolvimento avaliados.

Além das observações qualitativas acima destacadas, parâmetros de fluorescência da clorofila *a* e de trocas gasosas foram medidos na folha mais expandida de plantas com 4 semanas após dois dias a 4°C ou a 40°C (Tabela 9). A ETR média de plantas *pSdesB* foi aproximadamente 20% maior que em plantas WT, entretanto, a diferença entre as médias não foi significativa segundo o teste *t* ($P < 0,05$). Além disso, no geral, os parâmetros fotossintéticos medidos corroboram as anotações qualitativas levantadas, não havendo diferenças significativas entre os genótipos quanto ao desempenho fotossintético a 4°C ou a 40°C.

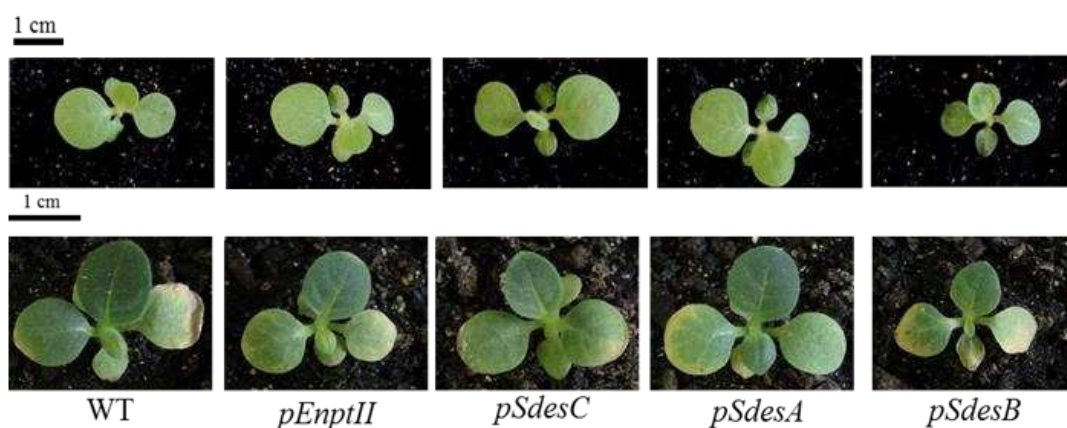


Figura 15: Plantas com 2 semanas após 8 dias a 4°C (acima) ou a 40°C (abaixo). Amostra representativa dos genótipos WT e *pEnptII* (genótipos controle) e dos genótipos *pSdesC*, *pSdesA* e *pSdesB* (expressando dessaturases de cianobactéria).

Tabela 9: Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* e de trocas gasosas de plantas com 4 semanas submetidas a estresse por temperatura. Os parâmetros foram obtidos em plantas controle (plantas mantidas em condição de casa de vegetação), após 2 dias a 4°C e após 2 dias a 40°C

Parâmetros	Genótipos				
	WT	<i>pEnptII</i>	<i>pSdesC</i>	<i>pSdesA</i>	<i>pSdesB</i>
<u>Controle</u>					
<i>A</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	12,4 $\pm$ 0,9	13,9 $\pm$ 1,8	14,1 $\pm$ 0,7	14,3 $\pm$ 0,6	15,8 $\pm$ 0,7
<i>R</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	-1,38 $\pm$ 0,10	-1,31 $\pm$ 0,03	-1,52 $\pm$ 0,10	-1,44 $\pm$ 0,13	-1,61 $\pm$ 0,11
F_v / F_m	0,765 $\pm$ 0,003	0,771 $\pm$ 0,005	0,774 $\pm$ 0,003	0,774 $\pm$ 0,004	0,762 $\pm$ 0,005
TTE ($\mu\text{mol e}^- \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	112,4 $\pm$ 5,1	124,2 $\pm$ 10,1	122,5 $\pm$ 5,9	128,7 $\pm$ 3,7	135,8 $\pm$ 5,1
<u>4°C</u>					
<i>A</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	nd	nd	nd	nd	0,06 $\pm$ 0,36
<i>R</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	-2,39 $\pm$ 0,12	-1,87 $\pm$ 0,02	-2,15 $\pm$ 0,14	-2,08 $\pm$ 0,11	-2,61 $\pm$ 0,23
F_v / F_m	0,744 $\pm$ 0,004	0,747 $\pm$ 0,019	0,733 $\pm$ 0,004	0,742 $\pm$ 0,013	0,732 $\pm$ 0,003
TTE ($\mu\text{mol e}^- \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	43,9 $\pm$ 2,9 ^{ab}	38,4 $\pm$ 3,7 ^b	43,4 $\pm$ 2,7 ^{ab}	36,7 $\pm$ 2,5 ^b	53,0 $\pm$ 2,1 ^a
<u>40°C</u>					
<i>A</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	1,40 $\pm$ 0,55	0,02 $\pm$ 0,56	0,48 $\pm$ 0,70	nd	0,02 $\pm$ 0,63
<i>R</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	-1,45 $\pm$ 0,19	-1,64 $\pm$ 0,04	-1,85 $\pm$ 0,06	-1,72 $\pm$ 0,25	-1,91 $\pm$ 0,08
F_v / F_m	0,729 $\pm$ 0,018	0,700 $\pm$ 0,024	0,723 $\pm$ 0,017	0,706 $\pm$ 0,006	0,548 $\pm$ 0,113
TTE ($\mu\text{mol e}^- \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	31,9 $\pm$ 2,6	26,4 $\pm$ 6,5	27,8 $\pm$ 2,0	28,4 $\pm$ 1,4	23,2 $\pm$ 8,2

Os valores são apresentados como médias $\pm$ EP de 3 repetições; letras diferentes correspondem a médias que diferem significativamente segundo teste SNK, $P < 0,05$. *A*, Taxa líquida de fotossíntese; *R*, taxa de respiração noturna; F_v / F_m , rendimento quântico máximo do FSII; TTE, taxa de transporte de elétrons.

4. Discussão

4.1 Transformação plastidial e expressão diferencial dos transgenes

A inserção dos transgenes e o estado de homoplasma dos genótipos transplastômicos foram confirmados através de PCR e teste de germinação de sementes em meio de cultura contendo antibióticos. Entretanto, diferentes níveis de RNA mensageiro (mRNA) dos transgenes *desC*, *desA* e *desB* foram observados nos genótipos *pSdesC*, *pSdesA* e *pSdesB*, respectivamente. Tomando como referência o gene *atpI*, cujo promotor foi utilizado para a expressão dos supracitados transgenes, os níveis de mRNA dos genes *desC*, *desA* e *desB* em plantas com 8 semanas, tiveram uma redução de mais de 37%, 98% e 99%, respectivamente. Curiosamente, esse padrão de redução também foi detectado nos níveis de mRNA do gene marcador de seleção *aadA*.

Um acúmulo de mRNA dos transgenes abaixo do esperado poderia ser devido à recombinação entre sequências promotoras ou terminadoras que flanqueiam os transgenes e seus homólogos no genoma plastidial, resultando na deleção do transgene. Contudo, se tal evento ocorresse plantas transformadas apresentariam dois tipos de genótipo plastidial, um contendo o transgene e outro sem o transgene, sendo esse estado de heteroplasma facilmente identificado através do teste de germinação de sementes em meio contendo antibiótico, por meio da visualização de plântulas brancas ou variegadas. Além disso, eventos de recombinação dessa natureza culminariam concomitantemente na deleção de genes endógenos essenciais, o que resultaria no aparecimento de deformação foliar ao longo do desenvolvimento das plantas (Rogalski et al., 2006; Rogalski et al., 2008a; Rogalski et al., 2008b) crescidas em solo ou mesmo *in vitro*. Como a homoplasma foi comprovada e nenhum efeito sobre a morfologia das folhas nos genótipos transplastômicos foi observada, esse tipo de recombinação pode ser descartada.

A possibilidade de recombinação entre pequenas sequências de repetição direta envolvendo a região terminal 3' dos transgenes que codificam as dessaturases de cianobactéria e a região promotora do gene *aadA*, entretanto, não deve ser negligenciada. Um evento dessa natureza não implicaria em perdas de genes endógenos, afetando apenas a estrutura e expressão dos transgenes através de deleção de parte do gene e/ou da região 3'UTR das dessaturases transgênicas (*Trps16*, ver Figura 1) e/ou do promotor do gene *aadA* (*Prrn*, ver Figura 1), por exemplo. Ademais, a redução dos níveis de mRNA do gene *aadA* apresentada pelos genótipos transplastômicos parece ter

sido dependente do transgene inserido no cassete de transformação anteriormente (*upstream*) ao gene *aadA*, ou seja do tipo de dessaturase, uma vez que a expressão do gene *aadA* em plantas *pSdesA* e *pSdesB* foi muito menor do que em *pSdesC* e *pEnptII*, assim como a expressão dos genes *desA* e *desB*.

A hipótese de recombinação entre sequências curtas de repetição direta em plastoma de tabaco é suportada pelo trabalho de Staub e Maliga (1994), os quais provaram a possibilidade de haver recombinação entre sequências invertidas repetidas de apenas 16pb (5'-GTACTGtGCTCTCCAA-3' / 5'-GTACTGcGCTCTCCAA-3'), ainda que as mesmas não fossem totalmente complementares, gerando um pequeno fragmento de DNA circular em plastídios. Interessantemente, esse tipo de recombinação, apesar de envolver sequências internas aos endógenos *trnA* e *trnI*, o evento só foi apresentado por plantas submetidas à transformação plastidial (Staub e Maliga, 1994). Logo, aparentemente, esse evento de recombinação homóloga está associado ao processo de transformação. A ocorrência desse tipo de recombinação nos plastomas de plantas *pSdesC*, *pSdesA* e *pSdesB* poderá futuramente ser averiguada a partir de *Northern blot* e *Southern blot* ou sequenciamento dos cassetes inseridos nos genomas plastidiais das plantas transplastômicas.

Apesar da reduzida expressão dos transgenes de cianobactéria (principalmente *desA* e *desB*) em comparação ao gene *atpI*, ressalta-se que, ainda assim, os mesmos têm potencial de influenciar o metabolismo de ácidos graxos uma vez que apresentaram níveis de mRNA comparáveis ao de dessaturases endógenas.

4.2 A expressão do transgene *desB* em plastídios de tabaco resultou em acúmulo de ácidos graxos e menor crescimento

A expressão do transgene *desB* (codifica a enzima $\Delta 15$ dessaturase de cianobactéria) em plantas de tabaco, surpreendentemente, resultou em um aumento em mais de 30% no conteúdo de ácidos graxos totais em folhas de plantas *pSdesB* com 8 semanas (Figura Suplementar 1), enquanto o perfil de ácidos graxos sofreu pouca alteração relativo ao de plantas controle, tanto em 4 como em 8 semanas. Somado a isso, interessantemente, plantas *pSdesB* apresentaram uma forte redução do crescimento e do acúmulo de biomassa seca na raiz e na parte aérea. Além disso, é importante destacar que tais características foram apresentadas pelas plantas *pSdesB* mesmo sendo o nível de mRNA do transgene *desB* menor que o da dessaturase endógena *FAD7* (uma $\Delta 15$ dessaturase plastidial correspondente).

O resultado apresentado difere de trabalhos anteriores nos quais o gene *FAD7* de *A. thaliana*, direcionado para os plastídios, foi superexpresso em plantas de tabaco (Kodama et al., 1994; Kodama et al., 1995). Em nenhum desses trabalhos é destacado alguma alteração fenotípica ou no conteúdo de ácidos graxos. Todavia, um aumento significativo de ácidos graxos trienoicos foi observado em folhas quando as plantas foram mantidas a 25°C em relação a WT, embora tal diferença fosse perdida quando as mesmas eram aclimatadas a 15°C (Kodama et al., 1995). Em outro trabalho similar, Khodakovskaya et al. (2006) inseriram o gene *FAD7* de *A. thaliana* em tabaco sob o controle do promotor *cor15a* (induzido por baixa temperatura), e, igualmente, não foram observadas alterações fenotípicas nas plantas transgênicas em relação ao controle. Contudo, deve-se destacar que o presente trabalho é o primeiro relato de expressão de uma $\Delta 15$ dessaturase de cianobactéria em plantas via transformação plastidial. Também é importante ressaltar que as dessaturases codificadas pelo gene *desB* de cianobactéria e pelo gene *FAD7* de *A. thaliana* têm apenas 49% de homologia entre as sequências de aminoácidos (Sakamoto et al., 1994a), o que pode grandemente influenciar na atividade, especificidade e regulação das enzimas supracitadas, e, consequentemente, no perfil de plantas transgênicas expressando as mesmas. Além disso, no mínimo duas $\Delta 15$ dessaturases plastidiais, *FAD7* e *FAD8* (Iba et al., 1993; McConn e Browse, 1996), e uma do retículo endoplasmático, *FAD3* (Browse et al., 1993), contribuem para a síntese e regulação dos níveis de ácidos graxos trienoicos em folhas de *A. thaliana*, e análise do perfil de ácidos graxos de mutantes e de duplo-mutantes têm mostrado haver uma certo grau de redundância de atividade entre essas dessaturases como forma de manter os níveis de ácidos graxos trienoicos estáveis (McConn e Browse, 1996).

Concomitante ao aumento do conteúdo de ácidos graxos no genótipo *pSdesB* com 8 semanas de idade, houve uma redução de 30% e 20% nos teores de amido e sacarose, respectivamente (Figura suplementar 2), sugerindo que uma maior quantidade de trioses-fosfatadas produzidas durante a assimilação de carbono fotossintética foi direcionada para a produção de acetil-CoA nos cloroplastos para suprir uma maior taxa de biossíntese de ácidos graxos (Chapman et al., 2013) em plantas *pSdesB* em relação a plantas WT. Plantas de tabaco superexpressando o gene plastidial *accD* (codifica a subunidade β -Carboxil transferase da enzima ACCase plastidial) também apresentaram um deslocamento no particionamento de assimilados em folhas através de um incremento de 5-10% no conteúdo de ácidos graxo totais, paralelo a um reduzido conteúdo de amido (Modoka et al., 2002). Um significativo aumento de ácidos graxos

na forma de triacilgliceróis acompanhado por um menor acúmulo de amido também foi apresentado por plantas de tabaco transgênicas superexpressando os genes codificantes das proteínas WRI1 (fator de transcrição relacionado à ativação da biossíntese de ácidos graxos em sementes de *A. thaliana*), DGAT1 (diacilglicerol acil-transferase de *A. thaliana*) e Oleosina (proteína estrutural de oleossomos em sementes) de *Sesamum indicum* (Vanhercke et al., 2014). Um padrão similar também foi observado em *A. thaliana* transgênica a partir da expressão ectópica de *WRI1* e da supressão do gene *APS1* (codifica a principal isoforma da pequena subunidade da ADP-glicose pirofosforilase), essencial para a síntese de amido (Sanjaya et al., 2011). No entanto, nenhum efeito negativo sobre o crescimento ou sobre o acúmulo de sacarose foi observado nesses dois trabalhos, sendo que em *A. thaliana* transgênica os níveis de sacarose chegaram a alcançar níveis maiores que em plantas WT.

Curiosamente, em *A. thaliana* superexpressando *WRI1* e *DGAT1* a biomassa de raiz e folhas foi reduzida em paralelo ao aumento de triacilgliceróis nos tecidos vegetativos (Kelly et al., 2013), ao contrário de plantas de *N. benthamiana* superexpressando os mesmos genes (Vanhercke et al., 2013), cujo crescimento não foi afetado. Porém, em outros trabalhos de engenharia genética para produção de plantas com maiores níveis de ácidos graxos em tabaco (Andrianov et al., 2010) e em *A. thaliana* (James et al., 2010; Winichayakul et al., 2013), não há registros de alteração nos conteúdos de amido ou sacarose ou efeito negativo sobre o fenótipo de crescimento.

Assim como nos genótipos *pSdesC* e *pSdesA*, plantas transplastômicas *pSdesB* não apresentaram alteração nos níveis de expressão de genes que codificam dessaturases endógenas. Tal fato, em conjunto com o perfil de ácido graxos inalterado, corrobora a existência de uma fina regulação da instauração a nível pós-transcricional em folhas de tabaco, conforme discutido a seguir. Ademais, o conteúdo de ácidos graxos totais foi aumentado, embora os níveis de mRNA das subunidades da ACCase permanecessem similares a WT, sugerindo a existência de uma regulação pós-transcricional em uma etapa comprometida com a biossíntese de ácidos graxos (Sasaki e Nagano et al., 2004).

Plantas *pSdesB* também apresentaram taxas aumentadas de fotossíntese (40% maior que WT) e respiração noturna (90% maior que WT) em folhas completamente expandidas, provavelmente devido à maior demanda por carbono assimilado para alimentar o nível aumentado de biossíntese de ácidos graxos. Plantas de *A. thaliana* transgênicas com uma diminuída degradação de triacilgliceróis por meio da superexpressão de oleosina e DAGT1 também apresentaram aumento na taxa de

fotossíntese (aproximadamente 24%) (Winichayakul et al., 2013), embora o aumento na assimilação de carbono tenha levado também ao aumento da biomassa nessas plantas, diferente do observado no genótipo *pSdesB* no presente estudo. Destaca-se, entretanto, que as plantas de *A. thaliana* produzidas por Winichayakul et al. (2013) foram manipuladas geneticamente para evitar o ciclo fútil de produção e degradação de triacilgliceróis, uma vez que os mesmos não se acumulam em grandes quantidades em condições naturais no tecido foliar, pois atuam como uma pequena reserva transiente para fornecer ácidos graxos durante a reciclagem de lipídios de membranas (Chapman et al., 2013). Já o ácido graxo acumulado pelas plantas *pSdesB* é possível que esteja em excesso e fazendo parte de um ciclo fútil de síntese e degradação de triacilglicerol, o que pode estar relacionado com o grande aumento na taxa de respiração noturna, e, em última análise, em um desperdício de energia que torna as taxas de assimilação fotossintética (apesar de maiores que em WT) insuficientes para manter um acúmulo normal de biomassa na planta como um todo. O maior conteúdo de fumarato em plantas *pSdesB* com 8 semanas é um indicativo de que a taxa de respiração também foi elevada durante o dia.

Outro fator que poderia também explicar o aumento da taxa de assimilação fotossintética observado em plantas *pSdesB*, é o maior fluxo de elétrons no FSII apresentado por esse genótipo, principalmente em folhas maduras, ocorrendo, dessa forma, uma menor limitação da assimilação de carbono devido a maior disponibilidade de NADPH e ATP (Heldt e Piechulla, 2011). Porém, não está claro qual é a relação entre a expressão da $\Delta 15$ dessaturase de cianobactéria em plantas *pSdesB* e o aumento da taxa de transporte de elétrons no FSII e também do rendimento quântico máximo do FSII. Alguns trabalhos sugerem uma relação positiva entre a presença de ácidos graxos poli-insaturados em membranas do cloroplasto e proteção da maquinaria fotoquímica, principalmente em condições estressantes (Los et al., 2013; Routaboul et al., 2012). O perfil de ácidos graxos em plantas *pSdesB*, entretanto, permaneceu similar ao de WT. Todavia, esse dado reflete um perfil geral a partir de todos os ácidos graxos presentes na amostra. Experimentos futuros avaliando o perfil de lipídios de membranas individuais, principalmente em folhas completamente expandidas onde os parâmetros fotossintéticos foram mais discrepantes, poderão esclarecer se ácidos graxos poli-insaturados estão se acumulando em membranas plastidiais e assim influenciando no desempenho da etapa fotoquímica de plantas *pSdesB*.

Uma questão desafiadora é desvendar qual a influência da expressão plastidial do transgene *desB* sobre a alteração do particionamento de assimilados favorecendo o acúmulo de ácidos graxos em plantas *pSdesB*, enquanto o perfil praticamente não é afetado. Sabe-se que a enzima codificada pelo gene *desB* é uma $\Delta 15$ dessaturase transmembrana que utiliza ácidos graxos dienoicos (18:2 ou 16:2) esterificados a glicerolipídios como substratos e, como os níveis de 18:2 detectados em folhas de tabaco são elevados (cerca de 15 % mol), o conteúdo de substrato não seria uma justificativa razoável para a falta de alteração nos perfis de ácidos graxos em plantas *pSdesB*. É importante destacar que $\Delta 15$ dessaturases são as últimas enzimas a atuarem na via de produção de ácidos graxos poli-insaturados e sua atividade é dependente da atividade sequencial de $\Delta 9$ dessaturases e $\Delta 12$ dessaturases para a produção de seu substrato (Sakamoto et al., 1994a). Logo, o produto catalisado pela enzima $\Delta 15$ dessaturase é um produto final da via metabólica de síntese de ácidos graxos poli-insaturados e se acumula em níveis superiores a 50% mol em folhas de tabaco (Craig et al., 2008; Kodama et al., 1994). O aumento do conteúdo de ácidos graxos em plantas *pSdesB* sugere haver algum tipo de regulação nessa etapa final da via que induz um aumento na síntese de ácidos graxos como um todo, saturados e insaturados, evitando alteração na relação saturados / insaturados.

Outro fato interessante apontado pelos dados obtidos a partir de plantas *pSdesB* foi a relação entre o estágio de desenvolvimento das plantas e as diferenças bioquímicas e fisiológicas entre plantas *pSdesB* e plantas controle (WT e *pEnptII*), as quais foram mais intensas em plantas mais velhas (8 semanas) do que em plantas jovens (4 semanas), embora plantas de 4 semanas já manifestassem um retardo no crescimento. Tal observação confirma a influência do aumento do conteúdo de ácidos graxos (que foi maior em plantas de 8 semanas relativo ao controle) sobre o acúmulo de sacarose e amido e o desempenho fotossintético.

Muitas questões acerca das características exibidas por plantas *pSdesB* ainda serão respondidas através de experimentos futuros. Uma dessas questões é o destino dos ácidos graxos acumulados, os quais possivelmente devem estar na forma de triacilgliceróis, que é a forma utilizada pelas células do tecido foliar de armazenar temporariamente ácidos graxos em excesso (Chapman et al., 2013). Acúmulo de lipídios na forma de gotas de óleo tem sido observado tanto no citosol (Chapman et al., 2013; Vanhercke et al., 2014; Winichayakul et al., 2013) quanto nos plastídios, sendo neste último compartimento denominado de plastoglôbulos, os quais têm uma amostra

mais complexa de lipídios, incluindo diversas prenilquinonas, e tende a se acumular principalmente em condições de estresse e durante a senescência (Bréhélin et al., 2007; Piller et al., 2012). Além disso, plantas de tabaco transplastômicas superexpressando o gene *accD*, conforme discutido anteriormente, apresentaram níveis aumentados de ácidos graxos, e segundo dados de microscopia, os ácidos graxos em excesso foram acumulados na forma de corpos lipídicos no estroma de plastídios (Madoka et al., 2002), sugerindo que alterações no metabolismo de ácidos graxos em etapas que ocorrem nos plastídios pode resultar em acúmulo de ácidos graxos nesta organela.

O promotor utilizado para a expressão dos transgenes *desC*, *desA* e *desB* foi obtido do gene *atpI* (Wurbs et al., 2007) que é potencialmente transcrito tanto pela RNA polimerase codificada pelo núcleo, NEP, como pela RNA polimerase codificada pelo plastoma, PEP (Hajdukiewicz et al., 1997). Uma vez que NEP participa da transcrição de muitos genes presentes em todos os plastídios (e não apenas em cloroplastos como os genes relacionados à fotossíntese, codificados em geral pela PEP) tais como o gene *accD* e outros genes que codificam proteínas ribossomais e RNAs transportadores (Hajdukiewicz et al., 1997), a expressão dos transgenes também é esperada ocorrer em plastídios de sementes. No entanto, os genótipos transplastômicos apresentaram apenas leves alterações no conteúdo ou no perfil de ácidos graxos em sementes, mesmo em plantas *pSdesB*. Isto pode ser devido à regulação do metabolismo de ácidos graxos em sementes, como sugere os dados de Madoka et al. (2002), em que plantas de tabaco superexpressando o gene plastidial *accD* tiveram um aumento no conteúdo de ácidos graxos em folhas, enquanto os níveis não foram modificados em sementes, ao invés disso, o rendimento de sementes por planta foi duplicado em relação a WT. Infelizmente os dados de rendimento das sementes do presente trabalho foram comprometidos pelo aparecimento de patógeno nas plantas durante o período reprodutivo, afetando a produção de sementes. Todavia, a avaliação do número de sementes sugerem uma baixa produtividade em plantas *pSdesB*, o que pode ser devido ao menor suprimento de assimilados na forma de sacarose dos tecidos fonte (folhas) para as sementes em maturação. A repetição desse experimento poderá futuramente esclarecer essa questão.

4.3 A expressão dos transgenes *desC* e *desA* em plastídios de tabaco não resultou em alterações moleculares, bioquímicas ou fisiológicas significativas

Os dados obtidos a partir da análise de ácidos graxos mostraram que as plantas de tabaco transplastômicas expressando o gene de cianobactéria *desC* (codifica a enzima $\Delta 9$ dessaturase), cultivadas em casa de vegetação, apresentaram conteúdo e perfil de ácidos graxos semelhantes às plantas controle (*WT* e *pEnptII*). Possivelmente, em consequência disso, pouca alteração quanto às características bioquímicas e fisiológicas avaliadas foi apresentada pelas plantas *pSdesC*.

Em um experimento similar, Craig et al. (2008) produziram plantas de tabaco transplastômicas expressando, independentemente, o gene que codifica a enzima solúvel acil-ACP $\Delta 9$ dessaturase de batata (*Solanum commersonii*) e o gene de cianobactéria (*Anacystis nidulans*) que codifica a enzima transmembrana acil-lipídio $\Delta 9$ dessaturase, ambas sob o controle do promotor do operon do RNA ribossomal. Apesar dos níveis de mRNA dos transgenes terem sido bem diferentes (o acúmulo do mRNA do gene de cianobactéria foi 80-65% menor) e levando-se em conta os diferentes sítios de localização das enzimas (solúvel ou inserida na membrana), interessantemente, ambos os genótipos transplastômicos produziram perfis de ácidos graxos semelhantes, não sendo detectadas diferenças entre os ácidos graxos individuais em relação ao controle. Igualmente, em *A. thaliana*, a superexpressão da enzima acil-ACP $\Delta 9$ dessaturase também não resultou em acúmulo do produto da enzima, o ácido oleico, e nem em grandes alterações nos demais ácidos graxos (Kachroo et al., 2007).

Tais resultados apontam para uma fina regulação que mantém a homeostase do nível de insaturação dos ácidos graxos presente nas folhas. De fato, sabe-se que em *Arabidopsis* as isoformas da enzima acil-ACP $\Delta 9$ dessaturase sofrem regulação pelo produto ácido oleico em nível transcricional e também inibindo a atividade da enzima, impedindo que haja acúmulo do produto e mantendo assim o perfil de ácidos graxos em equilíbrio (Kachroo et al., 2007). Ademais, a partir da análise de expressão de genes relacionados à síntese de ácidos graxos insaturados realizada neste trabalho, é sugerido que tal regulação ocorra também em plantas de tabaco, provavelmente, mediante controle pós-transcricional, uma vez que os níveis de mRNA das dessaturases endógenas e subunidades da ACCase plastidial foram semelhantes entre os genótipos avaliados. Trabalhos anteriores também indicam tal tipo de regulação para as enzimas dessaturases de tabaco (De Palma et al., 2008) e ACCase heteroméria (Andre et al., 2012; Bourrellier et al., 2010; Madoka et al., 2002; Sasaki e Nagano et al., 2004).

Por outro lado, não se pode descartar a hipótese de que a ausência de alterações significativas no perfil de ácidos graxos se deva a uma escassez de substrato nos sítios de atuação das supracitadas enzimas, uma vez que as plantas de tabaco do tipo selvagem, na condição de crescimento avaliada, já apresentam naturalmente um baixo teor de estereato (18:0, cerca de 2,2 % mol), o qual é o substrato da enzima $\Delta 9$ dessaturase usada neste trabalho (Sakamoto et al., 1994b). Além disso, é importante ressaltar que as enzimas acil-ACP glicerol 3-fosfato acil-transferases presentes nos plastídios tem preferência pelos ácidos graxos 16:0-ACP e 18:1-ACP, para a síntese de glicerolipídios segundo a via procariótica (Heldt e Piechulla, 2011). Logo, é possível que uma $\Delta 9$ dessaturase inserida na membrana (como a *desC* de cianobactéria) tenha pouca disponibilidade de seu substrato, o estereato esterificado a um lípidio de membrana. Tal fato pode explicar o porquê da aparente falta de efeito do transgene *desC*, apesar do seu mRNA ter se acumulado cerca de 140 vezes mais do que o gene endógeno *SSI2*, o qual codifica uma acil-ACP $\Delta 9$ dessaturase.

Outro fator a ser considerado é a especificidade pelo substrato, atividade específica e nível de inibição pelo produto das dessaturases, a qual pode variar consideravelmente mesmo entre isoformas de uma mesma espécie, tal como as isoformas da acil-ACP $\Delta 9$ dessaturase de *arabidopsis* (Kachroo et al., 2007), e provavelmente, na acil-ACP $\Delta 9$ dessaturase de lupina, cuja superexpressão em tabaco resultou no significativo aumento de ácido oleico em folhas (Zaborowska et al., 2002), o que contradiz os trabalhos relatados acima com tabaco e *arabidopsis*. Também, conforme sugerem Craig et al. (2008), a aparente falta de homogeneidade entre os trabalhos com plantas expressando $\Delta 9$ dessaturase transgênica, pode ser devido aos diferentes tipos de transgenes e/ou espécies alvo utilizadas.

Outros trabalhos com plantas expressando $\Delta 9$ dessaturase transgênicas têm apresentado resultados um tanto diferentes daqueles até aqui abordados. A superexpressão da enzima plastidial acil-ACP $\Delta 9$ dessaturase, por exemplo, em plantas de batata (*S. commersonii*) também resultou em pouca alteração do perfil de ácidos graxos em folhas (De Palma et al., 2008). Todavia, a produção do ácido graxo incomum em folhas, o ácido *cis*-vaccênico ($18:1\Delta^{11}$), foi identificada, o que resultou em uma diminuição dos níveis de ácidos graxos saturados (18:0) e aumento de trienólicos (18:3), sendo que o nível de trienólicos foram ainda maiores quando as plantas foram aclimatadas ao frio em comparação com plantas controle. A produção de ácido *cis*-vaccênico também foi identificada em plantas de tabaco superexpressando uma acil-

CoA $\Delta 9$ dessaturase de mamífero direcionada para o retículo endoplasmático, sendo o aumento de ácidos graxos monoinsaturados (principalmente 18:1 Δ^{11} , 16:1 Δ^7 e 16:1 Δ^9 , os quais não foram detectados em WT) observados, seguido por uma diminuição de ácidos graxos saturados e trienóidos (Moon et al., 2000). Um perfil de ácidos graxos diferente também foi obtido por plantas de tabaco superexpressando uma acil-lipídio $\Delta 9$ dessaturase de cianobactéria (*A. nidulans*) direcionada para os plastídios. A principal diferença das plantas transgênicas em relação a plantas WT foi a produção do ácido graxo incomum em folhas, o 16:1 Δ^9 , o que resultou no aumento de monoinsaturados (Ishizaki-Nishizawa et al., 1996). Nota-se, portanto, que abordagens transgênicas que alcançaram modificações mais significativas no perfil de ácidos graxos foram aquelas que resultaram na produção de ácidos graxos incomuns nas folhas, os quais provavelmente sejam metabolizados mais lentamente e assim tendem a se acumular. Ainda assim, observa-se nesses trabalhos uma tendência em se manter o nível geral de instauração, em que o aumento de ácidos graxos monoinsaturados incomuns, reflete nos níveis de ácidos graxos saturados, dienóicos e trienóicos.

Mesmo em alterações genótípicas mais severas, tal como o mutante nulo *ssi2* (codifica a principal isoforma da estearoil-ACP $\Delta 9$ dessaturase em *A. thaliana*), o nível de ácido α -linolênico, o principal ácido graxo em folhas de arabidopsis, permaneceu constante (Kachroo et al., 2001). Acredita-se que em folhas de arabidopsis, além de SSI2, no mínimo outras 4 estearoil-ACP $\Delta 9$ dessaturase sejam também ativas, apesar de terem menor atividade quando comparadas a SSI2, influenciando nos níveis de ácido oleico (Kachroo et al., 2007).

Semelhante ao genótipo *pSdesC*, plantas expressando o transgene *desA* (codifica a enzima $\Delta 12$ dessaturase) também não apresentaram modificações significativas nos níveis de ácidos graxos, bem como um padrão similar ao de plantas controle de expressão gênica, conteúdo de metabólitos básicos e desempenho fotossintético. O presente trabalho, baseado na inserção de um transgene codificando uma $\Delta 12$ dessaturase no genoma plastidial de plantas, é sem precedentes. Porém, a superexpressão de uma $\Delta 12$ dessaturase endógena, direcionada para o retículo endoplasmático, foi realizada por Zhou et al. (2010) em plantas de álamo (híbrido *Populus alba* x *P. glandulosa*). As linhas mais eficientes de plantas de álamo transgênicas alcançaram um acúmulo 2 vezes maior de mRNA da $\Delta 12$ dessaturase alvo e um aumento nos níveis dos ácidos linoleico e linolênico de até 7,5 e 3,9%, respectivamente, no tecido foliar. Tais mudanças foram consideradas leves, e os autores

sugeriram duas possíveis explicações: a complexidade da rede de síntese de ácidos graxos, envolvendo diversas vias interdependentes, enzimas e substratos; e, alternativamente, uma baixa estabilidade do mRNA ou da proteína e talvez uma escassez de proteínas transportadoras de elétrons associadas às dessaturases do retículo endoplasmático (Zhou et al., 2010). Diferenças de localização da enzima, genoma alvo e, também da espécie vegetal utilizada dificultam uma comparação entre as características apresentadas pelo genótipo em estudo *pSdesA* e plantas de álamo transgênicas produzidas por Zhou et al. (2010). Entretanto, a moderada alteração do perfil de ácidos graxos em álamo transgênico sugere mais uma vez uma fina regulação do nível de insaturação em plantas, conforme discutido anteriormente.

Interessantemente, a semelhança entre os genótipos *pSdesC* e *pSdesA*, expressando dessaturases que atuam sequencialmente ($\Delta 9$ e $\Delta 12$ dessaturases, respectivamente) pode sugerir algumas explicações para o perfil de ácidos graxos inalterado, ainda que o gene *desA* tenha se acumulado a um nível 4 vezes maior do que a correspondente enzima em plastídios de plantas (FAD6). Assim como a $\Delta 9$ dessaturase de cianobactéria, $\Delta 12$ dessaturase é uma enzima transmembrana que utiliza como substrato ácido oleico (18:1) esterificado a lipídios de membranas (Sakamoto et al., 1994c; Wada et al., 1993), uma acil-lipídio dessaturase. Contudo, em tabaco, apesar do ácido oleico ser um dos principais substratos para as enzimas acil-transferases, o mesmo se acumula em baixos níveis (cerca de 2,4 % mol em WT, ver Tabela 6), sugerindo que o ácido oleico produzido é metabolizado rapidamente a ácido linoleico e linolênico, os quais se acumulam em níveis consideráveis em folhas (cerca de 15 e 54 % mol). Também não se pode descartar a possibilidade de regulação da atividade enzimática pelo produto, baixa estabilidade da proteína heteróloga, ou ineficiente inserção nas membranas plastidiais.

Grande parte dos trabalhos envolvendo engenharia genética de $\Delta 12$ dessaturase em plantas estão focados na supressão de genes endógenos que codificam $\Delta 12$ dessaturases direcionadas para o retículo endoplasmático com o fim de aumentar o nível de ácidos graxos saturados e monoinsaturados em sementes (Jung et al., 2011; Haun et al., 2014; Pham et al., 2010), enquanto outros estão mais interessados em identificação e estudos funcionais (Lee et al., 2013; Zhang et al., 2009; Zhou et al., 2013). Contudo, um estudo pioneiro de identificação e caracterização de mutantes de *A. thaliana* deficientes na $\Delta 12$ dessaturase plastidial fornece interessantes informações acerca da regulação do perfil de ácidos graxos em folhas (Browse et al., 1989). Tais mutantes de *arabidopsis*

apresentaram alteração do perfil dos ácidos graxos de lipídios de membranas plastidiais com a diminuição no conteúdo de ácidos dienoicos e trienoicos, o que foi esperado uma vez que a enzima mutada influencia na composição de lipídios polares sintetizados pela via procariótica. Entretanto um interessante aumento de ácidos oleico e linoleico foi observado em fosfolipídios de membranas extraplastidiais (Browse et al., 1989), indicando que o perfil de instauração de lipídios polares plastidiais de algum modo influencia o perfil em membranas extraplastidiais, e em consequência do transporte de lipídios de membranas do retículo endoplasmático para os plastídios (Benning, 2008; Fan e Xu, 2011; Heldt e Piechulla, 2011) uma alteração brusca no perfil de instauração é amenizado.

4.4 Perfil similar de ácidos graxos resultou em similar desempenho em condições de estresse por alta ou baixa temperatura

A extensão do empacotamento de ácidos graxos em membranas biológicas é dependente do grau de instauração dos mesmos. Ácidos graxos de cadeia completamente saturada tendem a formar arranjos quase cristalinos, estabilizados através de interações intermoleculares de van der Waals entre as cadeias hidrocarbonadas, com alto ponto de fusão. Por outro lado, a presença de uma ou mais ligações duplas na conformação *cis*, inserem dobras rígidas na cadeia hidrocarbonada de ácidos graxos, gerando agregados menos estáveis, com menor ponto de fusão (Nelson e Cox, 2008). Assim, o nível de fluidez das membranas biológicas está diretamente relacionado com o perfil de instauração dos ácidos graxos que as compõem, e as plantas se utilizam desse fator alterando a composição de suas membranas em resposta a variações na temperatura ambiente a fim de manter a fluidez das membranas em uma condição ideal (Heldt e Piechulla, 2011).

Uma relação entre a proporção de ácidos graxos saturados e insaturados e a tolerância a estresse por temperatura em plantas transgênicas tem sido comprovada por diversos trabalhos (De Palma et al., 2008; Ishizaki-Nishizawa et al., 1996; Khodakovskaya et al., 2006; Kodama et al., 1994; Kodama et al., 1995; Routaboul et al., 2012). Plantas de tabaco transgênicas com um aumento de 10% em ácido graxos trienoicos, por exemplo, mostraram-se mais tolerantes a baixas temperaturas (Kodama et al., 1994; Kodama et al., 1995), enquanto mutantes de *A. thaliana* com comprometimento na expressão de dessaturases endógenas, portanto acumuladores de

ácidos graxos saturados, apresentaram tolerância, a curto-prazo, a altas temperaturas (Routaboul et al., 2012).

Contudo, conforme discutido anteriormente, os perfis de ácidos graxos apresentados pelas plantas transplastômicas expressando os genes de cianobactéria *desC*, *desA* e *desB* foram pouco alterados em relação às plantas controle (WT e *pEnptII*) nos dois estádios de desenvolvimento avaliados (4 e 8 semanas). Consequentemente, o desempenho dos genótipos em estudo quando mantidos em alta (40°C) ou baixa (4°C) temperatura foi similar, assim como a recuperação pós-estresse, em todos os estádios de desenvolvimento avaliados (cotiledonar, 2 semanas e 4 semanas).

5. Conclusão

Neste trabalho foi realizado um estudo das características moleculares, bioquímicas e fisiológicas apresentadas por plantas transplastômicas expressando dessaturases de cianobactéria. Análise inicial da expressão dos transgenes revelou que os níveis de mRNA podem diferir grandemente entre os genótipos transplastômicos, e parecem ser dependentes do tipo de dessaturase clonada. Em síntese, a expressão do transgene *desB* resultou em níveis aumentados de ácidos graxos em folhas, embora o perfil não tenha sido modificado, paralelo a um reduzido nível de amido e sacarose e menor acúmulo de biomassa. Em adição, elevadas taxas fotossintéticas, de respiração e de fluxo de elétrons no FSII foram registradas em folhas completamente expandidas, possivelmente relacionado a uma maior demanda por carbono assimilado e energia para alimentar a biossíntese de ácidos graxos. Em conjunto, os dados obtidos a partir de plantas *pSdesB* sugerem que a atividade da enzima $\Delta 15$ dessaturase de cianobactéria em cloroplastos de tabaco, induziram, por um mecanismo ainda desconhecido, um aumento na biossíntese *de novo* de ácidos graxos, incluindo ácidos graxos insaturados, provocando dessa forma um aumento no conteúdo de todos os tipos de ácidos graxos e evitando alteração da relação saturados / insaturados. Por outro lado, a expressão dos transgenes *desC* e *desA* não resultaram em alterações no conteúdo ou perfil de ácidos graxos em folhas ou sementes, e por conseguinte os demais parâmetros bioquímicos e fisiológicos avaliados também sofreram poucas modificações em relação às plantas controle. A regulação do perfil de ácidos graxos pelas plantas, principalmente em nível pós-transcricional, pode ser uma explicação para esse fato, assim como baixa disponibilidade de substrato nos sítios de atuação dessas dessaturases. Por fim, a ausência de alteração do perfil de ácidos graxos em plantas *pSdesC*, *pSdesA* e *pSdesB* resultou em desempenho similar ao de plantas controle, quando as mesmas foram submetidas a estresse por alta (40°C) ou baixa (4°C) temperatura.

6. Referências Bibliográficas

Andre C, Haslam RP, Shanklin J (2012) Feedback regulation of plastid acetyl-CoA carboxylase by 18:1-acyl carrier protein in *Brassica napus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 192(25): 10107-10112

Andrianov V, Borisjuk N, Pogrebnyak N, Brinker A, Dixon J, Spitsin S, Flynn J, Matyszczyk P, Andryszak K, Laurelli M, Golovkin M, Koprowski H (2010) Tobacco as a production platform for biofuel: overexpression of *Arabidopsis* DGAT and LEC2 genes increases accumulation and shifts the composition of lipids in green biomass. *Plant Biotechnol Journal*. 8(3): 277-287

Apel W, Schulze WX, Bock R (2010) Identification of protein stability determinants in chloroplasts. *Plant Journal*. 63: 636-650

Baud S, Lepiniec L (2010) Physiological and developmental regulation of seed oil production. *Progress In Lipid Research*. 49: 235–249

Baud, S. (2013) Fatty Acid Synthesis and Export. *In: Li-Beisson et al. (org) Acyl-Lipid Metabolism. The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists

Benning C (2008) A role for lipid trafficking in chloroplast biogenesis. *Progress in Lipid Research*. 47(5): 381-389

Bock R (2001) Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. *Journal of Molecular Biology*. 312: 425-438

Boland LM, Drzewiecki M (2008) Polyunsaturated Fatty Acid Modulation of Voltage-Gated Ion Channels. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 52: 59-84

Bourrelier ABF, Valot B, Guillot A, Ambard-Bretteville F, Vidal J, Hodges M (2010) Chloroplast acetyl-CoA carboxylase activity is 2-oxoglutarate – regulated by interaction of PII with the biotin carboxyl carrier subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107(1): 502-507

Bréhélin C, Kessler F, van Wijk KJ (2007) Plastoglobules: versatile lipoprotein particles in plastids. *Trends Plant Science*. 12(6): 260-266

Browse J, Kunst L, Anderson S, Hugly S, Somerville C (1989) A Mutant of *Arabidopsis* Deficient in the Chloroplast Δ^6 Desaturase. *Plant Physiology*. **90**: 522-529

Browse J, McConn M, James D Jr, Miquel M (1993) Mutants of *Arabidopsis* deficient in the synthesis of α -linolenate. Biochemical and genetic characterization of the endoplasmic reticulum linoleoyl desaturase. *The Journal of Biological Chemistry*. 268(22): 16345-51

Burdge GC, Calder PC (2005) α -Linolenic acid metabolism in adult humans: the effects of gender and age on conversion to longer-chain polyunsaturated fatty acids. *European Journal Lipid Science and Technology*. **107**: 426-439

Cernac A, Benning C (2004) WRINKLED1 encodes an AP2/EREB domain protein involved in the control of storage compound biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. **40**: 575-585

Cerutti H, Osman M, Grandoni P, Jagendorf AT (1992) A homolog of *Escherichia coli* RecA protein in plastids of higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **89**: 8068–8072

Chapman KD, Dyer JM, Mullen RT (2013) Commentary: why don't plant leaves get fat? *Plant Science*. **207**: 128– 134

Chen Y, Pang Q, Dai S, Wang Y, Chen S, Yan X (2011) Proteomic identification of differentially expressed proteins in *Arabidopsis* in response to methyl jasmonate. *Journal of Plant Physiology*. **168**: 995-1008

Christie WW (1989) Gas Chromatography and Lipids. *In: Gas Chromatography and Lipids*. PJ Barnes & Associates.

- Craig W, Lenzi P, Scotti N, De Palma M, Saggese P, Carbone V, McGrath-Curran N, Magee AM, Medgyesy P, Kavanagh TA, Dix PJ, Grillo S, Cardi T** (2008) Transplastomic tobacco plants expressing a fatty acid desaturase gene exhibit altered fatty acid profiles and improved cold tolerance. *Transgenic Research*. **17**: 769–782
- Cronan JD, Waldrop GL** (2002) Multi-subunit acetyl-CoA carboxylases. *Progress in Lipid Research*. **41**: 407-435
- DaMatta FM, Loos RA, Silva EA, Loureiro ME, Ducatti C** (2002) Effects of soil water deficit and nitrogen nutrition on water relations and photosynthesis of pot-grown *Coffea canephora* Pierre. *Trees-Structure and Function*. **16**: 555-558
- De Palma M, Grillo S, Massarelli I, Costa A, Balogh G, Vigh L, Leone A** (2008) Regulation of desaturase gene expression, changes in membrane lipid composition and freezing tolerance in potato plants. *Molecular Breeding*. **21**:15–26
- Doyle JJ, Doyle JL** (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**: 13–15
- Dowhan W, Bogdanov M, Mileykovskaya E** (2008) Functional roles of lipids in membranes. In: Vance, D. E., Vance, J. E. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. 5.ed. Elsevier
- Drescher A, Ruf S, Calsa T Jr, Carrer H, Bock R** (2000) The two largest chloroplast genome-encoded open reading frames of higher plants are essential genes. *Plant Journal*. **22**(2): 97-104
- Fahy D, Scheer B, Wallis JG, Browse J** (2012) Reducing saturated fatty acids in *Arabidopsis* seeds by expression of a *Caenorhabditis elegans* 16:0-specific desaturase. *Plant Biotechnology Journal*. **11**(4):480-489
- Fan J, Xu C** (2011) Genetic analysis of *Arabidopsis* mutants impaired in plastid lipid import reveals a role of membrane lipids in chloroplast division. *Plant Signaling & Behavior* **6**(3): 458-460

Fernie AR, Roscher A, Ratcliffe RG, Kruger NJ (2001) Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta*. **212**: 250-263

Fritz C, Palacios-Rojas N, Feil R, Stitt M (2006) Regulation of secondary metabolism by the carbon-nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *Plant Journal*. 46(4): 533-548

Geigenberger P, Kolbe A, Tiessen A (2005) Redox regulation of carbon storage and partitioning in response to light and sugars. *Journal of Experimental Botany*. 56(416): 1469–1479

Gibon Y, Blaesing OE, Hannemann J, Carillo P, Hohne M, Hendriks JH, Palacios N, Cross J, Selbig J, Stitt M (2004) A Robot-based platform to measure multiple enzyme activities in Arabidopsis using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. *Plant Cell*. **16**: 3304-3325

Graham IA, Cirpus P, Rein D, Napier JA (2004) The use of very long chain polyunsaturated fatty acids to ameliorate metabolic syndrome: transgenic plants as an alternative sustainable source to fish oils. *Nutrition Bulletin*. **29**: 228-233

Gregg, A. H. (2004) Jasmonates. In: Davies, P. J. (org) *Plant Hormones – Biosynthesis, Signal Transduction, Action*. Kluwer Academic Publishers.

Gunstone FD (2001) Soybeans pace boost in oilseed production. *Inform*. **11**: 1287–1289

Gutla PVK, Boccaccio A, Angeli AD, Gambale F, Carpaneto A (2012) Modulation of plant TPC channels by polyunsaturated fatty acids. *Journal of Experimental Botany*. 63(17): 6187-6197

Hajdukiewicz PT, Allison LA, Maliga P (1997) The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *EMBO Journal*. 16(13): 4041-4048

Haslam RP, Ruiz-Lopez N, Eastmond P, Moloney M, Sayanova O, Napier JA (2012) The modification of plant oil composition via metabolic engineering-better nutrition by design. *Plant Biotechnology Journal*. 11(2): 157-68

Haun W, Coffman A, Clasen BM, Demorest ZL, Lowy A, Ray E, Retterath A, Stoddard T, Juillerat A, Cedrone F, Mathis L, Voytas DF, Zhang F (2014) Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. *Plant Biotechnol Journal*. doi: 10.1111/pbi.12201

Heldt HW, Piechulla B (2011) Lipids are membrane constituents and function as carbon stores. In: *Plant Biochemistry*. 4.ed. Elsevier

Hendrickson L, Furbank RT, Chow WS (2004) A simple alternative approach to assessing the fate of absorbed light energy using chlorophyll fluorescence. *Photosynth Research*. 82(1): 73-81

Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water culture method for growing plants without soils. Berkeley: California Agricultural Experimental Station.

Hunt R, Causton DR, Shipley B, Askew AP (2002) A modern tool for classical plant growth analysis. *Annals of Botany*. 90: 485-488

Iba K, Gibson S, Nishiuchi T, Fuse T, Nishimura M, Arondel V, Hugly S, Somerville C (1993) A gene encoding a chloroplast omega-3 fatty acid desaturase complements alterations in fatty acid desaturation and chloroplast copy number of the *fad7* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*. 268(32): 24099-105

Ishizaki-Nishizawa O, Fujii T, Azuma M, Sekiguchi K, Murata N, Ohtani T, Toguri T (1996) Low-temperature resistance of higher plants is significantly enhanced by a nonspecific cyanobacterial desaturase. *Nature Biotechnology*. **14**: 1003-1006

James CN, Horn PJ, Case CR, Gidda SK, Zhang D, Mullen RT, Dyer JM, Anderson RG, Chapman KD (2010) Disruption of the *Arabidopsis* CGI-58 homologue produces Chanarin-Dorfman-like lipid droplet accumulation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **107**(41):17833-8

Jung C, Lyou SH, Yeu SY, Kim M, Rhee S, Kim M, Lee JS, Choi YD, Cheong JJ (2007) Microarray-based screening of jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*. **26**: 1053-1063

Jung JH, Kim H, Go YS, Lee SB, Hur CG, Kim HU, Suh MC (2011) Identification of functional *BrFAD2-1* gene encoding microsomal delta-12 fatty acid desaturase from *Brassica rapa* and development of *Brassica napus* containing high oleic acid contents. *Plant Cell Reports*. **30**(10): 1881-92

Kachroo A, Lapchyk L, Fukushige H, Hildebrand D (2003) Plastidial Fatty Acid Signaling Modulates Salicylic Acid- and Jasmonic Acid- Mediated Defense Pathways in the *Arabidopsis* *ssi2* Mutant. *The Plant Cell*. **15**: 2952-2965

Kachroo A, Kachroo P (2009) Fatty Acid-Derived Signals in Plant Defense. *Annual Review Phytopathology*. **47**: 153-176

Kachroo A, Shanklin J, Whittle E, Lapchyk L, Hildebrand D, Kachroo P (2007) The *Arabidopsis* stearoyl-acyl carrier protein-desaturase family and the contribution of leaf isoforms to oleic acid synthesis. *Plant Molecular Biology*. **63**: 257-271

Kachroo P, Shanklin J, Shah J, Whittle EJ, Kleissig DF (2001) A fatty acid desaturase modulates the activation of defense signaling pathways in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **98**(16): 9448-9453

Kelly AA, van Erp H, Quettier AL, Shaw E, Menard G, Kurup S, Eastmond PJ (2013) The sugar-dependent¹ lipase limits triacylglycerol accumulation in vegetative tissues of Arabidopsis. *Plant Physiology*. **162**: 1282-1289

Khodakovskaya M, McAvoy R, Peters J, Wu H, Li Y (2006) Enhanced cold tolerance in transgenic tobacco expressing a chloroplast omega-3 fatty acid desaturase gene under the control of a cold-inducible promoter. *Planta*. **223**(5): 1090-1100

Kodama H, Hamada T, Horiguchi G, Nishimura M, Iba K (1994) Genetic Enhancement of Cold Tolerance by Expression of a Gene for Chloroplast ω -3 Fatty Acid Desaturase in Transgenic Tobacco. *Plant Physiology*. **105**(2): 601-605

Kodama H, Horiguchi G, Nishiuchi T, Nishimura M, Iba K (1995) Fatty Acid Desaturation during Chilling Acclimation Is One of the Factors Involved in Conferring Low-Temperature Tolerance to Young Tobacco Leaves. *Plant Physiology*. **107**: 1177-1185

Kode V, Mudd EA, Iamtham S, Day A (2005) The tobacco plastid gene is essential and is required for leaf development. *Plant Journal*. **44**: 237-244

Krichevsky A, Meyers B, Vainstein A, Maliga P, Citovsky V (2010) Autoluminescent plants. *PLOS One* **5**(11): e15461

Kunst L, Samuels L (2009) Plant cuticles shine: Advances in wax biosynthesis and export. *Current Opinion Plant Biology*. **12**: 721-727

Lands WEM (2005) Dietary fat and health: the evidence and the politics of prevention: careful use of dietary fats can improve life and prevent disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1055**: 179-1992

Laurens LM, Quinn M, Wychen SV, Templeton DW, Wolfrum EJ (2012) Accurate and reliable quantification of total microalgal fuel potential as fatty acid methyl esters by in situ transesterification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **403**:167–178

Lee KR, In Sohn S, Jung JH, Kim SH, Roh KH, Kim JB, Suh MC, Kim HU (2013) Functional analysis and tissue-differential expression of four *FAD2* genes in amphidiploid *Brassica napus* derived from *Brassica rapa* and *Brassica oleracea*. *Gene*. 531(2): 253-62

Los DA, Mironov KS, Allakhverdiev SI (2013) Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions. *Photosynth Research*. 116(2-3): 489-509

Los DA, Murata N (1998) Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1394: 3-15

Madoka Y, Tomizawa KI, Miozoi J, Nishida I, Nagano Y, Sasaki Y (2002) Chloroplast transformation with modified *accD* operon increases acetyl-CoA carboxylase and causes extension of leaf longevity and increase in seed yield in tobacco. *Plant Cell Physiology*. 43: 1518–1525

Maliga P, Bock R (2011) Plastid biotechnology: food, fuel and medicine for the 21st century. *Plant Physiology*. 155(4): 1501-1510

McConn M, Browse J (1996) The Critical Requirement for Linolenic Acid is Pollen Development, not Photosynthesis, in *na Arabidopsis* Mutant. *The Plant Cell*. 8: 403-416

Mentzen WI, Peng JL, Ransom N, Nikolau BJ, Wurtele ES (2008). Articulation of three core metabolic processes in *Arabidopsis*: Fatty acid biosynthesis, leucine catabolism and starch metabolism. *BMC Plant Biology*. 8(76): 1-15

Moon BY, Higashi SI, Gombos Z, Murata N (1995) Unsaturation of the membrane lipids of chloroplasts stabilizes the photosynthetic machinery against low-temperature photoinhibition in transgenic tobacco plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92: 6219-6223

Moon H, Hazebroek J, Hildebrand DF (2000) Changes in fatty acid composition in plant tissues expressing a mammalian delta9 desaturase. *Lipids*. 35(5): 471-9

Mu J, Tan H, Zheng Q, Fu F, Liang Y, Zhang J, Yang X, Wang T, Chong K, Wang XJ, Zuo J (2008) LEAFY COTYLEDON1 is a key regulator of fatty acid biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiology*. **148**: 1042-1054

Murashige T, Skoog F (1962) A Revised Medium for Growth and Bio Assays with Tobacco Tissues Cultures. *Physiologia Plantarum*. **15**: 473-497

Nelson DL, Cox MM (2008) Lipids. *In: Lehninger: principles of biochemistry*. 5.ed. W. H. Freeman and Company, New York, USA.

Nunes-Nesi A, Carrari F, Gibon Y, Sulpice R, Lytovchenko A, Fisahn J, Graham J, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR (2007) Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *Plant Journal*. **50**: 1093-1106

Oey M, Lohse M, Kreikemeyer B, Bock R (2009) Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic. *Plant Journal*. **57**: 436–445

Pham AT, Lee JD, Shannon JG, Bilyeu KD (2010) Mutant alleles of *FAD2-1A* and *FAD2-1B* combine to produce soybeans with the high oleic acid seed oil trait. *BMC Plant Biology*. **10**:195

Piller LE, Abraham M, Dörmann P, Kessler F, Besagni C (2012) Plastid lipid droplets at the crossroads of prenylquinone metabolism. *Journal of Experimental Botany*. **63**(4): 1609-1618

Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*. **975**: 384-394

Quesada-Vargas T, Ruiz ON, Daniell H (2005) Characterization of heterologous multigene operons in transgenic chloroplasts. Transcription, processing, and translation. *Plant Physiology*. **138**: 1746–1762

Rogalski M, Carrer H (2011) Engineering plastid fatty acid biosynthesis to improve food quality and biofuel production in higher plants. *Plant Biotechnology Journal*. **9**: 54–564

Rogalski M, Ruf S, Bock R (2006) Tobacco plastid ribosomal protein S18 is essential for cell survival. *Nucleic Acids Research*. **34**: 4537-4545

Rogalski M, Karcher D, Bock R (2008a) Superwobbling facilitates translation with reduced tRNA sets. *Nature Structural & Molecular Biology*. **15**: 192-198

Rogalski M, Schoettler MA, Thiele W, Schulze WX, Bock R (2008b) Rpl33, a nonessential plastid encoded ribosomal protein in tobacco, is required under cold stress conditions. *Plant Cell*. **20**: 2221-2237

Routaboul JM, Skidmore C, Wallis JG, Browse J (2012) Arabidopsis mutants reveal that short- and long-term thermotolerance have different requirements for trienoic fatty acids. *Journal of Experimental Botany*. **63**(3): 1435-1443

Ruf S, Karcher D, Bock R (2007) Determining the transgene containment level provided by chloroplast transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **104**: 6998–7002

Ruhlman T, Verma D, Samson N, Daniell H (2010) The role of heterologous chloroplast sequence elements in transgene integration and expression. *Plant Physiology*. **152**: 2088–2104

Sakamoto T, Los DA, Higashi S, Wada H, Nishida I, Ohmori M, Murata N (1994a) Cloning of ω -3 desaturase from cyanobacteria and its use in altering the degree of membrane-lipid unsaturation. *Plant Molecular Biology*. **26**, 249-263.

Sakamoto T, Wada H, Nishida I, Ohmori M, Murata N (1994b) Delta 9 acyl-lipid desaturases of cyanobacteria. Molecular cloning and substrate specificities in terms of fatty acids, sn-positions, and polar head groups. *Journal of Biological Chemistry*. **269**: 25576-25580

Sakamoto T, Wada H, Nishida I, Ohmori M, Murata N. (1994c) Identification of conserved domains in the delta 12 desaturases of cyanobacteria. *Plant Molecular Biology*. **24**(4): 643-650

Sanjaya, Durrett TP, Weise SE, Benning C (2011) Increasing the energy density of vegetative tissues by diverting carbon from starch to oil biosynthesis in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Journal*. **9**: 874-883

Sargent JR (1997) Fish oils and human diet. *British Journal of Nutrition*. **78**: 5-13

Sasaki Y, Nagano Y (2004) Plant Acetyl-CoA Carboxylase: Structure, Biosynthesis, Regulation, and Gene Manipulation for Plant Breeding. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. **68**(6): 1175-1184

Schmid KM, Ohlrogge JB (2008) Lipid metabolism in plants. In: Vance, D. E., Vance, J. E. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. 5.ed. Elsevier

Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Schölkopf B, Weigel D, Lohmann JU (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics*. **37**(5): 501-506

Simopoulos AP (1999) Essential fatty acids in health and chronic disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **70**: 560-569

Staub JM, Maliga P (1994) Extrachromosomal elements in tobacco plastids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **91**(16): 7468-7472

Svab Z, Maliga P (1993) High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **90**: 913–917

Svab Z, Maliga P (2007) Exceptional transmission of plastids and mitochondria from the transplastomic pollen parent and its impact on transgene containment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **104**: 7003–7008

To A, Joubès J, Barthole G, Lécureuil A, Scagnelli A, Jasinski S, Lepiniec L, Baud S (2012) WRINKLED Transcription Factors Orchestrate Tissue-Specific Regulation of Fatty Acid Biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Cell*. **24**: 5007-5023

Vanhercke T, El Tahchy A, Liu Q, Zhou XR, Shrestha P, Divi UK, Ral JP, Mansour MP, Nichols PD, James CN, Horn PJ, Chapman KD, Beaudoin F, Ruiz-López N, Larkin PJ, de Feyter RC, Singh SP, Petrie JR (2014) Metabolic engineering of biomass for high energy density: oilseed-like triacylglycerol yields from plant leaves. *Plant Biotechnol Journal*. **12**(2): 231-239

Vanhercke T, Wood CC, Stymne S, Singh SP, Green AG (2013) Metabolic engineering of plant oils and waxes for use as industrial feedstocks. *Plant Biotechnology Journal*. **11**: 197-210

Visentainer JV, Franco MRB (2006) Quantificação de ácidos graxos utilizando padronização interna. *In: Ácidos graxos em óleos e gorduras: identificação e quantificação*. Editora Varela, São Paulo, Brasil

Wada H, Avelange-Macherel MH, Murata N (1993) The *desA* gene of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803 is the structural gene for delta 12 desaturase. *Journal of Bacteriology*. **175**(18): 6056-6058

Wasternack C (2007) Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany*. **100**: 681-697

Wasternack C, Hause B (2013) Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany*. **111**: 1021-1058

Weber H (2002) Fatty acid-derived signals in plants. *Trends in Plant Science*. **7**(5): 217-224

Wiebke J, Weigand A, Weissmann D, Glorius M, Moll H, Bernhard G, Dolg M (2010) Combined computational and experimental study of uranyl(VI) 1:2 complexation by aromatic acids. *Inorganic Chemistry*. **49**(14): 6428-635

Winichayakul S, Scott RW, Roldan M, Hatier JH, Livingston S, Cookson R, Curran AC, Roberts NJ (2013) In vivo packaging of triacylglycerols enhances *Arabidopsis* leaf biomass and energy density. *Plant Physiology*. **162**(2): 626-39

Wurbs D, Ruf S, Bock R (2007) Contained metabolic engineering in tomatoes by expression of carotenoid biosynthesis genes from the plastid genome. *Plant Journal*. **49**: 276–288

Zaborowska Z, Starzycki M, Femiak I, Swiderski M, Legocki AB (2002) Yellow lupine gene encoding stearyl-ACP desaturase – organization, expression and potential application. *Acta Biochimica Polonica*. **49**(1): 29-42

Zhang D, Pirtle IL, Park SJ, Nampaisansuk M, Neogi P, Wanjie SW, Pirtle RM, Chapman KD (2009) Identification and expression of a new delta-12 fatty acid desaturase (*FAD2-4*) gene in upland cotton and its functional expression in yeast and *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant Physiol Biochemistry*. **47**(6): 462-71

Zhou XR, Singh SP, Green AG (2013) Characterisation of the *FAD2* gene family from *Hiptage benghalensis*: a ricinoleic acid accumulating plant. *Phytochemistry*. **92**: 42-48

Zhou Z, Wang MJ, Zhao ST, Hu JJ, Lu MZ (2010) Changes in freezing tolerance in hybrid poplar caused by up- and down-regulation of *PtFAD2* gene expression. *Transgenic Res*. **19**(4): 647-654

ANEXOS

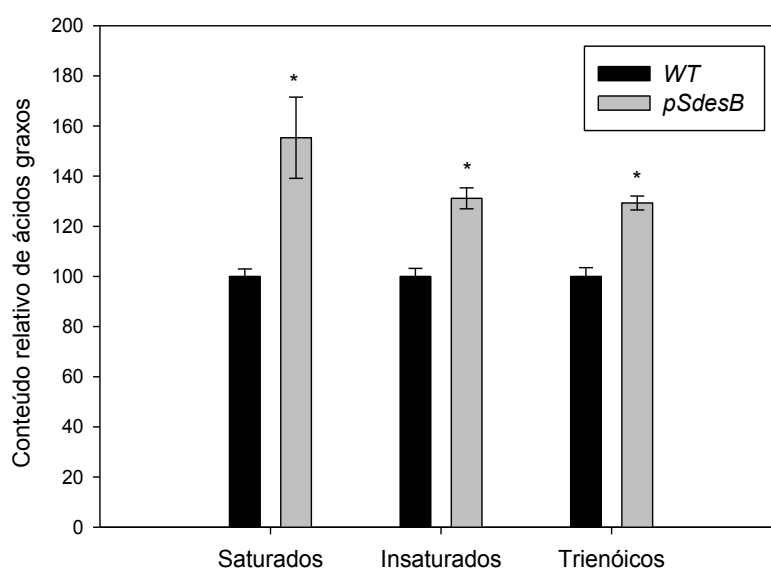


Figura suplementar 1: Conteúdo de ácidos graxos agrupados em saturados, insaturados e trienólicos de plantas pSdesB relativo ao conteúdo em plantas WT no estágio de 8 semanas. Os valores são apresentados como médias $\pm$ EP de 6 repetições; a diferença entre as médias foi significativa segundo teste *t Student's* ($P < 0,05$).

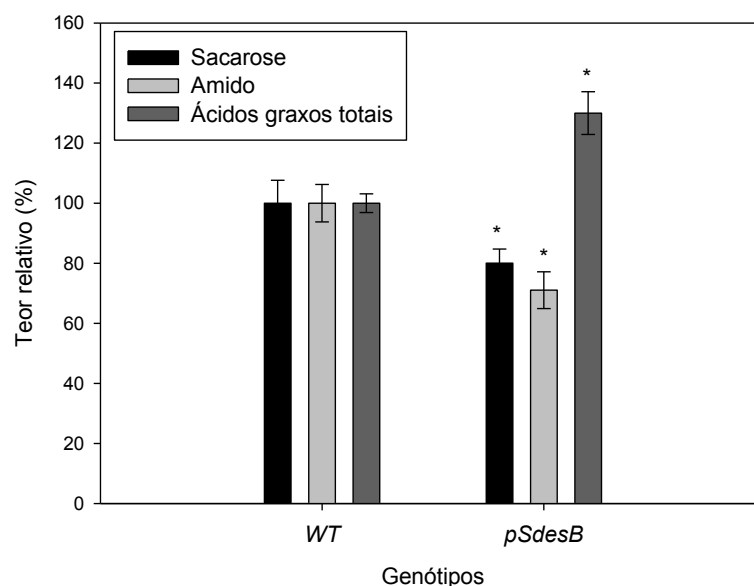


Figura suplementar 2: Teor relativo de sacarose, amido e ácidos graxos totais em plantas pSdesB e WT com 8 semanas. Os valores são apresentados como médias $\pm$ EP de 6 repetições; a diferença entre as médias foi significativa segundo teste *t Student's* ($P < 0,05$).