

WERNER CAMARGOS ANTUNES

**Alterações fisiológicas em plantas de batata com
metabolismo alterado de sacarose**

Tese 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
2005**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

A636a Antunes, Werner Camargos, 1981-
2005 Alterações fisiológicas em plantas de batata com
metabolismo alterado de sacarose / Werner Camargos
Antunes. – Viçosa : UFV, 2005.
viii, 73f. : il. ; 29cm.

Orientador: Marcelo Ehlers Loureiro.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Sacarose. 2. Fotossíntese. 3. Células - Metabolismo.
4. Batata. 5. Enzimas - Regulação. 6. Fisiologia vegetal.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 572.565

WERNER CAMARGOS ANTUNES

**Alterações fisiológicas em plantas de batata com metabolismo
alterado de sacarose**

Tese 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, em 02 de agosto de 2005

Sebastião Tavares de Rezende

Andréa Miyasaka de Almeida

Marco Aurélio Pedron e Silva

Elizabeth Pacheco Batista Fontes

Fábio Murilo DaMatta
(Presidente da Banca)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

A Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização deste curso, e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, Orlei Antunes Vieira e Zelita Camargos Antunes, que mesmo distantes, nunca deixaram de incentivar e dar aquele carinho que só os pais sabem dar na hora em que se mais precisa.

Aos meus irmãos, Roberto e Viviane, que sempre me incentivam para a superação desta árdua caminhada.

Ao amigo e orientador, Marcelo Ehlers Loureiro, por tudo o que me ensinou.

Ao grande amigo Adriano Nunes Nesi, que me incentivou nos estudos da Fisiologia Vegetal, desde os anos de iniciação científica.

Aos Professores Fábio DaMatta e Raimundo Barros que, na ausência do Professor Marcelo, comprometeram-se a me ajudar na execução deste trabalho.

Aos amigos Alan Carlos Costa e Fábio Gomes, pela ajuda nas medições de trocas gasosas.

Ao grande companheiro Roberto Lisboa Cunha, pela ajuda no laboratório.

Aos Professores avaliadores, pelas preciosas observações, que enriqueceram este trabalho.

A Maria Mercês, pela incondicional ajuda.

Aos vários outros amigos que me ajudaram a superar mais este desafio em minha vida.

BIOGRAFIA

Werner Camargos Antunes, filho de Orlei Antunes Vieira e Zelita Camargos Antunes, nasceu em Esmeraldas, Minas Gerais, em 15/05/1981. Iniciou o curso de graduação em Agronomia, em abril de 1999, na Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em janeiro de 2004. Em março de 2004, iniciou o curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal e, em agosto de 2005, finalizou os estudos aqui apresentados.

CONTEÚDO

RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VII
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3
3. CAPÍTULO I – PARÂMETROS BIOMÉTRICOS E TROCAS GASOSAS EM PLANTAS DE BATATA COM EXPRESSÃO ALTERADA DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DA SACAROSE. 08	
4. CAPÍTULO II – METABOLISMO DO CARBONO EM PLANTAS DE BATATA COM EXPRESSÃO ALTERADA DA SINTASE DA SACAROSE E DA INVERTASE	41
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	73

RESUMO

ANTUNES, Werner Camargos, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Agosto de 2005. **Alterações fisiológicas em plantas de batata com metabolismo alterado de sacarose**. Orientador: Marcelo Ehlers Loureiro. Conselheiros: Fábio Murilo DaMatta e Raimundo Santos Barros.

A importância relativa da sacarose na osmorregulação das células-guarda (CG) bem como o papel fisiológico da sintase da sacarose (SuSy) em folhas permanece pouco entendido. Neste trabalho, foram investigadas estas questões via análises dos efeitos da modulação da atividade sacarolítica em CG e, conjuntamente, com uma caracterização fenotípica dos efeitos da redução da expressão do gene da SuSy em plantas transgênicas. Análises de trocas gasosas e de parâmetros biométricos em plantas de batata (*Solanum tuberosum* L. Désirée) transgênicas antisense da isoforma SuSy 3, sob controle do promotor constitutivo CaMV 35S, e plantas com superexpressão do gene de invertase de levedura sob controle do promotor S1Δ4, específico de CG, foram investigadas. Por um lado, observou-se redução da condutância estomática (g_s) e uma ligeira redução na taxa da assimilação líquida de CO₂ (A) com a redução na atividade sacarolítica em CG (*i.e.*, plantas SuSy 3 antisense); o fenótipo oposto foi observado nas plantas transgênicas com aumento da atividade sacarolítica especificamente em CG (*i.e.*, plantas com superexpressão da invertase). Os aumentos em A nas plantas com superexpressão da invertase pôde ser explicado como resultante de menores limitações estomáticas à fotossíntese, em relação aos das plantas-controle. Entretanto, as mudanças em A não foram relacionadas com alterações nas taxas máximas de assimilação do CO₂ derivadas de curvas A/C_i daqueles genótipos. A redução moderada em A nas plantas SuSy 3 antisense foi acompanhada por incrementos na área foliar e massa seca da parte aérea, o quê, provavelmente, poderia estar relacionada com a redução na densidade dos tubérculos. Ainda, plantas SuSy 3 antisense apresentaram aumentos na atividade da sintase da sacarose-fosfato (SPS) e pirofosforilase da ADP-glicose

(AGPase), e um decréscimo na atividade da SuSy e invertases ácidas, refletindo em aumentos nos teores de sacarose e amido nas folhas. Os aumentos nas atividades da SPS e da AGPase podem estar ligados à redução no teores de ortofosfato inorgânico. Não foram observadas mudanças significativas na composição da parede celular do limbo foliar. Por outro lado, nas plantas com superexpressão da invertase, nenhuma das mudanças nas atividades enzimáticas e nos níveis de açúcares analisados foi observada. Ressalta-se um incremento nos teores do ácido 3-fosfoglicérico e hexoses-P. Analisando-se em conjunto, estes resultados suportam a hipótese de que mudanças em g_s foram principalmente devido a mudanças no metabolismo de sacarose, exclusivamente em CG. Não se obteve evidências, neste trabalho, de que a SuSy 3 possa estar envolvida significativamente na síntese de parede celular nas folhas.

ABSTRACT

ANTUNES, Werner Camargos, M.S., Universidade Federal de Viçosa, August 2005. **Physiological changes in potato plants with altered sucrose metabolism.** Adviser: Marcelo Ehlers Loureiro. Committee members: Fábio Murilo DaMatta and Raimundo Santos Barros.

The relative importance of sucrose in guard-cell (GC) osmoregulation as well as the physiological role of sucrose synthase (SuSy) in leaves is still not understood. In this work, these questions were addressed by analyzing the effects of modulation of sucrolitic activities in GC, in addition to phenotypically characterizing the effects of its gene expression downregulation in transgenic plants. Detailed analysis of gas exchange and growth parameters of antisense potato plant (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée) for isoform 3 of SuSy (SuSy 3), under the control of 35S promoter, and sense potato plants expressing yeast invertase under the control of the S1Δ4, GC-specific promoter, were performed. Stomatal conductance (g_s) decreased to a greater extent than the net CO₂ assimilation rate (A) in transgenic plants with reduction in sucrolitic activity in GC (*i.e.*, SuSy 3 antisense plants); an opposite phenotype was found in transgenic plants with increased sucrolitic activity exclusively in GC (*i.e.*, sense invertase plants). The increase in A in sense invertase plants could be explained as a result of smaller stomatal restrictions to photosynthesis than in control plants. However, changes in A were not followed by changes in maximal net carbon assimilation rates, as obtained from A/C_i curves. The moderate decrease in A in SuSy 3 antisense plants was accompanied by an increase in leaf both area and dry weight of leaves and stem, which probably could be linked to a reduction in total tuber density. Leaves from SuSy 3 antisense plants showed increases in sucrose-phosphate synthase (SPS) and ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase), and decreases in SuSy and acid invertases activities. The enzymatic changes led to increases in leaf sucrose and starch levels. The increase in SPS and AGPase activities could be linked to a reduction in inorganic orthophosphate content. There were no significant changes in both cellulose levels and cell-wall composition. None of these

changes in plants expressing yeast invertase were found, but a significant increase in phosphoglyceric acid and hexoses-P contents was observed. Taken together, these results support the hypothesis that changes in g_s is due mainly to changes in sucrose metabolism exclusively in GC; also, no evidence for an important role of SuSy 3 isoform in cell-wall synthesis in leaves could be herein found.

1 INTRODUÇÃO GERAL

A batata é uma planta olerácea muito importante no Brasil e em diversos países do mundo. A espécie *Solanum tuberosum* L., a mais cultivada, tem como centro de origem os Andes peruanos. Lá, já era cultivada pelos incas há milhares de anos. Foi distribuída pelo mundo por meio dos espanhóis, quando colonizaram aquela região, em meados do século XVI. Essa cultura foi levada para diversas regiões tropicais e subtropicais do planeta, tornando-se a base alimentar de muitos povos, em especial dos europeus. Atualmente, é considerada a quarta fonte alimentar da humanidade, logo após o arroz, o trigo e o milho.

O tubérculo de batata é excelente como modelo de estudo da regulação e da atividade da força-dreno. Estudos voltados para o entendimento da regulação da força-dreno e acúmulo de amido nos tubérculos são fartos na literatura (Stitt, 1993; Sonnewald *et al.*, 1997; Sweetlove *et al.*, 1998; Trethewey *et al.*, 1998; 1999; Hajirezaei *et al.*, 2000; Rung *et al.*, 2004), embora o processo detalhado da regulação permaneça, ainda, para ser elucidado.

Vários estudos apontam para a sintase da sacarose (SuSy) como elemento-chave na regulação do processo de acúmulo de amido nos tubérculos (Yelle *et al.*, 1988; Zrenner *et al.*, 1995). A SuSy catalisa a conversão reversível *in vivo* da sacarose e UDP em frutose e UDP-glicose (Geigenberger & Stitt, 1993). A atividade da SuSy é elevada em órgãos em crescimento (Sun *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1993) e decresce, à medida que o órgão envelhece e se torna "maduro" (Pressey, 1969). Além disso, existem diversas isoformas da SuSy que, supostamente, estão envolvidas em processos bioquímicos distintos.

O papel crucial da SuSy na degradação da sacarose tem sido fundamentado na correlação existente entre a indução do acúmulo de amido em tecidos-dreno e a atividade e expressão gênica da SuSy em várias espécies de plantas (batata: Sung *et al.*, 1989; Zrenner *et al.*, 1995; cenoura: Sturm *et al.*, 1996; ervilha: Déjardin *et al.*, 1997; milho: Singletary *et al.*, 1997; tomate: Sun *et al.*, 1992; trigo: Keeling *et al.*, 1993; Riffllin *et al.*, 1995). A atividade da SuSy também retorna aos níveis basais ao final do período de acumulação de amido em tecidos como tubérculo de batata (Ross & Daveis, 1991; Visser *et al.*, 1994; Applendoorn *et al.*, 1997). Contudo, nenhuma correlação entre acumulação de açúcares de reserva e atividade da SuSy foi

encontrada em cana-de-açúcar (Zhu *et al.*, 1997; Rohwer & Botha, 2001) e sorgo sacarino (Hoffmann-Thoma *et al.*, 1996).

Existem estudos apontando a SuSy como fornecedora de precursores de calose e celulose (Amor *et al.*, 1995; Ruan & Chourey, 1998; Haigler *et al.*, 2001; Salnikov *et al.*, 2001), no suprimento de energia para as células companheiras envolvidas no carregamento (Yang & Russel, 1990; Hänggi & Fleming, 2001) e descarregamento (Wachter *et al.*, 2003) do floema, na biossíntese de amido (Zrenner *et al.*, 1995) e em um possível ciclo fútil da sacarose (Nguyen-Quoc & Foyer, 2001).

A conversão reversível da sacarose e UDP em frutose e UDP-glicose é considerada uma rota de degradação da sacarose energeticamente mais favorável à degradação pelas invertases. A UDP-glicose formada pode ser convertida a glicose-1-fosfato pela pirofosforilase da UDP-glicose, com formação de UTP às expensas energéticas de um pirofosfato (PPi). O UTP pode ser convertido a ATP pela cinase do nucleotídeo difosfato e, então, usado para a fosforilação da frutose, sendo, dessa forma, a sacarose convertida em hexoses fosforiladas a partir de uso de apenas um PPi, sendo este considerado por alguns autores como "lixo" metabólico da biossíntese de proteínas (Plaxton, 1996). Ressalta-se, no entanto, que o PPi possui importante papel fisiológico na regulação de uma série de reações em plantas (Plaxton, 1996; Farré *et al.*, 2000; Dennis & Blakeley, 2001).

Em batata, têm-se três isoformas da SuSy que são codificadas por diferentes genes e possivelmente reguladas distintamente. Algumas das isoformas têm sua expressão aumentada em condições de estresse. Sob hipoxia, apenas uma quantidade limitada de ATP é produzida, em função da inibição da fosforilação oxidativa (Sachs *et al.*, 1996); nessa condição a SuSy parece estar envolvida de forma a elevar a atividade sacarolítica para compensar a redução na produção de energia (Bologa *et al.*, 2003). De fato, tem-se observado uma indução da expressão de genes SuSy em várias espécies de plantas sob hipoxia (Arabidopsis: Martin *et al.*, 1993; batata: Salanoubat & Belliard, 1989; beterraba açucareira: Hesse & Willmitzer, 1996; milho: Yang & Russel, 1990; Chourey *et al.*, 1991; Ricard *et al.*, 1991; Koch *et al.*, 1992; Bouny & Saglio, 1996; Sachs *et al.*, 1996; trigo: Marana *et al.*, 1990). Porém, essa indução não ocorre em todos os órgãos, e também não é característica de todas as isoformas (Springer *et al.*, 1986; Marana *et al.*, 1990).

Sob estresse salino, a atividade da SuSy é aumentada, o que ocorre em paralelo a um acúmulo de sacarose e hexoses em raízes de tomate (Balibrea *et al.*, 1996), que, por sua vez, poderia ter um papel na redução da desidratação celular

naquela condição. Em folhas de batata e em condições de seca, apenas a isoforma 3 da SuSy tem a sua expressão aumentada (Loureiro, 1999). A isoforma 3 da SuSy corresponde a até 70% da atividade total da SuSy em folhas expandidas de batata (Meyer, 2003). Além disso, a SuSy apresenta altos níveis de atividade em células-guarda (CG) quando comparada aos demais tipos celulares encontrados na folha (Hite *et al.*, 1993). Não obstante, sob seca, o aumento na expressão do gene SS3 não é proporcional em células mesofílicas e estomáticas, sendo fortemente aumentada em CG (Kopka *et al.*, 1997). Isso sugere que a maior atividade da SuSy em células-guarda seja devido especificamente à isoforma SuSy 3, embora a relevância fisiológica dessas diferenças de atividade e na expressão não tenham ainda sido esclarecidas.

A despeito dos inúmeros papéis propostos para a SuSy, as funções das diferentes isoformas em plantas são, ainda, sujeitas a incertezas e debates, possivelmente atribuídas à sua plasticidade funcional. A descoberta de funções específicas para diferentes isoformas da SuSy é fundamental para a manipulação dessa enzima, objetivando-se alterar, em nível molecular, o controle das diferentes funções que a SuSy possa exercer. Além disso, nenhuma isoforma em particular tem sido associada a uma função fisiológica específica, embora a SuSy tenha função de destaque em rotas bioquímicas diversas e fundamentais para uma célula vegetal. A carência de estudos do papel fisiológico da SuSy em órgãos-fonte é ainda mais acentuada, não se dispondo, até o momento, de trabalhos envolvendo a sua caracterização e sua possível função em folhas expandidas.

Neste trabalho, procurou-se melhor caracterizar os efeitos fisiológicos da redução na expressão da isoforma 3 da SuSy, que é preferencialmente expressa em órgãos-fonte.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amor Y, Haigler CH, Johnson S, Wainscott M, Delmer DP (1995) A membrane-associated form of SuSy and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:9353–9357

Appeldoorn NJG, DeBruijn SM, Koot-Gronsveld EAM, Visser RGF, Vreugdenhil D, Plas VD (1997) Developmental changes of enzymes involved in conversion of sucrose to hexose-phosphate during early tuberisation of potato. *Planta* **202**:220-226

- Balibrea ME, Cruz AMS, Bolarin MC, Perez-Alfocea F** (1996) Sucrolytic activities in relation to sink strength and carbohydrate composition in tomato fruit growing under salinity. *Plant Sci* **118**:47-55
- Bologa KL, Fernie AR, Leisse A, Loureiro ME, Geigengerger P** (2003) A bypass of sucrose synthase leads to low internal oxygen and impaired metabolic performance in growing potato tubers. *Plant Physiol* **132**:2058-2072
- Bouny M, Saglio P** (1996) Glycolytic flux and hexokinase activities in anoxic maize root tips acclimated by hypoxic pretreatment. *Plant Physiol* **111**:187-194
- Chourey P, Chen Y, Miller M** (1991) Early cell degeneration in developing endosperm is unique to the shrunken1 mutation in maize. *Maydica* **36**:141-146
- Déjardin A, Rochat C, Maugenest S, Boutin J-P** (1997) Purification, characterization and physiological role of sucrose synthase in the pea seed coat (*Pisum sativum* L.). *Planta* **201**:128-137
- Dennis DT, Blakeley SD** (2001) Carbohydrate metabolism. In BB Buchanan, W Gruissem, RL Jones (eds). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville. pp.630-675
- Farré EM, Geigenberger P, Willmitzer L, Trethewey RN** (2000) A possible role for pyrophosphate in the coordination of cytosolic and plastidial carbon metabolism within the potato tuber. *Plant Physiol* **123**:681-688
- Geigenberger P, Stitt M** (1993) Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction in vivo in developing potato tubers and other plant tissues. *Planta* **190**:440-450
- Haigler C, Ivanova-Datcheva M, Hogan P, Salnikov V, Hwang S, Martin K, Delmer D** (2001) Carbon partitioning to cellulose synthesis. *Plant Mol Biol* **47**:29-51
- Hajirezaei MR, Takahata Y, Trethewey RN, Willmitzer L, Sonnewald U** (2000) Impact of elevated cytosolic and apoplastic invertase activity on carbon metabolism during tuber development. *J Exp Bot* **51**:439-445
- Hänggi E, Fleming AJ** (2001) Sucrose synthase expression pattern in young maize leaves: implications for phloem transport. *Planta* **214**:326-329
- Hesse H, Willmitzer L** (1996) Expression analysis of a sucrose synthase gene from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Mol Biol* **30**:863-872
- Hoffmann-Thoma G, Hinkel K, Nicolay P, Willenbrink J** (1996) Sucrose accumulation in sweet sorghum stem internodes in relation to growth. *Physiol Plant* **97**:277-284
- Hite DRC, Outlaw WH Jr, Tarczynski MC** (1993) Elevated levels of both sucrose-phosphate synthase and sucrose synthase in *Vicia faba* guard cells indicate cell-specific carbohydrate interconversions. *Plant Physiol* **101**:1217-1221
- Keeling PL, Bacon PJ, Holt DC** (1993) Elevated temperature reduces starch deposition in wheat endosperm by reducing the activity of soluble starch synthase. *Planta* **191**:342-348

- Koch K, Nolte K, Duke E, MCarthy D, Avigne W** (1992) Sugar levels modulate differential expression of maize sucrose synthase genes. *Plant Cell* **4**:59-69
- Kopka J, Provart NJ, Müller-Röber B** (1997) Potato guard cells respond to drying soil by a complex change in the expression of genes related to carbon metabolism and turgor regulation. *Plant J* **11**:871-82
- Loureiro ME** (1999) *The role of SNF1 and sucrose synthase in metabolism of potato tubers*. PhD Thesis. Freie Universität Berlin. 172p
- Marana C, Garcia-Olmedo F, Carbonero P** (1990) Differential expression of two types of sucrose synthase-encoding genes in wheat in response to anaerobiosis, cold shock and light. *Gene* **88**:167-172
- Martin T, Frommer WB, Salanoubat M, Willmitzer L** (1993) Expression of an *Arabidopsis* sucrose synthase gene indicates a role in metabolization of sucrose both during phloem loading in sink organs. *Plant J* **4**:367-77
- Meyer LE** (2003) *Papel fisiológico de uma isoenzima de sintase de sacarose em folhas de batata*. Tese MS. Universidade Federal de Viçosa. 48p
- Nguyen-Quoc B, Foyer CH** (2001) A role for "futile cycles" involving invertase and sucrose synthase in sucrose metabolism of tomato fruit. *J Exp Bot* **52**:881-889
- Plaxton WC** (1996) The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**:185-214
- Pressey R** (1969) Potato sucrose synthase: Purification and changes in activity associated with maturation. *Plant Physiol* **44**:759-764
- Ricard B, Rivoal J, Spiteri A, Pradet A** (1991) Anaerobic stress induces the transcription and translation of sucrose synthase in rice. *Plant Physiol* **95**:669-674
- Rifflin HL, Duffus CM, Bridges IC** (1995) Sucrose metabolism during endosperm development in wheat (*Triticum aestivum*). *Physiol Plant* **93**:123-131
- Rohwer JM, Botha FC** (2001) Analysis of sucrose accumulation in the sugar cane culm on the basis of *in vitro* kinetic data. *Biochem J* **358**:437-445
- Ross H, Davies HV** (1991) Sucrose metabolism in tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Physiol* **98**:287-293
- Ruan YL, Chourey PS** (1998) A fiberless seed mutation in cotton is associated with lack of fiber cell initiation in ovule epidermis and alterations in sucrose synthase expression and carbon partitioning in developing seeds. *Plant Physiol* **118**:399-406
- Rung JH, Draborg HH, Jorgensen K, Nielsen TH** (2004) Carbon partitioning in leaves and tubers of transgenic potato plants with reduced activity of fructose-6-phosphate,2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Physiol Plant* **121**:204-214
- Sachs MM, Subbaiah CC, Saab IN** (1996) Anaerobic gene expression and flooding tolerance in maize. *J Exp Bot* **47**:1-15

- Salanoubat M, Belliard G** (1989) The steady-state level of potato sucrose synthase mRNA is dependent on wounding, anaerobiosis and sucrose concentration. *Gene* **84**:181-185
- Salnikov VV, Grimson MJ, Delmer DP, Haigler CH** (2001) Sucrose synthase localizes to cellulose synthesis sites in tracheary elements. *Phytochemistry* **57**:823-833
- Singletary G, Banisadr R, Keeling P** (1997) Influence of gene dosage on carbohydrate synthesis and enzymatic activities in endosperm of starch-deficient mutants of maize. *Plant Physiol* **113**:293-304
- Springer B, Werr W, Starlinger P, Bennett DC, Zokolica M, Freeling M** (1986) The *Shrunken* gene on chromosome 9 of *Zea mays* L. is expressed in various plant tissues and encodes an anaerobic protein. *Mol Gen Genet* **205**:461-8
- Sonnewald U, Hajirezaei M, Kossmann J, Heyer A, Trethewey RN, Willmitzer L** (1997) Increased potato tuber size resulting from apoplastic expression of yeast invertase. *Nature BioTech* **15**:794-797
- Stitt M** (1993) Sink strength – integrated systems need integrating approaches. *Plant Cell Environ* **16**:1041-1043
- Sun J, Loboda T, Sung S-JS, Black CCJ** (1992) Sucrose synthase in wild tomato, *Lycopersicon chmielewskii*, and tomato fruit sink strength. *Plant Physiol* **98**:1163-1169
- Sung SJS, Xu DP, Black CC** (1989) Identification of actively filling sucrose sinks. *Plant Physiol* **89**:1117-1121
- Sturm A** (1996) Molecular characterization and functional analysis of sucrose-cleaving enzymes in carrot (*Daucus Carota* L.). *J Exp Bot* **47**:1187-1192
- Sweetlove LJ, Kossmann J, Riesmeier JW, Trethewey RN, Hill SA** (1998) The control of source to sink carbon flux during tuber development in potato. *Plant J* **15**:697-706
- Trethewey RN, Geigenberger P, Henning A, Fleischer-Notter H, Müller-Röber B, Willmitzer L** (1999) Induction of the activity of glycolytic enzymes correlates with enhanced hydrolysis of sucrose in cytosol of transgenic potato tubers. *Plant Cell Environ* **22**:71-79
- Trethewey RN, Geigenberger P, Riedel K, Hajirezaei MR, Sonnewald U, Stitt M, Riesmeier JW, Willmitzer L** (1998) Combined expression of glucokinase and invertase in potato tubers leads to dramatic reduction in starch accumulation and a stimulation of glycolysis. *Plant J* **15**: 109-118
- Visser R, Vreugdenhil D, Hendriks T, Jacobsen E** (1994) Gene expression and carbohydrate content during stolon to tuber transition in potatoes (*Solanum tuberosum*). *Physiol Plant* **90**:285-292
- Wachter R, Langhans M, Aloni R, Gotz S, Weilmunster A, Koops A, Temguia L, Mistrik I, Pavlovkin J, Rascher U, Schwalm K, Koch KE, Ullrich CI** (2003)

Vascularization, high-volume solution flow, and localized roles for enzymes of sucrose metabolism during tumorigenesis by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol* **133**:1024-1037

Yang N-S, Russel D (1990) Maize sucrose synthase-1 promoter directs phloem cell-specific expression of Gus gene in transgenic tobacco plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:4144-4148

Yelle S, Hewitt JD, Robinson NL, Damon S, Bennet AB (1988) Sink metabolism in tomato fruit. III. Analysis of carbohydrate assimilation in wild species. *Plant Physiol* **87**:737-740

Wang F, Sanz A, Brenner ML, Smith A (1993) Sucrose synthase, starch accumulation and tomato fruit sink strength. *Plant Physiol* **101**:321-327

Zhu YJ, Komor E, Moore PH (1997) Sucrose accumulation in the sugarcane stem is regulated by the difference between the activities of soluble acid invertase and sucrose phosphate synthase. *Plant Physiol* **115**:609-616

Zrenner R, Salanoubat M, Willmitzer L, Sonnewald U (1995) Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J* **7**:97-107

3 CAPÍTULO I

Parâmetros biométricos e trocas gasosas em plantas de batata com expressão alterada de enzimas envolvidas na degradação da sacarose

CONTEÚDO

1	RESUMO	10
2	ABSTRACT	11
3	INTRODUÇÃO	12
4	MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1	Material vegetal	14
4.2	Condições de cultivo	15
4.3	Experimentos.....	15
4.3.1	Delineamento experimental.....	15
4.3.2	Trocas gasosas e parâmetros biométricos.....	16
4.3.2.1	Curso diário das trocas gasosas	16
4.3.2.2	Respostas da fotossíntese à irradiância.....	16
4.3.2.3	Respostas da fotossíntese ao CO ₂	16
4.3.2.4	Parâmetros biométricos.....	16
4.3.3	Avaliações enzimáticas	16
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
5.1	Trocas gasosas nas plantas SS3 antisenso.....	18
5.2	Trocas gasosas nas plantas com superexpressão da invertase em células-guarda	23
5.3	Regulação fotossintética pela força-dreno	26
5.4	Parâmetros biométricos.....	28
6	CONCLUSÕES	30
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
8	ANEXO	32
8.1	Plantas SS3 antisenso com 25 dias de idade	32
8.2	Plantas SS3 antisenso com 35 dias de idade	36
8.3	Plantas SS3 antisenso com 55 dias de idade	36
8.4	Curva de respostas fotossintéticas à luz.....	40

PARÂMETROS BIOMÉTRICOS E TROCAS GASOSAS EM PLANTAS DE BATATA COM EXPRESSÃO ALTERADA DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DA SACAROSE

Palavras-chave: Condutância estomática, fotossíntese, invertase, sintase da sacarose

1 RESUMO

A importância relativa da sacarose na osmorregulação das células-guarda (CG) bem como o papel fisiológico da sintase da sacarose (SuSy) em folhas permanece pouco entendido. Neste trabalho, foram investigadas estas questões via análises dos efeitos da modulação da atividade sacarolítica nas CG e, conjuntamente, com uma caracterização fenotípica dos efeitos da redução da expressão do gene da SuSy em plantas transgênicas. Análises de trocas gasosas e de parâmetros biométricos em plantas de batata (*Solanum tuberosum* L. Désirée) transgênicas antisense da isoforma SuSy 3, sob controle do promotor constitutivo CaMV 35S, e plantas com superexpressão do gene de invertase de levedura sob controle do promotor S1Δ4, específico de CG, foram investigadas. Por um lado, observou-se redução da condutância estomática (g_s) e uma ligeira redução na taxa da assimilação líquida de CO₂ (A) com a redução na atividade sacarolítica em CG (*i.e.*, plantas SuSy 3 antisense); o fenótipo oposto foi observado nas plantas transgênicas com aumento da atividade sacarolítica especificamente em CG (*i.e.*, plantas com superexpressão da invertase). Os aumentos em A nas plantas com superexpressão da invertase pôde ser explicado como resultante de menores limitações estomáticas à fotossíntese, em relação aos das plantas-controle. Entretanto, as mudanças em A não foram relacionadas com alterações nas taxas máximas de assimilação do CO₂ derivadas de curvas A/C_i daqueles genótipos. A redução moderada em A nas plantas SuSy 3 antisense foi acompanhada por incrementos na área foliar e massa seca da parte aérea, o quê, provavelmente, poderia estar relacionada com a redução na densidade dos tubérculos. Estes resultados sugerem que os níveis normais da atividade sacarolítica promovida pelas atividades da SuSy 3 e invertase têm contribuição essencial para manutenção da turgescência e osmoregulação em CG.

BIOMETRICAL ANALYSIS AND GAS EXCHANGE IN POTATO PLANTS WITH ALTERED EXPRESSION OF THE SUCROSE-CLEAVING ENZYMES

Key words: Invertase, photosynthesis, stomatal conductance, sucrose synthase

2 ABSTRACT

The relative importance of sucrose in guard-cell (GC) osmoregulation as well as the physiological role of sucrose synthase (SuSy) in leaves is still not understood. In this work, these questions were addressed by analyzing the effects of modulation of sucrolitic activities in GC, in addition to phenotypically characterizing the effects of its gene expression downregulation in transgenic plants. Detailed analysis of gas exchange and growth parameters of antisense potato plant (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée) for isoform 3 of SuSy (SuSy 3), under the control of 35S promoter, and sense potato plants expressing yeast invertase under the control of the S1Δ4, GC-specific promoter, were performed. Stomatal conductance (g_s) decreased to a greater extent than the net CO₂ assimilation rate (A) in transgenic plants with reduction in sucrolitic activity in GC (*i.e.*, SuSy 3 antisense plants); an opposite phenotype was found in transgenic plants with increased sucrolitic activity exclusively in GC (*i.e.*, sense invertase plants). The increase in A in sense invertase plants could be explained as a result of smaller stomatal restrictions to photosynthesis than in control plants. However, changes in A were not followed by changes in maximal net carbon assimilation rates, as obtained from A/C_i curves. The moderate decrease in A in SuSy 3 antisense plants was accompanied by an increase in leaf both area and dry weight of leaves and stem, which probably could be linked to a reduction in total tuber density. These results suggest that normal levels of sucrose degradation, as related to SuSy 3 and invertase activities in guard-cells, might have contributed significantly to guard-cell turgor and osmoregulation.

3 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de variedades de plantas cultivadas com menor demanda por água e com maior tolerância à seca são, segundo a FAO (Subdivisão da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura), as principais estratégias para assegurar uma produção que atenda à necessidade crescente de alimentos, causada pelo crescimento atual da população mundial. Essas estratégias são particularmente importantes para as condições climáticas brasileiras, em que as precipitações pluviais são irregulares ou insuficientes, de forma que o cultivo agrícola está quase sempre associado a condições de deficiência hídrica. Uma das respostas mais importantes das plantas às variações da disponibilidade hídrica do solo é a redução da abertura estomática, alterando, assim, a perda de água das folhas.

A abertura estomática é determinada pela turgescência das células-guarda (CG). Quando o volume da CG aumenta, em resposta a um movimento de íons e metabólitos, com a conseqüente entrada de água para a célula, a abertura do poro estomático aumenta (Talbot & Zeiger, 1996). As CG controlam as trocas gasosas da planta, principalmente vapor de água e CO₂, entre o interior da folha e a atmosfera. A hipótese predominante que explica a alteração de volume envolve o aumento na concentração dos íons K⁺, e seus contra-íons malato²⁻ e Cl⁻ no vacúolo daquelas células. Outra hipótese, defendida por poucos grupos de pesquisadores, pressupõe que a sacarose também desempenhe um papel importante na manutenção e aumento da turgescência das CG (Talbot & Zeiger 1998; Outlaw Jr & Vlieghere-He 2001).

Várias informações têm confirmado que a sacarose desempenha um papel osmorregulatório importante em CG de folhas intactas (Talbot & Zeiger, 1996, 1998; Lu *et al.*, 1997). Esses estudos mostram que os teores de sacarose nas CG aumentam lentamente no início da manhã, e rapidamente a partir do final da manhã. O nível de K⁺, por sua vez, alcança maiores valores nas CG em torno do meio-dia, diminuindo ao final da tarde, quando, então, a sacarose torna-se o osmólito dominante (Talbot & Zeiger, 1996, 1998). A importância relativa dos solutos envolvidos na osmorregulação das CG tem sido tema de muitos debates, havendo ainda grandes controvérsias quanto à validade da quantificação do K⁺ nessas células. Como a importância da sacarose no mecanismo de osmorregulação das CG baseia-se, fundamentalmente, na redução observada na concentração de K⁺, a importância relativa da sacarose ainda não está suficientemente fundamentada (Talbot & Zeiger, 1996; Outlaw Jr & Zhang, 2001).

Algumas interpretações de dados experimentais têm sugerido que as alterações nos teores de sacarose nas CG são originadas de alterações no transporte de sacarose, do apoplasto para o simplasto dessas células, considerando-se que: (a) a baixa capacidade fotossintética das CG (Gotow *et al.*, 1988; Poffenroth *et al.*, 1992) não poderia suprir os esqueletos carbonados necessários à síntese dos íons malato e da sacarose encontrada nessas células (Outlaw Jr, 1989; Tarczynski *et al.*, 1989; Lu *et al.*, 1997); (b) as CG têm muito pouco amido ou mesmo não o contêm, ou, alternativamente, a degradação de amido nas CG contribuiria de forma pouco significativa para a síntese de sacarose (Tallmann & Zeiger, 1988; Talbott & Zeiger, 1993); (c) ocorreria importação significativa de sacarose via transportador de sacarose-H⁺ (Lu *et al.*, 1997; Ritte *et al.*, 1999).

Recentemente, foi observado que a taxa transpiratória altera o transporte de sacarose nas CG e, em conseqüência, influencia os movimentos estomáticos (Outlaw Jr & Vlieghere-He, 2001). Esse estudo registrou que ocorre um aumento do conteúdo de sacarose no simplasto das CG, quando as plantas são transferidas de uma condição de baixa umidade relativa do ar (UR; 60%) para uma alta UR (90%); essa alteração mostrou-se associada a um aumento do volume do simplasto e conseqüente aumento da abertura estomática. Essas mudanças na turgescência, em razão da entrada de sacarose, são rápidas, mostrando que as CG possuem alta atividade do transportador-simporte da sacarose (Lu *et al.*, 1997). Entretanto, falta ainda uma prova direta para suportar uma relação causal entre o aumento do teor da sacarose e a abertura estomática. Uma possível interpretação alternativa para esses resultados poderia ser a redução no transporte de ácido abscísico (ABA) decorrente do aumento da UR, visto que o ABA e a sacarose seguem a mesma rota de acumulação no apoplasto da CG (Zhang & Outlaw Jr 2001a,b).

Nas CG, foi relatado que ocorre um aumento nos teores de sacarose durante a abertura estomática (Lu *et al.*, 1995, 1997; Talbott & Zeiger, 1997; Ritte *et al.*, 1999; Outlaw Jr & Vlieghere-He, 2001), bem como uma maior atividade da SuSy quando comparada com a das células mesofílicas (Hite *et al.*, 1993); em adição, os níveis de seus transcritos aumentam marcadamente sob estresse hídrico somente naquelas células (Kopka *et al.*, 1997). No entanto, a significância fisiológica dessa diferença ainda não foi elucidada. Diversas plantas possuem diversas isoformas de SuSy e os papéis dessas diferentes isoformas não foram ainda elucidados, possivelmente devido à sua plasticidade funcional. A batata possui 3 isoformas de SuSy (SS1, SS2 e SS3) e

a isoforma 3 é mais expressa e ativa em folhas expandidas (Meyer, 2003) e, também, em CG (M.E. Loureiro, resultados não publicados).

A interpretação dos resultados sobre a distribuição das isoformas de SuSy na planta fundamenta a hipótese aqui proposta: a SuSy possui uma função importante nos movimentos estomáticos e sua manipulação em plantas transgênicas poderia levar à obtenção de plantas com maior eficiência no uso de água. Seguindo-se esta hipótese, alguns resultados preliminares envolvendo a caracterização do efeito da redução da atividade da isoforma 3 da SuSy (antisense 35S-SuSy 3; Loureiro, 1999) demonstraram que ocorre menor condutância estomática (g_s), acompanhada por leve redução na taxa de assimilação líquida de carbono (A) nas plantas SuSy 3, e um aumento de g_s com maior A nas plantas JE INV (plantas com superexpressão de invertase, no estômato). Esses experimentos reforçam a hipótese de que a redução da atividade sacarolítica levaria a uma redução de g_s , e o aumento daquela atividade, a um incremento em g_s . Este trabalho pretendeu, pois avaliar a manipulação da fisiologia estomática e explorar a importância do metabolismo da sacarose nas células estomáticas sobre as trocas gasosas de plantas de batata.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Foram utilizadas plantas de batata (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée) transgênicas com superexpressão da invertase de levedura das linhagens JE INV 4 e JE INV 72, sob controle do promotor S1Δ4 (Fig. 1) [fragmento de 0,3 kb da região 5'-proximal do promotor da sub-unidade maior da pirofosforilase da ADP-glicose (AGPase), denominado S1Δ4], específico de CG (Müller-Röber *et al.*, 1994). As linhagens nas quais foram avaliados os diversos parâmetros em relação ao metabolismo foliar e fisiologia de CG foram cedidas pelo Prof. Nicholas J. Provar (Universidade de Toronto, Canadá). Também foram analisadas plantas transgênicas de batata das linhagens SS3 10, SS3 30, SS3 54 e SS3 57 (linhagens antisense para a isoforma 3 da SuSy), previamente transformadas por Loureiro (1999), sob controle do promotor constitutivo CaMV 35S (Fig. 2). Como controle dos experimentos foram usadas plantas de batata não-transformadas (WT) da mesma cultivar (Désirée).

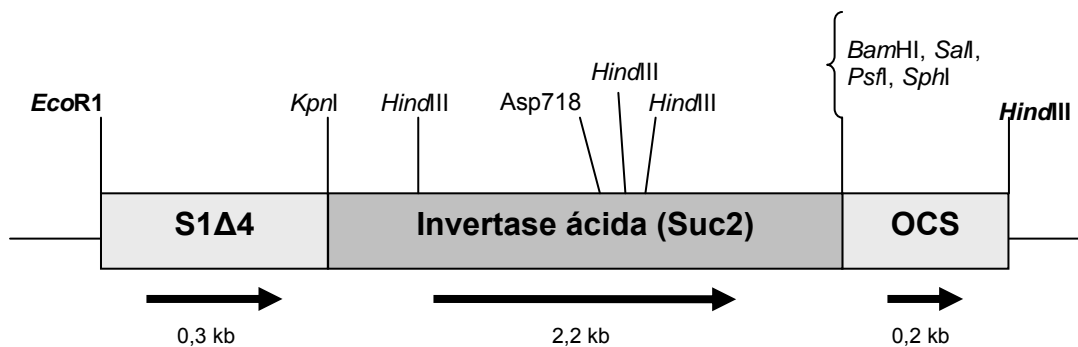


Figura 1: T-DNA usado na produção de plantas transgênicas expressando o gene da invertase ácida de levedura Suc2 (senso) no citossol de células-guarda (Provart, 1996)

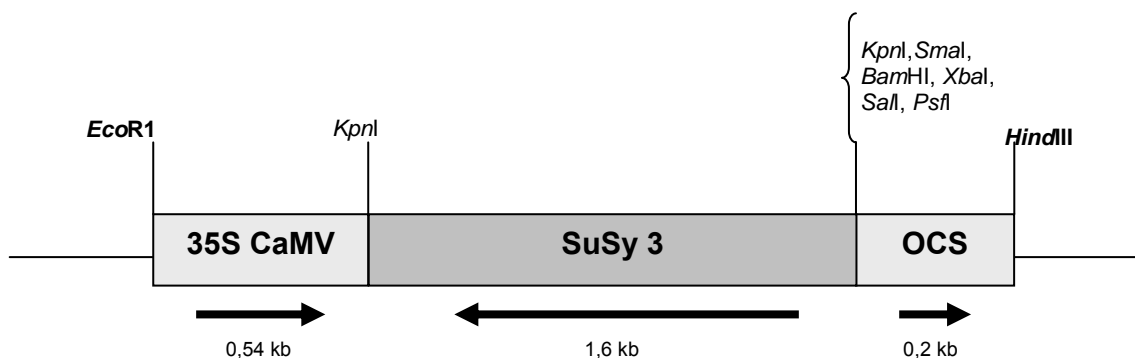


Figura 2: T-DNA usado na produção de plantas transgênicas expressando o gene da sintase da sacarose de batata, SuSy 3 (antisense) (Loureiro, 1999)

4.2 Condições de cultivo

Plantas originadas de tubérculos com cerca de 20 g foram cultivadas em vasos plásticos preenchidos com mistura de 5 dm³ de três partes de solo, duas de areia e uma de esterco bovino curtido e adubação necessária, à base de NPK. A irrigação foi realizada de maneira a manter a umidade do solo próxima à capacidade do vaso.

4.3 Experimentos

4.3.1 Delineamento experimental

O experimento com as plantas SS3 antisense consistiu-se de fatorial 5 x 5, sendo cinco genótipos de batata (um controle não-transformado e quatro linhagens transgênicas) e cinco horários de avaliação, com cinco repetições. O delineamento experimental foi em blocos completamente casualizados. A unidade experimental foi composta de uma planta por vaso. O mesmo modelo foi adotado para avaliarem-se plantas JE INV, utilizando-se de apenas três genótipos de batata. As análises

estatísticas foram feitas por meio do uso do "software" Statistica (StatSoft Inc. 2001), considerando-se significativas as diferenças a $P < 0,05$ (teste de Duncan).

4.3.2 Trocas gasosas e parâmetros biométricos

4.3.2.1 Curso diário das trocas gasosas

As trocas gasosas foram avaliadas em folhas jovens completamente expandidas em plantas com 25, 35 e 55 dias, usando-se de um analisador de gases a infravermelho (LI 6400, Licor, Lincoln, NE, EUA), equipado com fonte de radiação fotossinteticamente ativa (RFA) e controle da temperatura. A temperatura foi mantida constante e próxima à do ambiente durante cada horário de avaliação. Todas as medições foram feitas sob fluxo de ar de $500 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ e umidade relativa e concentração de CO_2 ambientes. Nas avaliações diurnas, foi utilizada RFA de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

4.3.2.2 Respostas da fotossíntese à irradiância

Foram avaliadas as respostas fotossintéticas à luz. Foi usada uma seqüência decrescente ($1000, 800, 500, 100, 50, 10$ e $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) de RFA, à temperatura (27°C) e concentração de CO_2 ($360 \mu\text{L L}^{-1}$) constantes.

4.3.2.3 Respostas da fotossíntese ao CO_2

Foram avaliadas, nas plantas JE INV, respostas fotossintéticas ao CO_2 . Foi usada uma seqüência de concentrações ($400, 300, 200, 100, 50, 400, 600, 800$ e $1000 \mu\text{L L}^{-1}$) de CO_2 , RFA ($1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e temperatura (27°C) constantes.

4.3.2.4 Parâmetros biométricos

Foram avaliadas, em dois ciclos de cultivo, a massa fresca e a densidade dos tubérculos, a massa seca da parte aérea e a área foliar.

4.3.3 Avaliações enzimáticas

Sintase da sacarose e invertase ácida

Para determinação da atividade da SuSy em CG, utilizou-se da técnica de isolamento de fragmentos epidérmicos, em que as CG compõem mais de 95% das

células intactas (Kopka *et al.*, 1997). Em função da alta porcentagem de CG nesses fragmentos, vários autores têm considerado que as observações feitas com os mesmos equivalem àquelas que seriam obtidas com células estomáticas isoladas (Kruse *et al.*, 1989).

Depois de isoladas as CG, os extratos enzimáticos para a SuSy (EC 2.4.1.13) e invertase ácida (EC 3.2.1.26) foram preparados de acordo com Stitt *et al.* (1989). O meio de extração foi composto de Hepes-KOH 50 mM (pH 7,4); MgCl₂ 5 mM; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; β-mercaptoetanol 10 mM; benzamidina 2 mM; ácido ε-amino-n-capróico 2 mM; PMSF 0,5 mM (dissolvido em dimetil sulfóxido); glicerol a 10 % (v/v) e Triton X-100 a 0,1% (v/v). Os extratos dessalinizados em colunas de 3,0 x 1,0 cm com gel Sephadex G-25 eram armazenados a -20 °C, até serem utilizados.

A atividade da SuSy foi determinada em uma reação acoplada na direção da degradação da sacarose, pela medição da quantidade de UDP-glicose liberada (Zrenner *et al.*, 1995). A mistura de reação (100 µL) consistiu de um volume de extrato num tampão contendo como concentrações finais Hepes-KOH 20 mM (pH 7,0), sacarose 400 mM e UDP 4 mM, a uma temperatura de incubação de 30 °C. A reação foi iniciada pela adição do extrato e interrompida por incubação, a 100 °C, por 3 min. A determinação da concentração de UDPG foi realizada em um volume de reação de 300 µL, contendo tampão glicina-NaOH 200 mM (pH 8,9); MgCl₂ 5 mM e NAD⁺ 2 mM. A reação foi registrada continuamente em leitor de ELISA (ELISA Versamax; Molecular Devices, Sunnyvale, EUA), a 340 nm, por cerca de 5 min, sendo iniciada pela adição de desidrogenase da UDP-glicose, à quantidade final de 0,005 U reação⁻¹.

Para determinação da atividade da invertase ácida, a mistura de reação (100 µL), continha tampão acetato de sódio 100 mM (pH 4,6) e sacarose 100 mM. A reação foi iniciada pela adição do extrato, mantida em banho-maria por 60 min, a 37 °C e interrompida por adição de 10 µL de tampão fosfato de sódio 1M (pH 7,2) e, em seguida, por colocação em água fervente, por 3 min. Para determinação dos teores da glicose liberada, utilizou-se de alíquota da primeira reação em tampão apropriado (Imidazol 100 mM (pH 6,9); MgCl₂ 5 mM; NAD⁺ 2 mM; ATP 1 mM), contendo, ainda, 2 U mL⁻¹ de desidrogenase da glicose-6-fosfato, em volume final de 300 µL. A reação foi registrada continuamente em leitor de ELISA, a 340 nm, por cerca de 5 min, sendo iniciada pela adição de hexocinase, à quantidade final de 0,2 U reação⁻¹ para a determinação da glicose.

O volume de extrato usado na reação enzimática foi determinado de acordo com a linearidade da resposta ao volume de extrato e tempo da reação. As reações-

controle (brancos) foram avaliadas com o extrato fervido por 3 min, da mesma forma como descrito anteriormente.

Foi utilizado o método de Bradford (1976) para determinação o teor de proteína, com uso de curva de calibração com albumina sérica bovina (BSA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Trocas gasosas nas plantas SS3 antisense

Comparadas às plantas-controle, as plantas transgênicas exibiram reduções significativas em g_s às 08:00 e 12:00h, mas não nos demais horários (Fig. 3). Ressalta-se que a redução em g_s observada às 04:00h não ocorreu nas demais épocas avaliadas (Fig. 19 e 28 – Anexo).

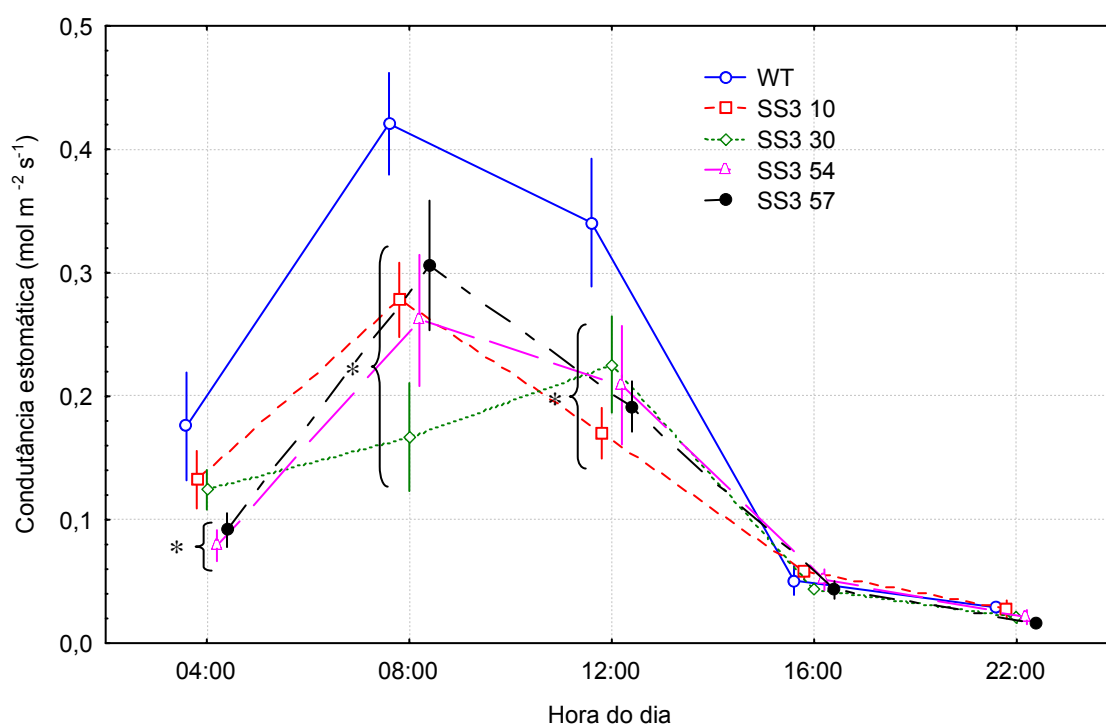


Figura 3: Curso diário de condutância estomática das plantas SS3 antisense e plantas não-transformadas (WT), aos 35 dias de idade. Para cada horário, os pontos foram ligeiramente deslocados horizontalmente, de modo a facilitar a visualização das linhas verticais, que representam o erro padrão da média. $n = 5$. Dentro de um mesmo horário, médias (pontos) precedidas de chaves e asterisco diferem significativamente ($P < 0,05$; teste de Duncan) em relação às das plantas-controle – WT

As reduções em g_s nas plantas transgênicas não foram acompanhadas, efetivamente, por reduções proporcionais em A (Fig. 4). As respostas de A às variações em g_s foram largamente independentes dos tratamentos, sugerindo que, potencialmente, menores valores de A estiveram associados a menor g_s , e não a uma

menor capacidade mesofílica para fixação do CO₂ (Fig. 5). A constância da razão C_i/C_a é consistente com esta assertiva (Fig. 6).

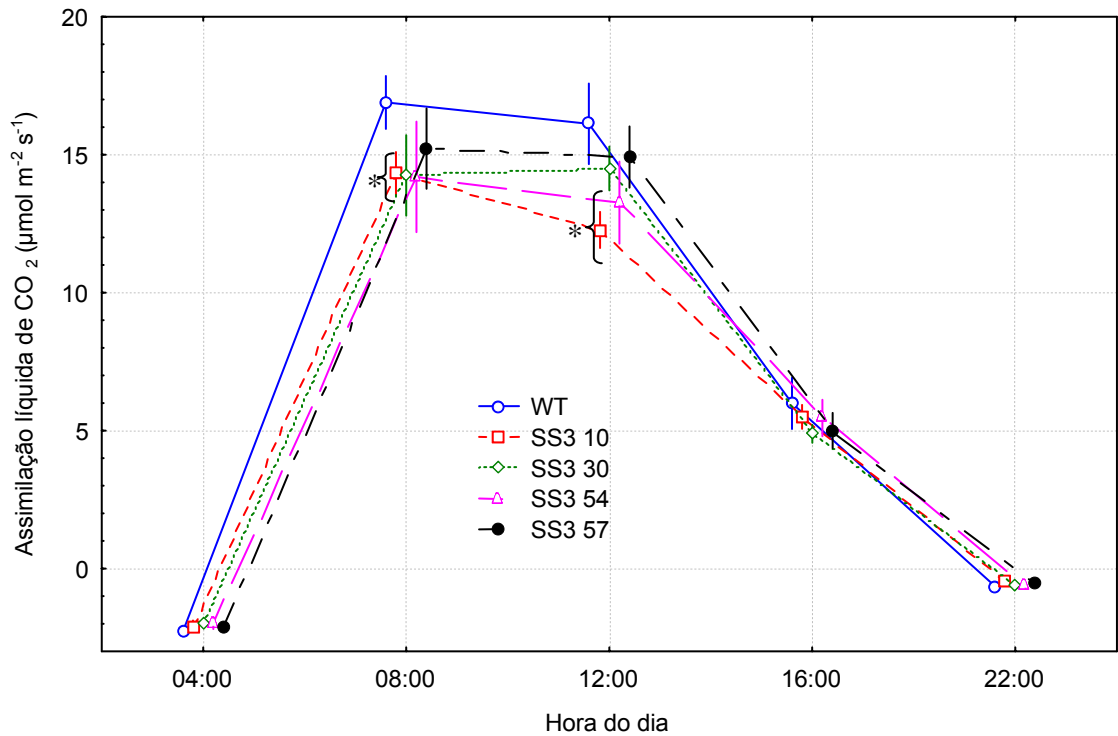


Figura 4: Curso diário da assimilação líquida de CO₂ das plantas SS3 antisense e plantas não-transformadas (WT), aos 35 dias de idade. Para cada horário, os pontos foram ligeiramente deslocados horizontalmente, de modo a facilitar a visualização das linhas verticais, que representam o erro padrão da média. n = 5. Dentro de um mesmo horário, médias (pontos) precedidas de chaves e asterisco diferem significativamente (P < 0,05; teste de Duncan) em relação às das plantas-controle – WT

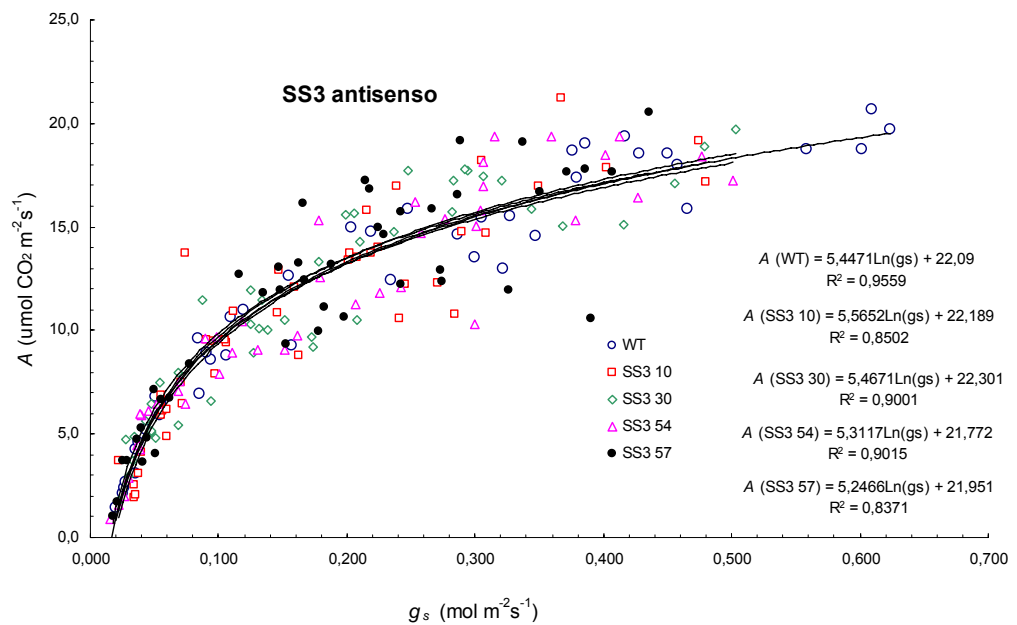


Figura 5: Taxa de assimilação líquida de CO₂ (A) em função da condutância estomática (g_s), nas plantas SS3 antisense e nas plantas-controle - WT

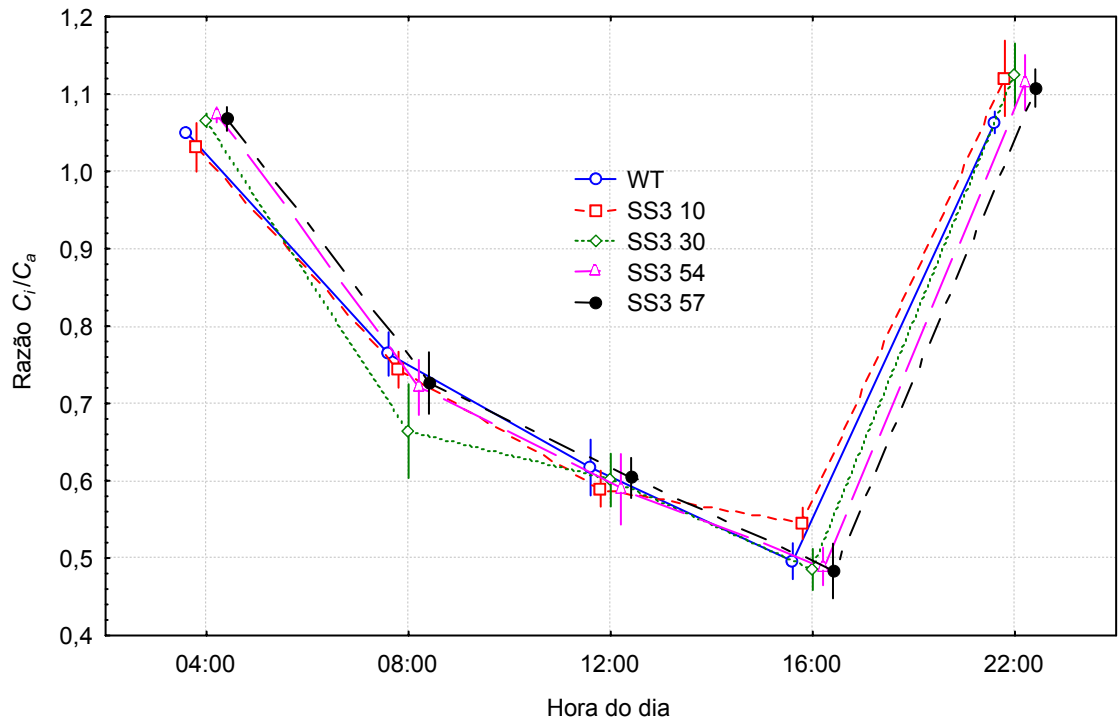


Figura 6: Curso diário das razões entre concentração de CO_2 na câmara sub-estomática das plantas SS3 antisense e plantas não-transformadas (WT), aos 35 dias de idade. Para cada horário, os pontos foram ligeiramente deslocados horizontalmente, de modo a facilitar a visualização das linhas verticais, que representam o erro padrão da média. $n = 5$. Dentro de um mesmo horário, médias (pontos) precedidas de chaves e asterisco diferem significativamente ($P < 0,05$; teste de Duncan) em relação às das plantas-controle – WT

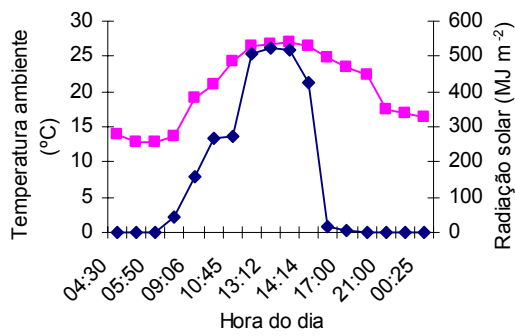


Figura 7: Curso diário da temperatura ambiente (róseo) e radiação solar (azul)

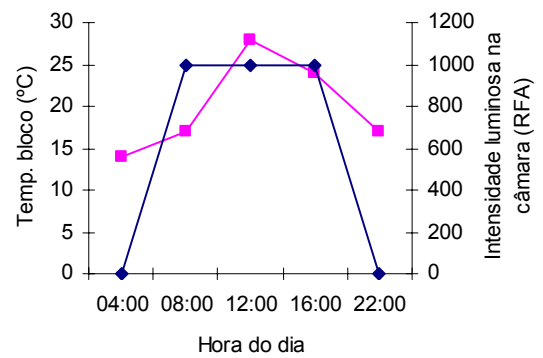


Figura 8: Curso diário da temperatura na câmara de medição das trocas gasosas (róseo) e radiação fotossinteticamente ativa aplicada (azul)

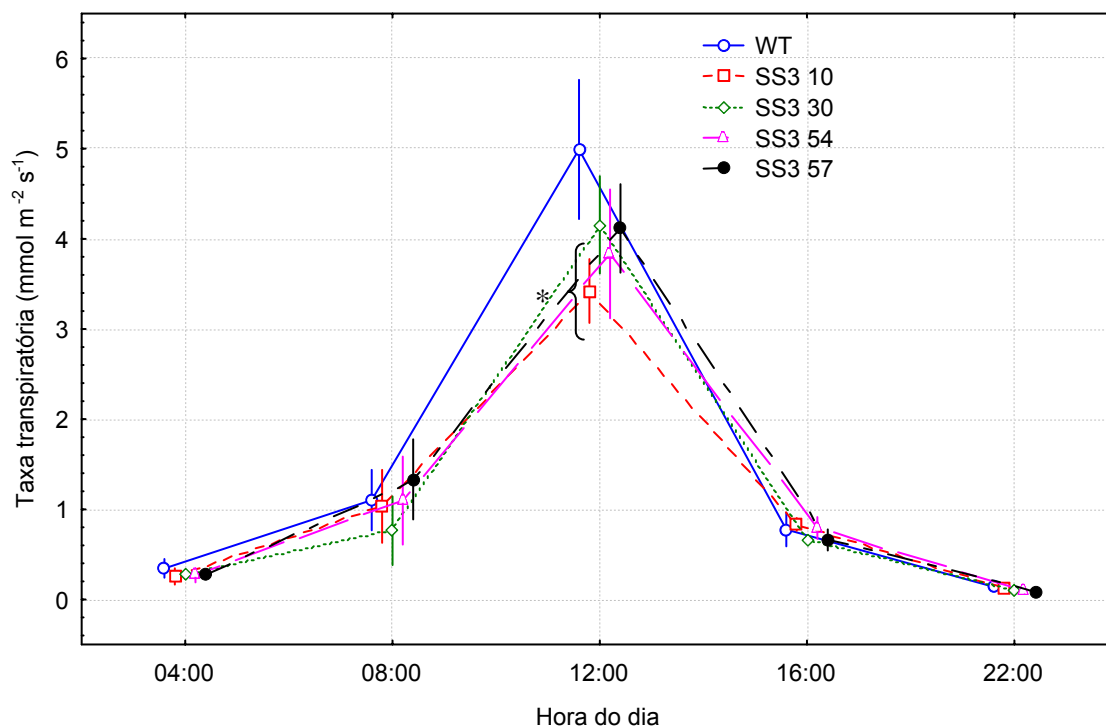


Figura 9: Curso diário da taxa transpiratória das plantas SS3 antisense e plantas não-transformadas (WT), aos 35 dias de idade. Para cada horário, os pontos foram ligeiramente deslocados horizontalmente, de modo a facilitar a visualização das linhas verticais, que representam o erro padrão da média. $n = 5$. Dentro de um mesmo horário, médias (pontos) precedidas de chaves e asterisco diferem significativamente ($P < 0,05$; teste de Duncan) em relação às das plantas-controle – WT

Considerando-se os efeitos da redução da expressão de SuSy 3 em g_s , as consequências sobre a taxa transpiratória foram também significativas, dependendo do déficit de pressão de vapor e de g_s , num determinado horário. Às 08:00h, quando foram observadas reduções em g_s nas plantas SS3 antisense, as taxas de transpiração não foram reduzidas significativamente, possivelmente pela maior umidade relativa do ar naquele horário e também por temperaturas mais baixas (Fig. 7 e 8), o que reduz o déficit de pressão de vapor na atmosfera, desacoplando o comportamento da transpiração em relação a g_s . No entanto, quando a demanda de vapor na atmosfera era maior, às 12:00h, observa-se que a redução em g_s deve ter acarretado redução da taxa transpiratória das plantas SS3 antisense (Fig. 9).

Com intuito de explorar a hipótese de que o efeito observado em g_s se deve a uma modificação do metabolismo, ocorrendo, de forma específica, nas CG, determinaram-se as atividades da SuSy e invertases ácidas, em fragmentos epidérmicos, que contêm no mínimo 95% de CG (vide M&M; 4.3.3.1). Os resultados mostram uma redução marcante (em torno de 40%) na atividade total de SuSy em CG (Tabela 1). Esta redução é maior em várias das linhagens avaliadas, em relação à

observada com os extratos enzimáticos do limbo foliar (vide Capítulo II). Isso sugere que esteja ocorrendo um efeito mais proeminente no metabolismo de açúcares das CG, quando comparado ao das células mesofílicas. As CG apresentam uma particularidade de não possuírem conexões plasmodesmáticas com as células subsidiárias (Wille & Lucas, 1984), e são as únicas células epidérmicas que apresentam cloroplastos, possibilitando ter uma fisiologia completamente diferenciada das demais células epidérmicas ou mesmo mesofílicas (Outlaw Jr., 1989; Hite *et al.*, 1993; Kopka *et al.*, 1997; Leonhardt *et al.*, 2004). Em todo caso, é possível que a redução na atividade degradadora da sacarose pela SuSy, nas CG, poderia estar sendo compensada por um aumento na atividade de invertases; isso poderia anular algum efeito significativo da repressão da expressão da SuSy 3 no metabolismo de açúcares. Não obstante, a redução na atividade da SuSy não foi compensada por maior atividade da invertase (Tab. 1). Dessa forma, pode-se sugerir que, nas CG, estaria ocorrendo uma redução no fluxo de degradação de sacarose e, por conseguinte, no acúmulo de hexoses em seus vacúolos. É plausível sugerir-se que aquela redução esteja associada a uma diminuição na turgescência das CG, o quê, então, explicaria a menor g_s .

Tabela 1: Atividade da SuSy e invertase ácida em extrato epidérmico. Os dados são expressos em $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot.}$ Os resultados em negrito e sublinhados apresentam diferenças estatísticas ($P < 0,05$; teste de Duncan), em relação ao grupo controle não-transformado (WT). $n = 5$ +/- o erro padrão da média.

	WT	SS3 10	SS3 30	SS3 54	SS3 57
SuSy	42,61 +/- 2,59	43,57 +/- 1,40	<u>23,39 +/- 2,43</u>	<u>22,82 +/- 1,64</u>	<u>22,73 +/- 3,44</u>
Invertase	284,1 +/- 34,0	214,2 +/- 22,7	247,7 +/- 26,8	256,8 +/- 58,5	314,0 +/- 36,6

A linhagem SS3 10, embora não apresentasse diferenças significativas na atividade da SuSy, foi a que apresentou a menor atividade de invertase ácida nas CG, compensando a ausência de redução na atividade da SuSy e possibilitando a manutenção de menores g_s . Possivelmente, uma redução líquida na taxa de clivagem da sacarose e uma provável redução nos teores de hexoses no vacúolo das CG foram responsáveis pelo fenótipo apresentado (Fig. 3).

Em conjunto, uma redução na atividade da SuSy em CG associou-se com a redução em g_s , fato acompanhado de uma ligeira redução em A , e redução mais significativa na transpiração, levando a um aumento na eficiência instantânea do uso da água (Fig. 10) nas plantas SS3 antisense, particularmente às 08:00h. Isso sugere que a SuSy 3 auxiliaria no controle da abertura estomática, provavelmente, catalisando a clivagem da sacarose e promovendo um aumento da turgescência das CG.

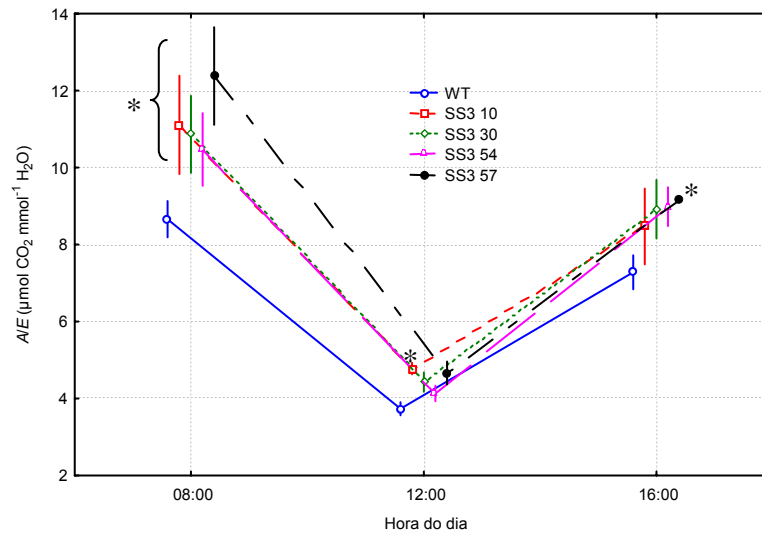


Figura 10: Curso diurno da eficiência instantânea do uso da água (A/E) das plantas SS3 antisenso e plantas não-transformadas (WT). Para cada horário, os pontos foram ligeiramente deslocados horizontalmente, de modo a facilitar a visualização das linhas verticais, que representam o erro padrão da média. $n = 5$. Dentro de um mesmo horário, médias (pontos) precedidas de chaves e asterisco diferem significativamente ($P < 0,05$; teste de Duncan) em relação às das plantas-controle – WT

5.2 Trocas gasosas nas plantas com superexpressão da invertase em células-guarda

Para validar a hipótese de que a manutenção de elevadas concentrações de hexoses nas CG promoveria uma redução no potencial osmótico e conseqüente aumento de turgescência celular com aumento de g_s , foram usadas plantas com maior atividade sacarolítica em CG, modificada por meio de manipulação em plantas transgênicas com superexpressão do gene de invertase de levedura especificamente em células estomáticas (Provart, 1996). O aumento na atividade da invertase em CG produziu fenótipos opostos aos da redução da SuSy 3, com aumentos em g_s (Fig. 11). Ademais, comparando-se com as plantas-controle, A foi incrementada durante o dia na linhagem JE INV 4, sem se observar, contudo, alterações na respiração noturna dessas plantas (Fig. 12).

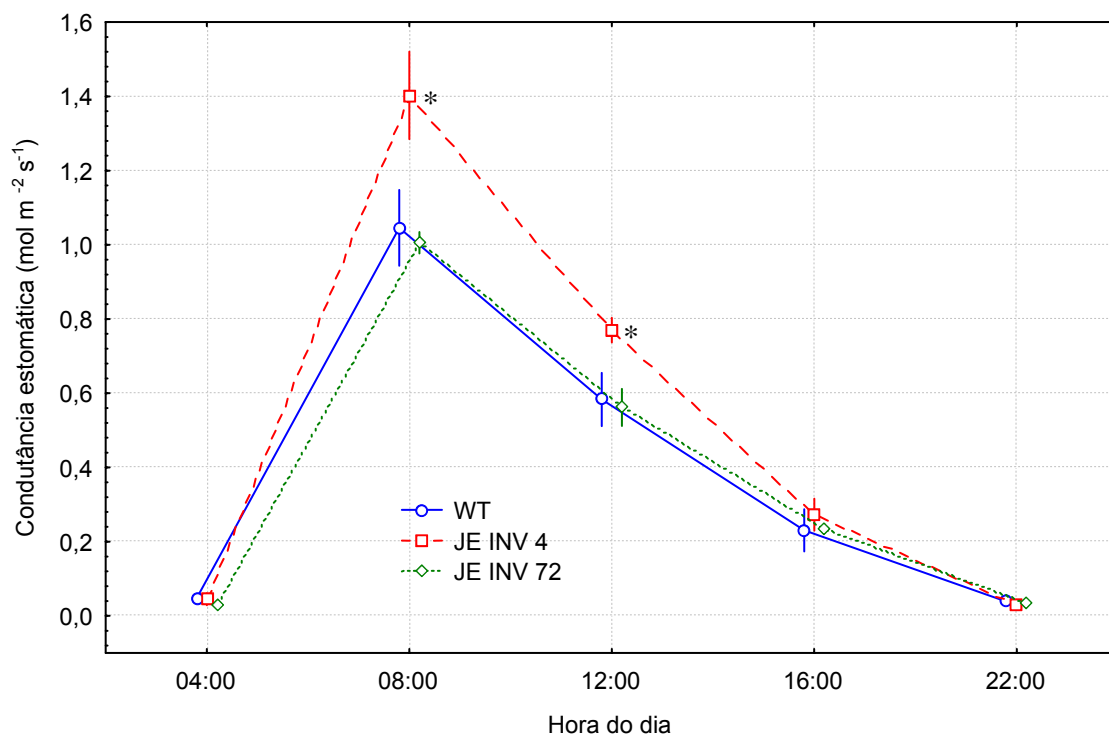


Figura 11: Curso diário de condutância estomática das plantas com superexpressão da invertase e plantas não-transformadas (WT). Os gráficos foram ligeiramente deslocados horizontalmente de modo a facilitar a visualização das linhas verticais, que representam o erro padrão da média. $n = 5$. Dentro de um mesmo horário, médias (pontos) seguidas de asterisco diferem significativamente ($P < 0,05$; teste de Duncan) em relação às plantas-controle – WT

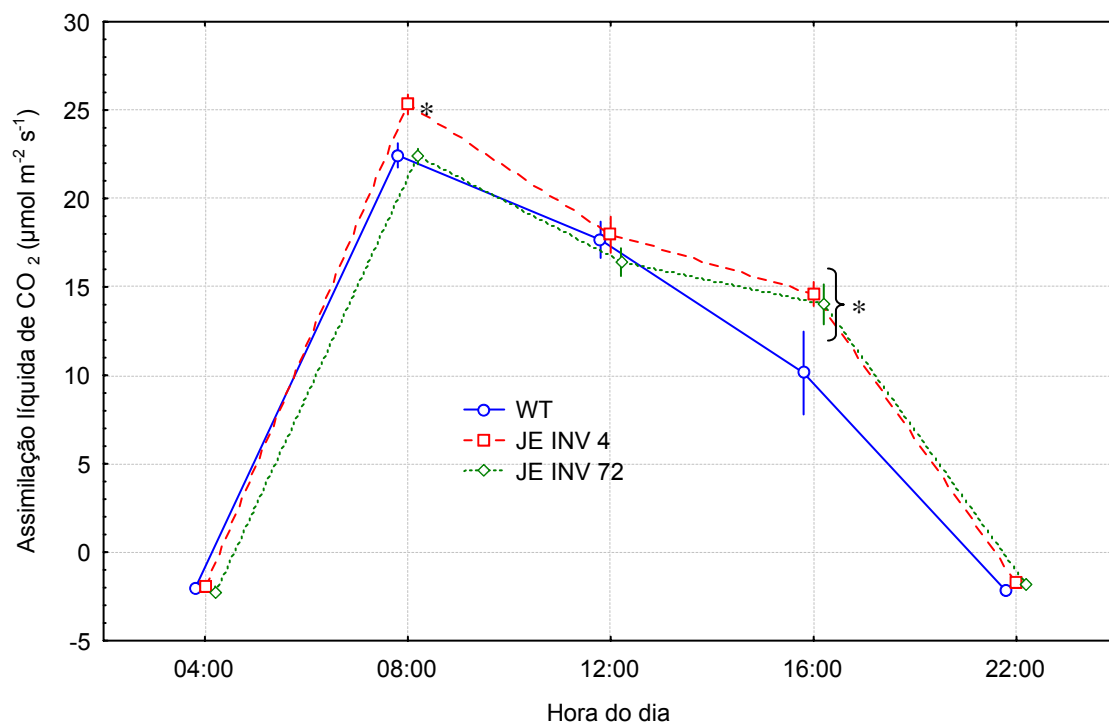


Figura 12: Curso diário da assimilação líquida de CO₂ em plantas com superexpressão de invertase e plantas não-transformadas (WT). Os gráficos foram ligeiramente deslocados horizontalmente de modo a facilitar a visualização das linhas verticais que representam o erro padrão da média. $n = 5$. Dentro de um mesmo horário, médias (pontos) seguidas de chaves e asterisco diferem significativamente ($P < 0,05$; teste de Duncan) em relação às plantas-controle – WT

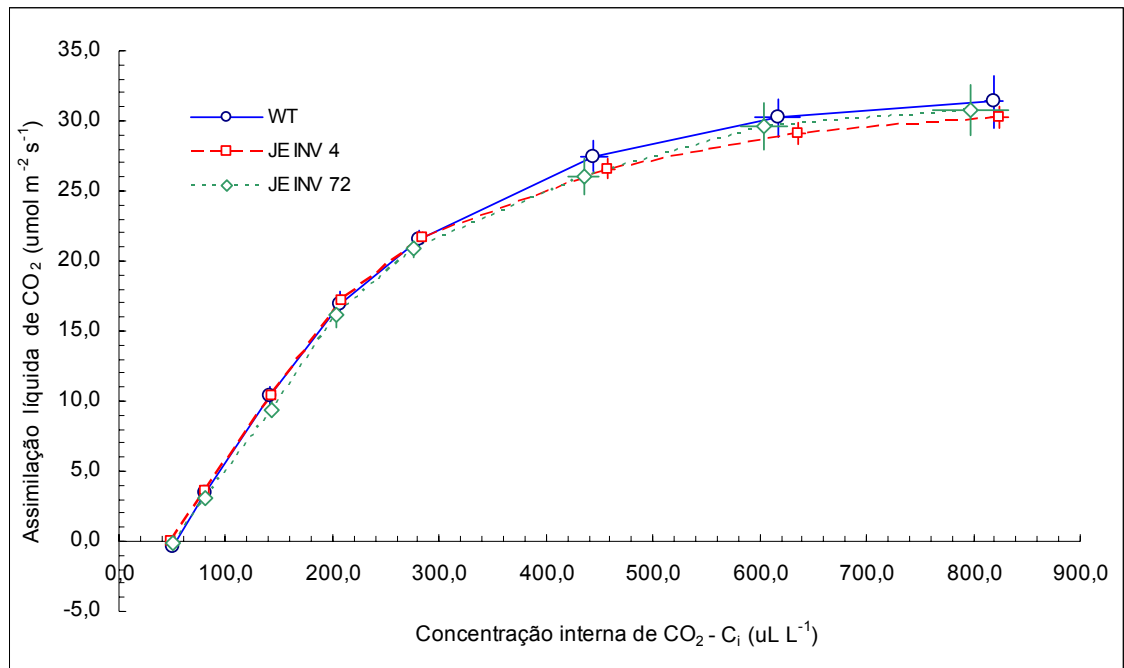


Figura 13: Taxa de assimilação líquida de CO₂ em plantas com superexpressão da invertase e plantas não-transformadas, em função da concentração interna de CO₂ - C_i. As barras verticais e horizontais apresentam o erro padrão da média. n = 5

O aumento em A pode ser explicado como resultante de menores limitações estomáticas em relação às plantas-controle; de fato, não se observaram diferenças significativas na capacidade mesofílica de assimilação do CO₂ entre aquelas plantas, conforme se depreende ao interpretar-se a curva A/C_i (A versus a concentração de CO₂ na câmara sub-estomática, C_i) (Fig 13).

Nas plantas JE INV (linhagens 4 e 72), já previamente transformadas e parcialmente caracterizadas por Provart (1996), foi observado que a linhagem JE INV 4 apresenta maior atividade de invertase recombinante no citossol das CG do que a linhagem JE INV 72. Em ambas as linhagens foram observadas concentrações mais elevadas de glicose e de frutose nas CG, fato mais expressivo na linhagem JE INV 4. Não foram observadas diferenças quanto aos teores de sacarose nas CG em ambas as linhagens, ou seja, o perfil de açúcares em CG era evidenciado por um aumento na relação hexoses/sacarose. Na linhagem JE INV 4, ainda, foi observada uma maior velocidade de abertura estomática e de igual fechamento. Estes resultados parecem corroborar a hipótese de que a invertase participaria no processo de abertura estomática via modulação nos teores de sacarose e, principalmente, hexoses em CG, que, por sua vez, auxiliaria na abertura estomática.

Sabe-se que as concentrações de sacarose se elevam no simplasto das CG durante o processo de abertura estomática (Lu *et al.*, 1995; Outlaw Jr & Vlieghere-He,

2001). Isso, aliado ao fato de que a redução da atividade da SuSy em CG promoveu uma redução em g_s , permite especular que, *in vivo*, durante o processo de abertura estomática, tanto as invertases quanto a SuSy 3 estariam atuando na degradação de sacarose e contribuindo para um aumento no teor de hexoses (função osmótica), ou mesmo que a SuSy estaria atuando sobre uma rota de degradação de sacarose energeticamente favorável, de forma a economizar energia para governar o próprio influxo de sacarose bem como de íons K^+ , ou demais osmólitos participantes, de forma a governar o aumento de turgescência e aumento de g_s (Talbot & Zeiger, 1996).

5.3 Regulação fotossintética pela força-dreno

Nos três períodos avaliados, com plantas de 25, 35 e 55 dias, notam-se reduções gradativas em A e g_s com o avançar da idade (Fig. 14 e 15), possivelmente por limitações da força-dreno (Paul & Foyer, 2001; Delmer & Haigler, 2002). A fotossíntese é um processo altamente regulado e intensamente integrado com outros processos metabólicos, de forma a maximizar o uso da luz e minimizar os efeitos danosos do excesso da própria luz, bem como otimizar o uso limitado das reservas de carbono e de nitrogênio. A hipótese de retro-inibição da fotossíntese pode estar implicada nessa forma de integração (Paul & Foyer, 2001).

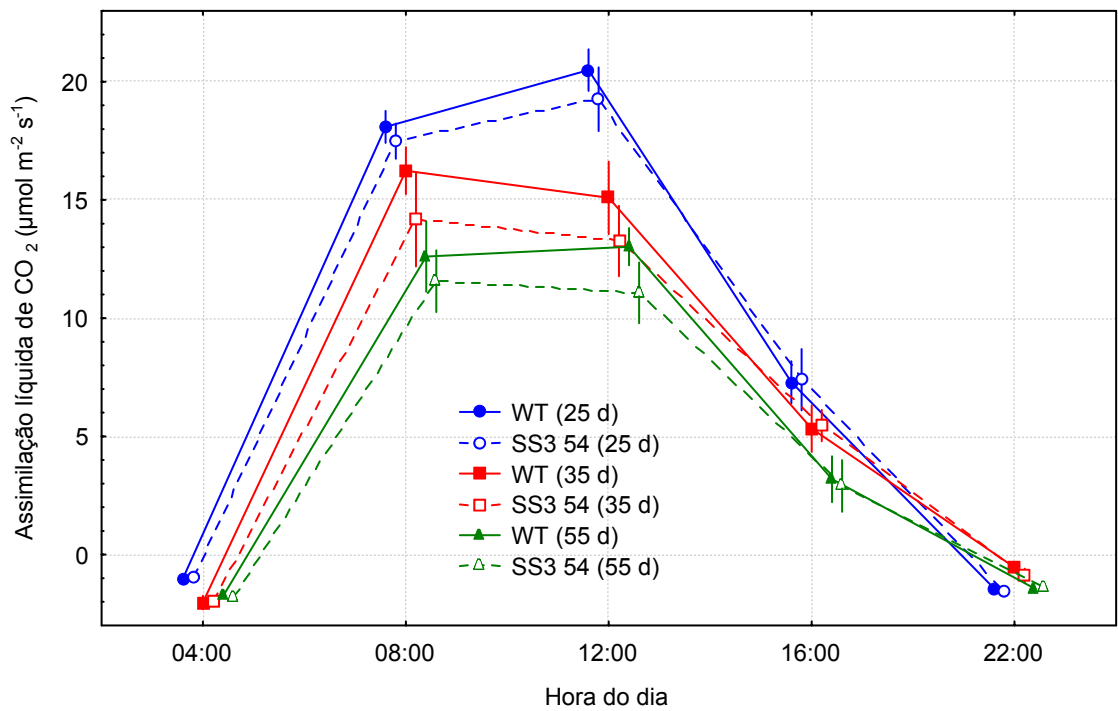


Figura 14: Curso diário das taxas de assimilação líquida de CO₂ em diferentes épocas do desenvolvimento. Traçados de mesma cor representam o mesmo período de desenvolvimento. Em Azul, plantas com 25 dias de idade; Vermelho: 35 dias; Verde: 55 dias. Traçados contínuos e pontos cheios representam o controle, WT e traçados pontilhados e pontos vazios uma linhagem SS3 antisenso representativa, SS3 54

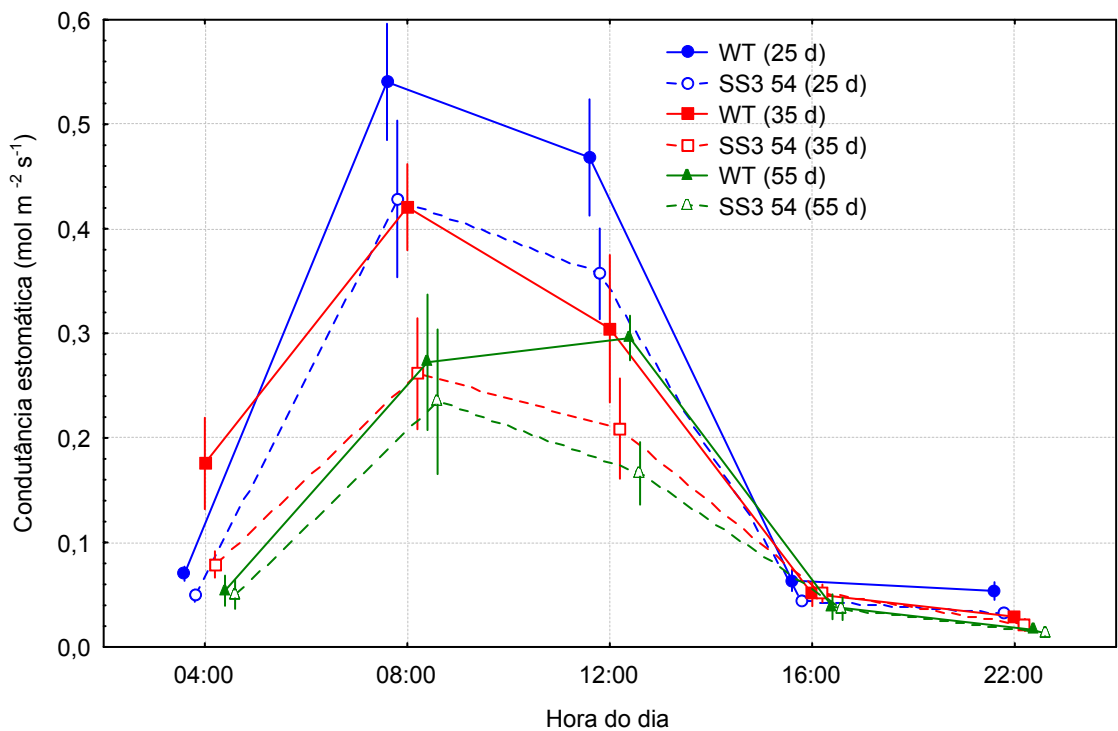


Figura 15: Curso diário da condutância estomática em diferentes épocas do desenvolvimento. Traçados de mesma cor representam o mesmo período de desenvolvimento. Em Azul, plantas com 25 dias de idade; Vermelho: 35 dias; Verde: 55 dias. Traçados contínuos e pontos cheios representam o controle, WT e traçados pontilhados e pontos vazios uma linhagem SS3 antisenso representativa, SS3 54

5.4 Parâmetros biométricos

Observou-se, de maneira geral, nas plantas com expressão reduzida da SuSy 3, maior acúmulo de matéria seca nas folhas e no caule e maior área foliar (Tab. 2), como também pode ser observado na Fig. 16.

Os tubérculos das plantas SS3 antisense apresentaram uma menor densidade (Fig. 17), que se correlaciona positivamente com os teores de amido. Esse fenótipo pode ser explicado por algumas evidências: 1) a menor densidade pode ter significado uma menor força-dreno, permitindo, então, um maior crescimento da parte aérea nas plantas transgênicas (Tang *et al.*, 1999); 2) a redução da taxa de exportação de sacarose, promovido pela redução na atividade da SuSy (Hänggi & Fleming, 2001), possivelmente, estaria relacionada com os aumentos dos teores de sacarose e amido nas folhas daquelas plantas (vide Capítulo II). Esse maior "pool" de carboidratos supostamente foi usado para um maior crescimento da parte aérea, em detrimento ao acúmulo de amido nos tubérculos; 3) a isoforma SuSy 3 pode estar diretamente relacionada com a síntese de amido, que representa mais de 95% da massa seca do tubérculo. A última hipótese é menos provável, em função de a expressão do gene SS3 ser muito fraca em tubérculos, quando comparada à expressão do gene SS1. Devido à alta homologia entre as isoformas SS1 e SS3 (87%), a expressão do RNA antisense SS3 também reduz a expressão do gene SS1, assim, o fenótipo observado, em tubérculos, possivelmente, é proveniente da redução das duas isoformas (Loureiro, 1999). Alternativamente, o aumento observado na massa fresca dos tubérculos das plantas SS3 antisense (Fig. 17 A) seria promovido pelos maiores teores de glicose (500%), frutose (300%) e sacarose (100%), podendo estes valores alcançar em até 20X, 6X, 4X, respectivamente (Loureiro, 1999). Associado com o aumento nos teores de açúcares solúveis, ocorreu redução nos teores de amido em, aproximadamente, 30%, alcançando até 47% (Loureiro, 1999). A redução na densidade dos tubérculos (Fig. 17 B) traduz, em termos genéricos, redução nos teores de amido e aumento em açúcares solúveis, ou seja, os tubérculos passaram a acumular mais água, em função de os açúcares solúveis serem osmoticamente ativos e o amido não, explicando-se a maior massa fresca (Fig. 17A). Não foi observada maior indução à tuberização nas plantas transgênicas (Fig. 17 C).



Figura 16: Imagem de uma planta, representativa de cada linhagem, com 35 dias após o transplante.

Tabela 2. Caracterização morfológica e acúmulo de biomassa em plantas transgênicas com atividade reduzida SuSy3. Acúmulo de matéria seca (MS; g) e área foliar total (cm²), produzidos nos diferentes órgãos, em plantas com 8 semanas. Os dados representam a média de cinco plantas para cada linhagem. Diferenças significativas ($p < 0,05$; teste de Duncan) em relação ao controle (WT) são apresentadas em negrito e sublinhadas

Parâmetro	Genótipo				
	WT	SS3 10	SS3 30	SS3 54	SS3 57
MS caule	8,20 ± 1,51	<u>14,07 ± 1,07</u>	11,65 ± 0,14	9,52 ± 0,85	<u>14,82 ± 0,99</u>
MS folhas	6,25 ± 0,83	<u>10,16 ± 0,57</u>	8,64 ± 0,39	6,44 ± 0,03	<u>9,10 ± 0,95</u>
Área foliar	2388 ± 325,1	<u>3777 ± 170,7</u>	<u>3384 ± 278,2</u>	3102 ± 791,2	<u>3311 ± 466,0</u>

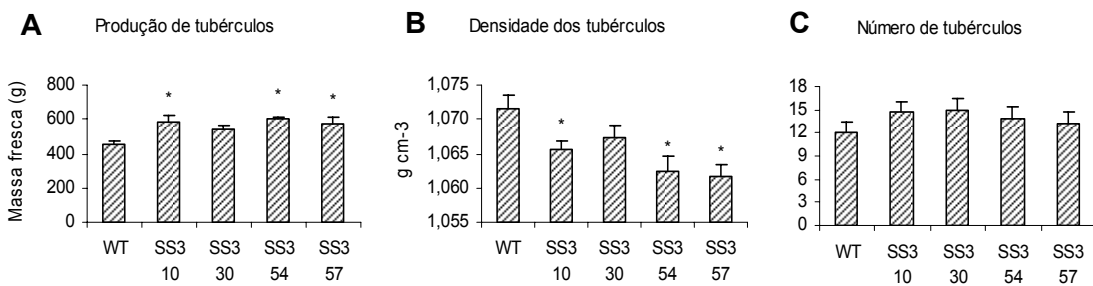


Figura 17: Dados biométricos de tubérculos de plantas com 13 semanas de idade. $n = 5$. As barras verticais representam o erro padrão da média. Diferenças significativas ($p < 0,05$; teste de Duncan) em relação ao controle (WT) são apresentadas em negrito e sublinhadas indicadas com a presença de um asterisco

6 CONCLUSÕES

Em plantas de batata, a manipulação do metabolismo da sacarose em células-guarda produziu modificações no comportamento dos movimentos estomáticos. Por um lado, a redução da atividade da SuSy reduziu g_s e, por outro, o aumento da atividade da invertase provocou uma resposta inversa, aumento de g_s . Estas mudanças levaram às modificações na magnitude das taxas de assimilação do carbono, sem, contudo, alterar a capacidade mesofílica de assimilação do CO_2 , indicando que limitações estomáticas, provocadas por alterações no metabolismo de sacarose nas células-guarda, devem estar implicadas nessas respostas.

A redução na expressão da isoforma SuSy resultou em plantas com maior área foliar e um maior acúmulo de massa seca na parte aérea, com redução na densidade dos tubérculos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bradford MM** (1976) Rapid and quantitative method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-252
- Delmer DP, Haigler CH** (2002) The regulation of metabolic flux to cellulose, a major sink for carbon in plants. *Metabol Engen* **4**:22-28
- Ewert MS, Outlaw WH Jr, Zhang S, Aghoram K, Riddle KA** (2000) Accumulation of an apoplastic solute in the guard-cell wall is sufficient to exert a significant effect on transpiration in *Vicia faba* leaflets. *Plant Cell Environ* **23**:195-203
- Gotow K, Taylor S, Zeiger E** (1988) Photosynthetic carbon fixation in guard cell protoplasts from *Vicia faba* L.: evidence from radiolabel experiments. *Plant Physiol* **86**:700-705
- Hänggi E, Fleming AJ** (2001) Sucrose synthase expression pattern in young maize leaves: implications for phloem transport. *Planta* **214**:326-329
- Hite DRC, Outlaw WH Jr, Tarczynski MC** (1993) Elevated levels of both sucrose-phosphate synthase and sucrose synthase in *Vicia faba* guard cells indicate cell-specific carbohydrate interconversions. *Plant Physiol* **101**:1217-1221
- Kopka J, Provarnt NJ, Müller-Röber B** (1997) Potato guard cells respond to drying soil by a complex change in the expression of genes related to carbon metabolism and turgor regulation. *Plant J* **11**:871-882
- Kruse T, Tallman G, Zeiger E** (1989) Isolation of guard cell protoplasts from mechanically prepared epidermis of *Vicia faba* leaves. *Plant Physiol* **90**:1382-1386

- Leonhardt N, Kwak JM, Robert N, Warner D, Leonhardt G, Schroeder JI** (2004) Microarray expression analysis of *Arabidopsis* guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2c mutant. *Plant Cell* **16**:596-616
- Loureiro ME** (1999) *The role of SNF1 and sucrose synthase in metabolism of potato tubers*. PhD Thesis. Freie Universität Berlin. 172p
- Lu P, Outlaw WH Jr, Freed GA** (1997) A new mechanism for the regulation of stomatal aperture size in intact leaves: accumulation of mesophyll-derivate sucrose in the guard-cell wall of *Vicia faba*. *Plant Physiol* **114**:109-118
- Lu P, Zhang SQ, Outlaw WH Jr** (1995) Sucrose: a solute that accumulates in the guard-cell apoplast and guard-cell simplast of open stomata. *FEBS Lett* **362**:180-184
- Meyer LE** (2003) *Papel fisiológico de uma isoenzima de sintase de sacarose em folhas de batata*. Tese MS. Universidade Federal de Viçosa. 48p
- Müller-Röber B, La Cognata U, Sonnewald U, Willmitzer L** (1994) A truncated version of an ADP-glucose pyrophosphorylase promoter from potato specifies guard cell-selective expression in transgenic plants. *Plant Cell* **6**:601-612
- Outlaw WH Jr** (1983) Current concepts on the role of potassium in stomatal movements. *Physiol Plant* **59**:302-311
- Outlaw WH Jr** (1989) Critical examination of the quantitative evidence for and against photosynthetic CO₂ fixation by guard cells. *Physiol Plant* **77**:275-281
- Outlaw WH Jr, Vlieghere-He X** (2001) Transpiration rate. An important factor controlling the sucrose content of guard cell apoplast of brad bean. *Plant Physiol* **126**:1716-1724
- Outlaw WH Jr, Zhang SQ** (2001) Single-cell dissection and microdroplet chemistry. *J Exp Bot* **52**:605-614
- Paul MJ, Foyer CH** (2001) Sink regulation of photosynthesis. *J Exp Bot* **52**:1383-1400
- Poffenroth M, Green DB, Talmann G** (1992) Sugar concentrations in guard cells of *Vicia faba* illuminated with red or blue light: analysis by high performance liquid chromatography. *Plant Physiol* **98**:1460-1471
- Provar NJ** (1996) *The molecular biology of guard cells in Solanum tuberosum*. PhD Thesis. Freie Universität Berlin. 115p
- Ritte G, Rosenfeld J, Rohrig K, Raschke K** (1999) Rates of sugar uptake by guard cell protoplasts of *Pisum sativum* L. related to the solute requirement for stomatal opening. *Plant Physiol* **121**:647-655
- Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM, Waner D** (2001) Guard cell signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**:627-658

- StatSoft, Inc.** (2001) STATISTICA (data analysis software system), Version 6. www.statsoft.com
- Stitt M, Lilley RM, Heldt HW** (1989) Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Meth Enzymol* **174**:518-552
- Talbott LD, Zeiger E** (1993) Sugar and organic acid accumulation in guard cells of *Vicia faba* in response to red and blue light. *Plant Physiol* **102**:1163-1169
- Talbott LD, Zeiger E** (1996). Central roles for potassium and sucrose in guard cell osmoregulation. *Plant Physiol* **111**:1051-1057
- Talbott LD, Zeiger E** (1998). The role for sucrose in guard cell osmoregulation. *J Exp Bot* **49**:329-337
- Tallmann G, Zeiger E** (1988) Light quality and osmoregulation in *Vicia faba* guard cells: evidence for involvement of three metabolic pathways. *Plant Physiol* **88**:887-895
- Tang G-Q, Lüscher M, Sturm A** (1999) Antisense repression of vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrot alters early plant development and sucrose partitioning. *Plant Cell* **11**:177-189
- Tarczynski MC, Outlaw WH Jr, Arold N, Neuhoff V, Hampp R** (1989) Electrophoretic assay for ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in guard cell and other cells of *Vicia faba*. *Plant Physiol* **89**:1088-1093
- Wille AC, Lucas WJ** (1984) Ultrastructural and histochemical studies on guard cells. *Planta* **160**:129-142
- Zhang SQ, Outlaw WH Jr** (2001a) The guard-cell apoplast as site of abscisic acid accumulation in *Vicia faba* L. *Plant Cell Environ* **24**:347-355
- Zhang SQ, Outlaw WH Jr** (2001b) Abscisic acid introduced into the transpiration stream accumulates in the guard-cell apoplast and causes stomatal closure. *Plant Cell Environ* **24**:347-355
- Zrenner R, Salanoubat M, Willmitzer L, Sonnewald U** (1995) Evidence for the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J* **7**:97-107

8 ANEXO

8.1 Plantas SS3 antisense com 25 dias de idade

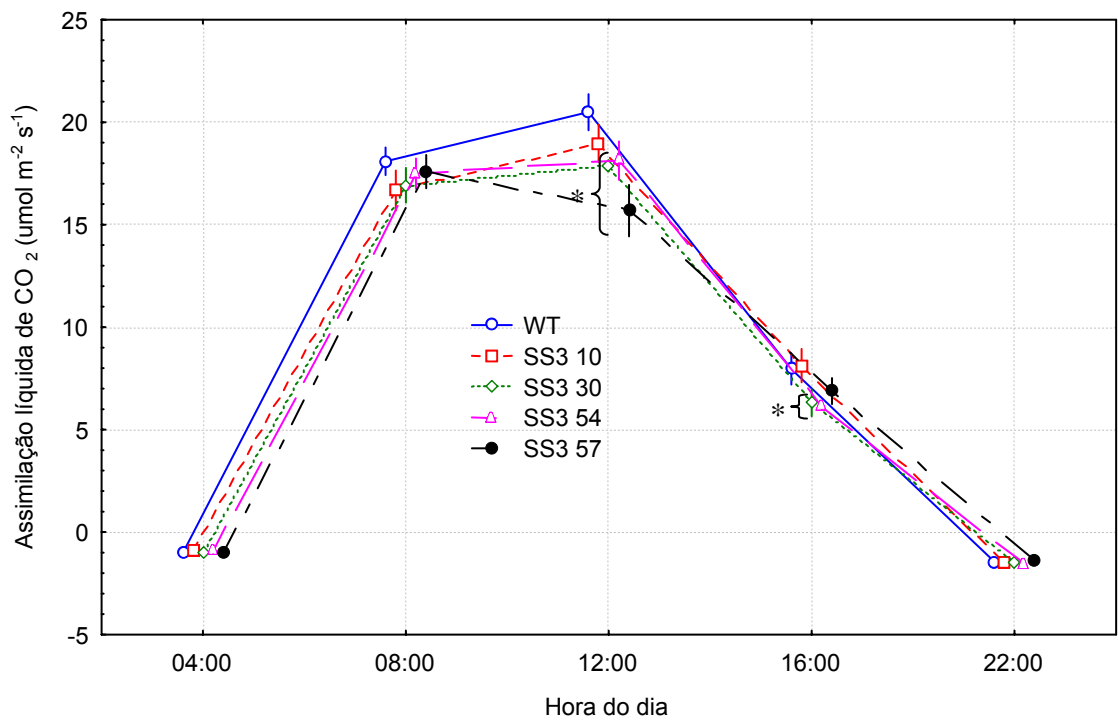


Figura 18: Curso diário da assimilação líquida de CO₂ das plantas SS3 antisense e plantas não-transformadas (WT), aos 25 dias de idade. Para cada horário, os pontos foram ligeiramente deslocados horizontalmente, de modo a facilitar a visualização das linhas verticais, que representam o erro padrão da média. n = 5. Dentro de um mesmo horário, médias (pontos) precedidas de chaves e asterisco diferem significativamente ($P < 0,05$; teste de Duncan) em relação às das plantas-controle – WT

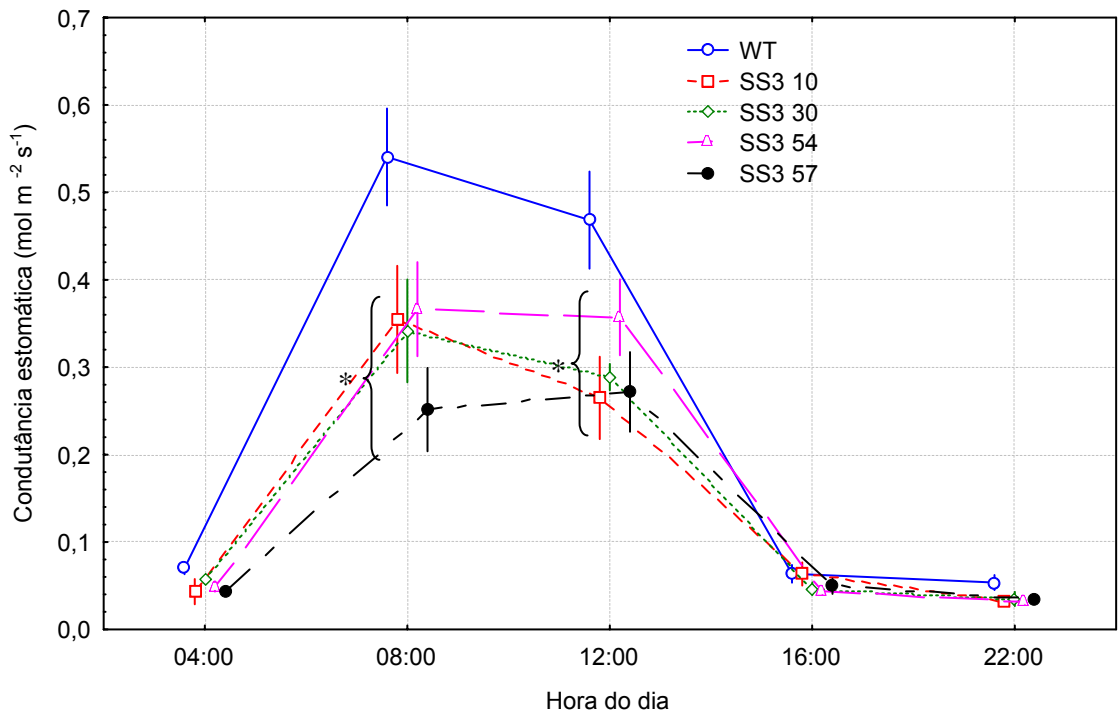


Figura 19: Curso diário de condutância estomática das plantas SS3 antisense e plantas não-transformadas (WT), aos 25 dias de idade. Para cada horário, os pontos foram ligeiramente deslocados horizontalmente, de modo a facilitar a visualização das linhas verticais, que representam o erro padrão da média. n = 5. Dentro de um mesmo horário, médias (pontos) precedidas de chaves e asterisco diferem significativamente ($P < 0,05$; teste de Duncan) em relação às das plantas-controle – WT

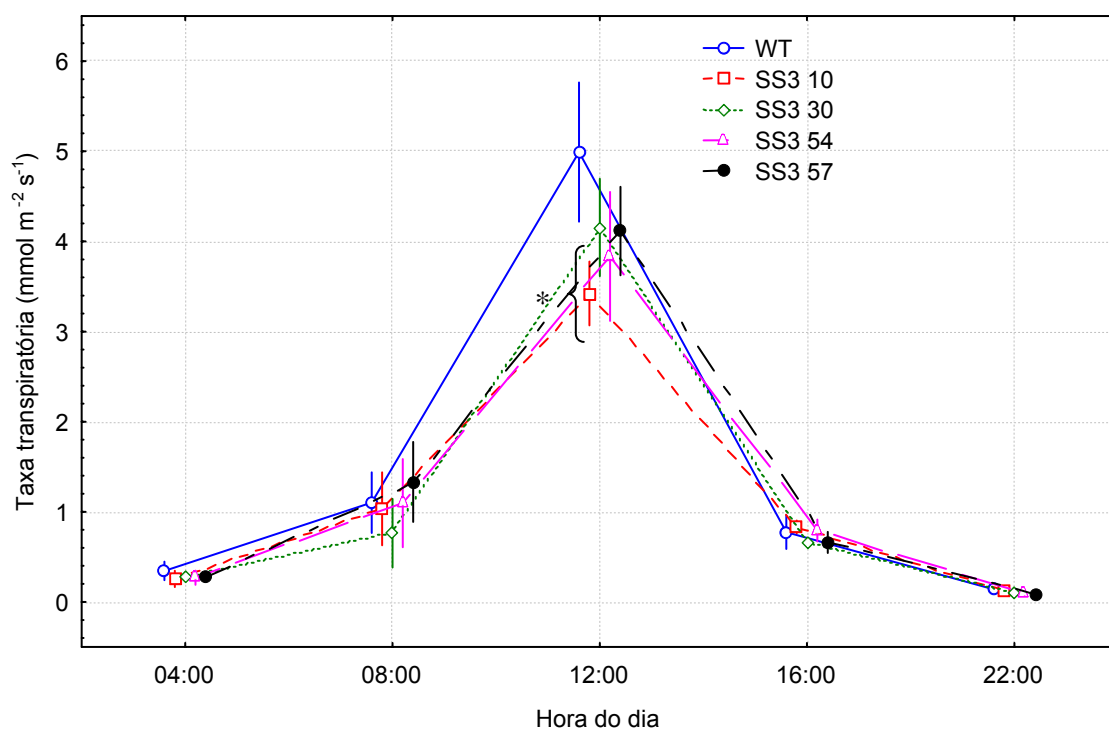


Figura 20: Curso diário da taxa transpiratória das plantas SS3 antisense e plantas não-transformadas (WT), aos 25 dias de idade. Para cada horário, os pontos foram ligeiramente deslocados horizontalmente, de modo a facilitar a visualização das linhas verticais, que representam o erro padrão da média. $n = 5$. Dentro de um mesmo horário, médias (pontos) precedidas de chaves e asterisco diferem significativamente ($P < 0,05$; teste de Duncan) em relação às das plantas-controle – WT

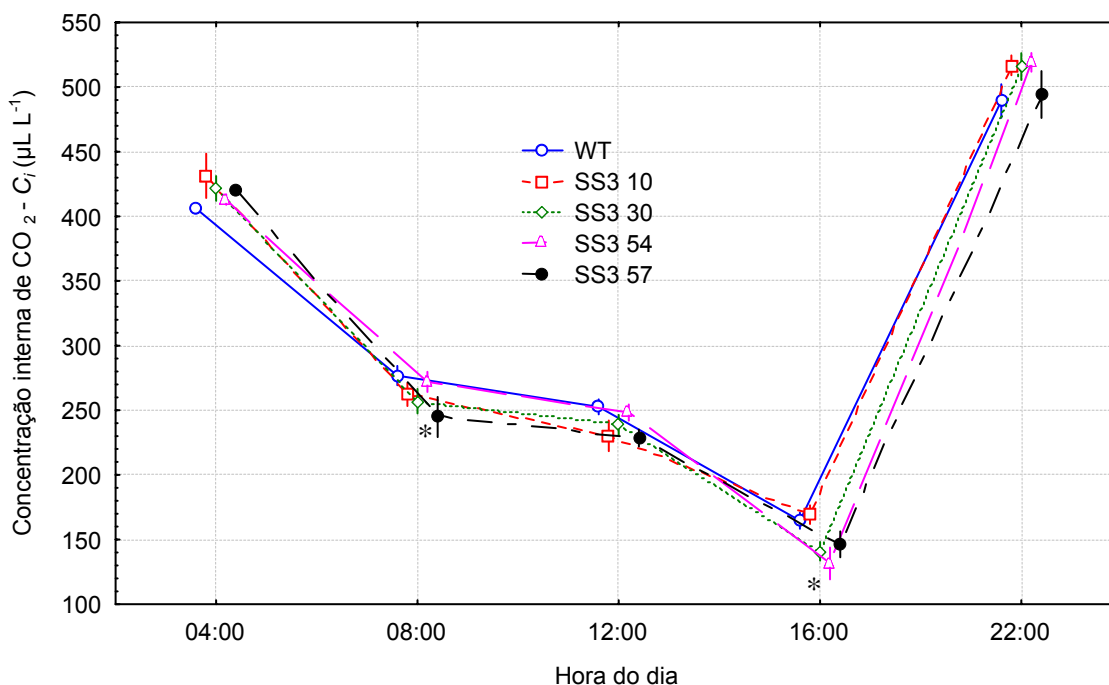


Figura 21: Curso diário da concentração de CO₂ na câmara sub-estomática das plantas SS3 antisense e plantas não-transformadas (WT), aos 25 dias de idade. Para cada horário, os pontos foram ligeiramente deslocados horizontalmente, de modo a facilitar a visualização das linhas verticais, que representam o erro padrão da média. $n = 5$. Dentro de um mesmo horário, médias (pontos) precedidas de chaves e asterisco diferem significativamente ($P < 0,05$; teste de Duncan) em relação às das plantas-controle – WT

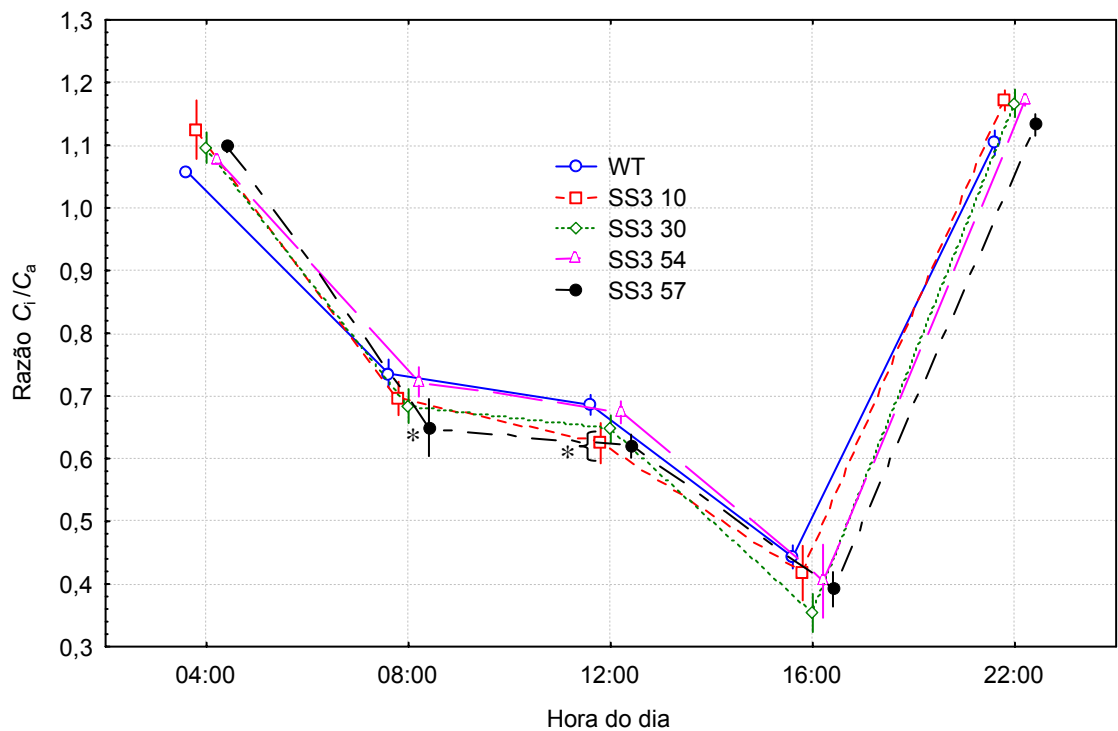


Figura 22: Curso diário das razões entre concentração de CO_2 na câmara sub-estomática e concentração de CO_2 ambiental das plantas SS3 antisense e plantas não-transformadas (WT), aos 25 dias de idade. Para cada horário, os pontos foram ligeiramente deslocados horizontalmente, de modo a facilitar a visualização das linhas verticais, que representam o erro padrão da média. $n = 5$. Dentro de um mesmo horário, médias (pontos) precedidas de chaves e asterisco diferem significativamente ($P < 0,05$; teste de Duncan) em relação às das plantas-controle – WT

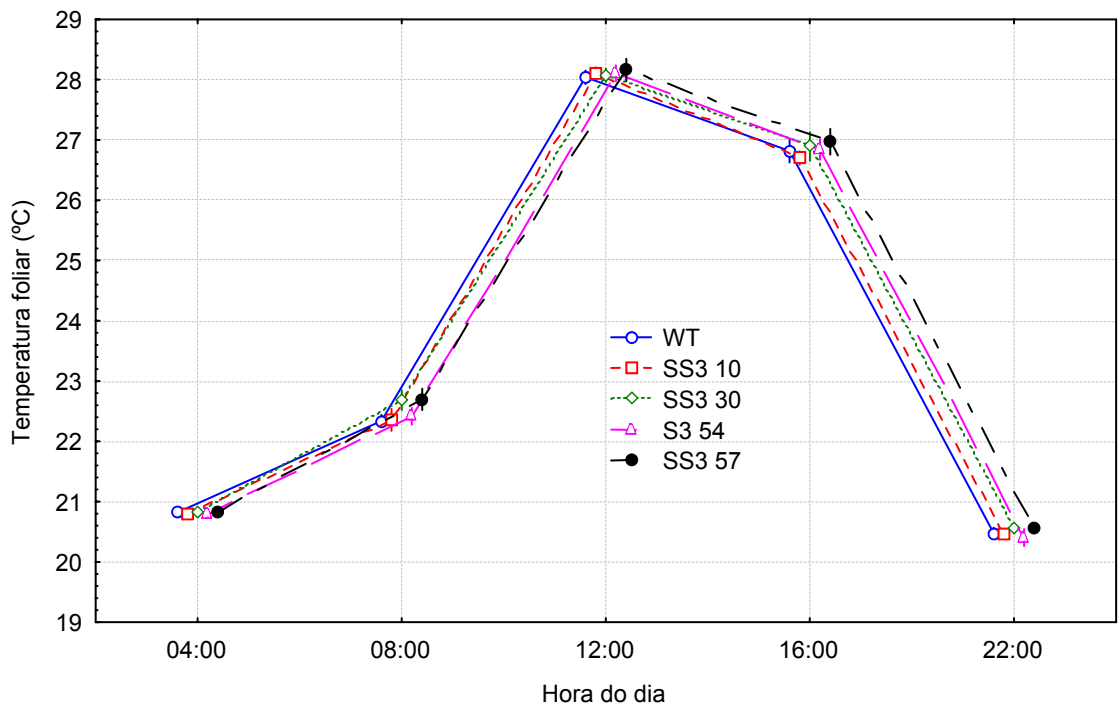


Figura 23: Curso diário das temperaturas foliares das plantas SS3 antisense e plantas não-transformadas (WT), aos 25 dias de idade. Para cada horário, os pontos foram ligeiramente deslocados horizontalmente, de modo a facilitar a visualização das linhas verticais, que representam o erro padrão da média. $n = 5$. Dentro de um mesmo horário, médias (pontos) precedidas de chaves e asterisco diferem significativamente ($P < 0,05$; teste de Duncan) em relação às das plantas-controle – WT

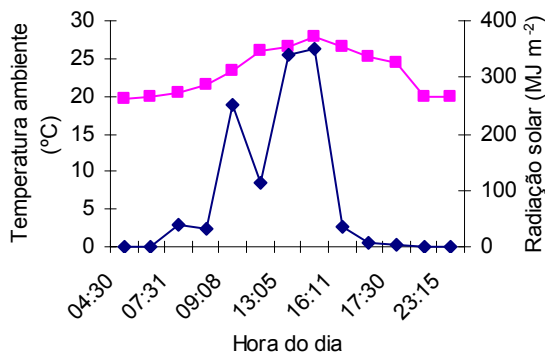


Figura 24: Curso diário da temperatura ambiente (róseo) e radiação solar (azul)

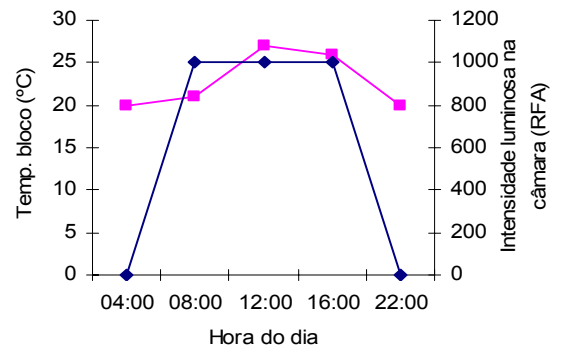


Figura 25: Curso diário da temperatura na câmara de medição das trocas gasosas (róseo) e radiação fotossinteticamente ativa aplicada (azul)

8.2 Plantas SS3 antisenso com 35 dias de idade

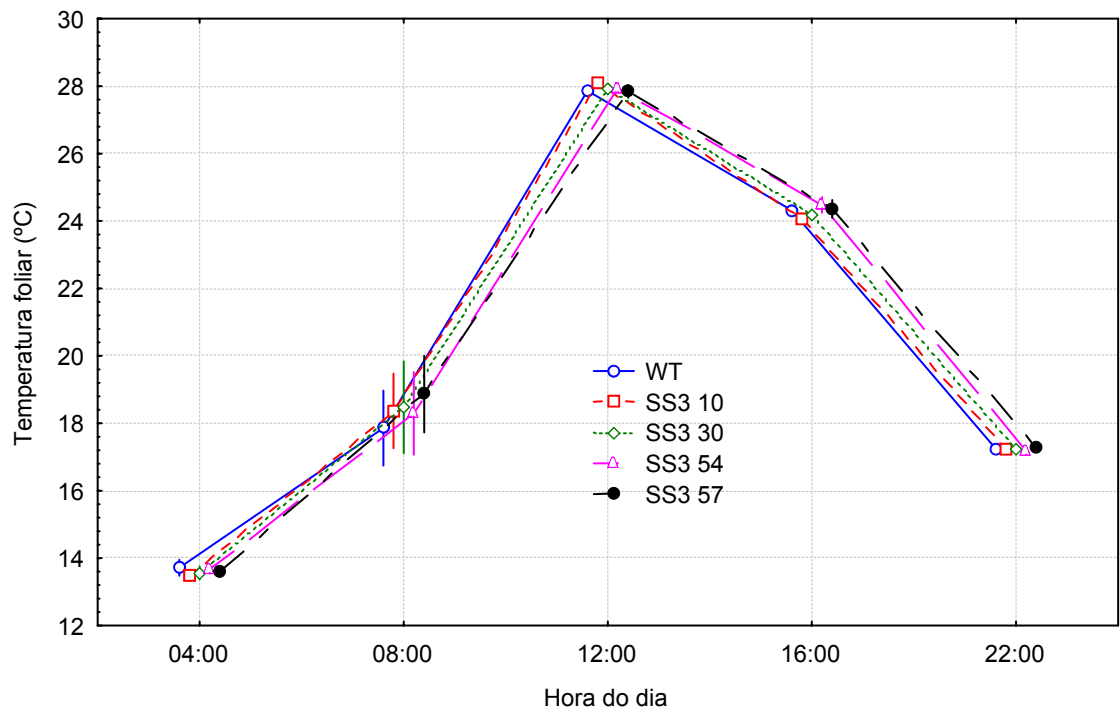


Figura 26: Curso diário das temperaturas foliares das plantas SS3 antisenso e plantas não-transformadas (WT), aos 35 dias de idade. Para cada horário, os pontos foram ligeiramente deslocados horizontalmente, de modo a facilitar a visualização das linhas verticais, que representam o erro padrão da média. $n = 5$. Dentro de um mesmo horário, médias (pontos) precedidas de chaves e asterisco diferem significativamente ($P < 0,05$; teste de Duncan) em relação às das plantas-controle – WT

8.3 Plantas SS3 antisenso com 55 dias de idade

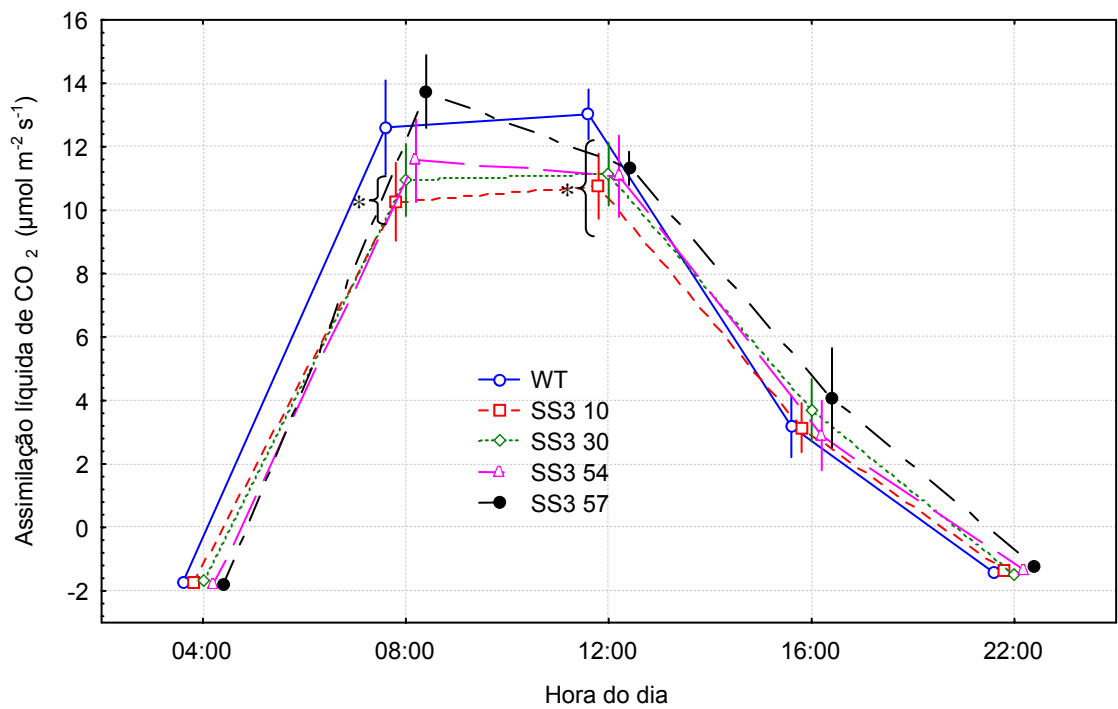


Figura 27: Curso diário da assimilação líquida de CO₂ das plantas SS3 antisense e plantas não-transformadas (WT), aos 55 dias de idade. Para cada horário, os pontos foram ligeiramente deslocados horizontalmente, de modo a facilitar a visualização das linhas verticais, que representam o erro padrão da média. n = 5. Dentro de um mesmo horário, médias (pontos) precedidas de chaves e asterisco diferem significativamente (P < 0,05; teste de Duncan) em relação às das plantas-controle – WT

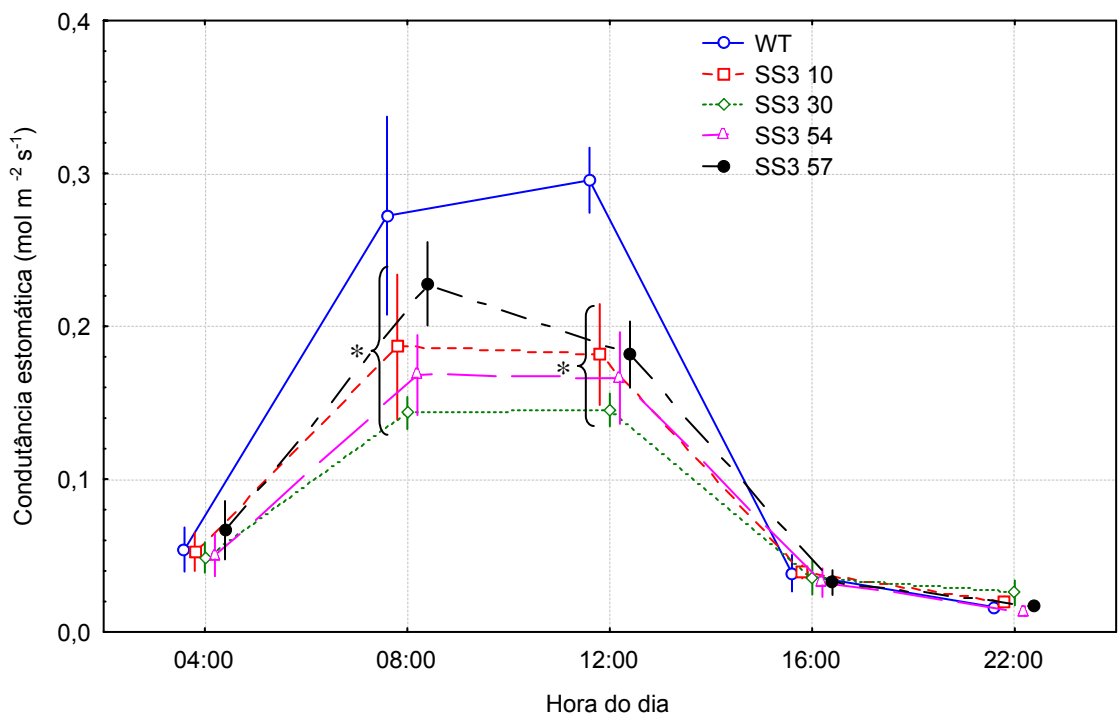


Figura 28: Curso diário da condutância estomática das plantas SS3 antisense e plantas não-transformadas (WT), aos 55 dias de idade. Para cada horário, os pontos foram ligeiramente deslocados horizontalmente, de modo a facilitar a visualização das linhas verticais, que representam o erro padrão da média. n = 5. Dentro de um mesmo horário, médias (pontos) precedidas de chaves e asterisco diferem significativamente (P < 0,05; teste de Duncan) em relação às das plantas-controle – WT

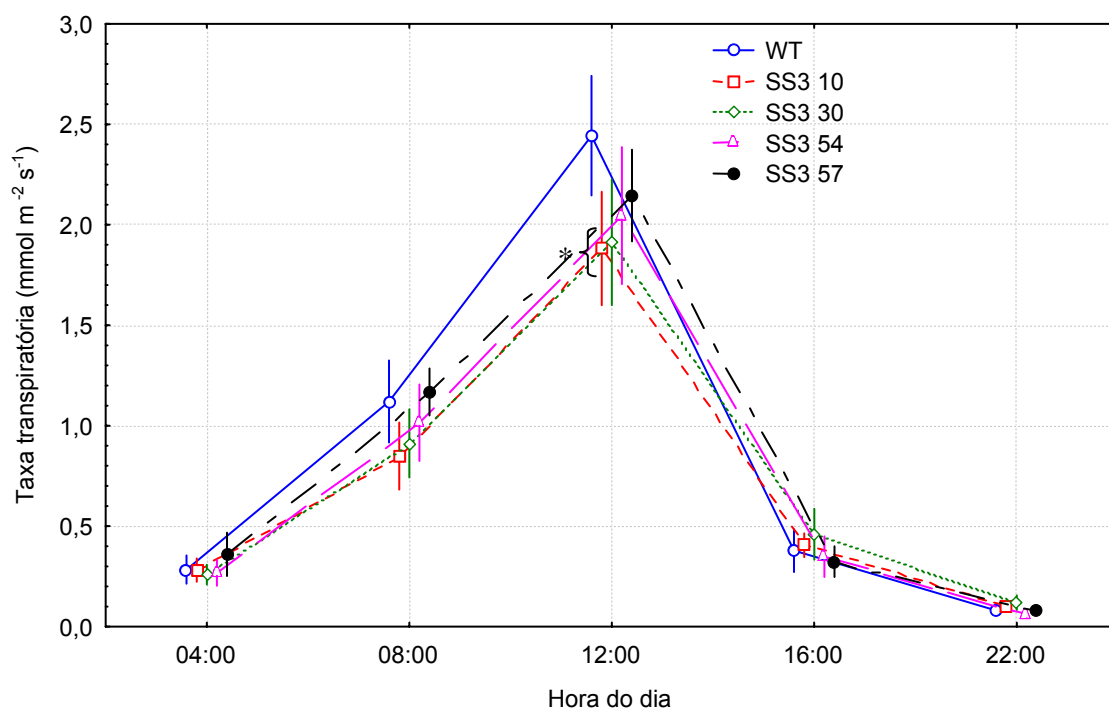


Figura 29: Curso diário da taxa transpiratória das plantas SS3 antisense e plantas não-transformadas (WT), aos 55 dias de idade. Para cada horário, os pontos foram ligeiramente deslocados horizontalmente, de modo a facilitar a visualização das linhas verticais, que representam o erro padrão da média. $n = 5$. Dentro de um mesmo horário, médias (pontos) precedidas de chaves e asterisco diferem significativamente ($P < 0,05$; teste de Duncan) em relação às das plantas-controle – WT

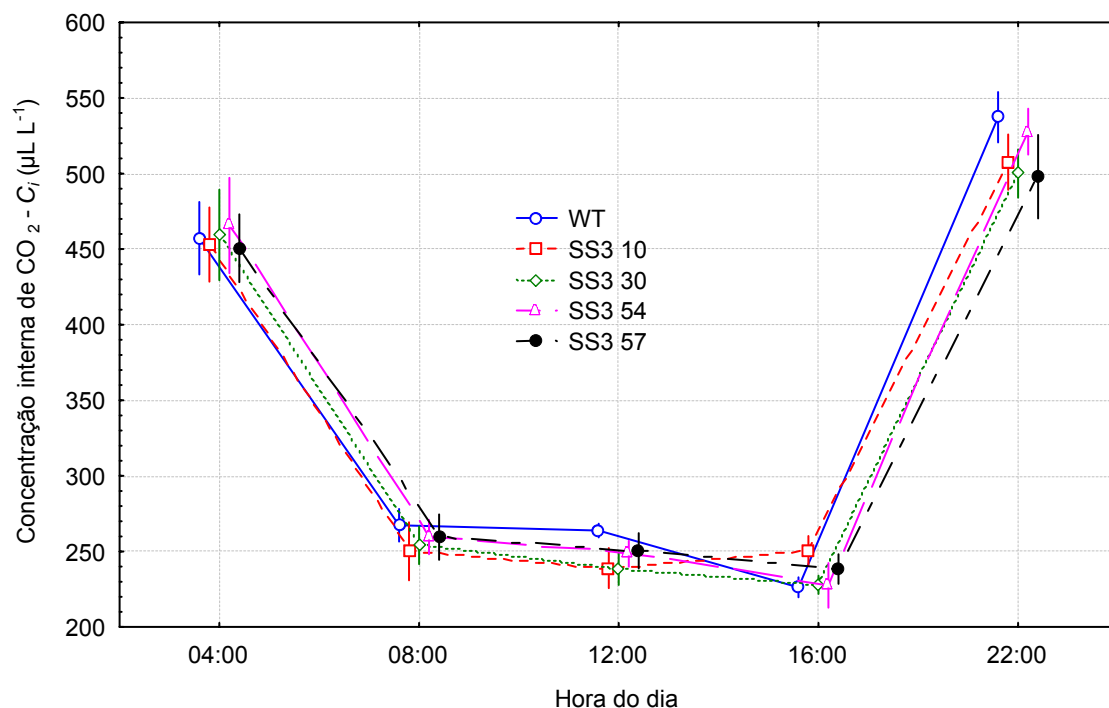


Figura 30: Curso diário da concentração de CO₂ na câmara sub-estomática das plantas SS3 antisense e plantas não-transformadas (WT), aos 55 dias de idade. Para cada horário, os pontos foram ligeiramente deslocados horizontalmente, de modo a facilitar a visualização das linhas verticais, que representam o erro padrão da média. $n = 5$. Dentro de um mesmo horário, médias (pontos) precedidas de chaves e asterisco diferem significativamente ($P < 0,05$; teste de Duncan) em relação às das plantas-controle – WT

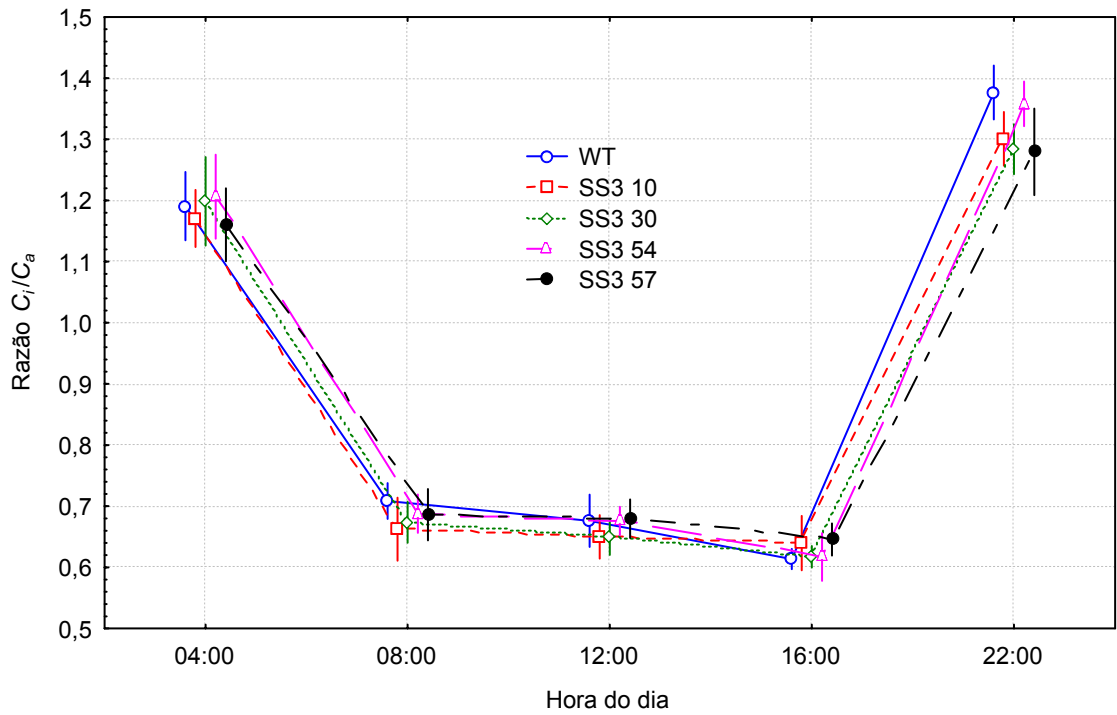


Figura 31: Curso diário das razões entre concentração de CO_2 na câmara sub-estomática (C_i) e concentração de CO_2 ambiental (C_a) das plantas SS3 antisense e plantas não-transformadas (WT), aos 55 dias de idade. Para cada horário, os pontos foram ligeiramente deslocados horizontalmente, de modo a facilitar a visualização das linhas verticais, que representam o erro padrão da média. $n = 5$. Dentro de um mesmo horário, médias (pontos) precedidas de chaves e asterisco diferem significativamente ($P < 0,05$; teste de Duncan) em relação às das plantas-controle – WT

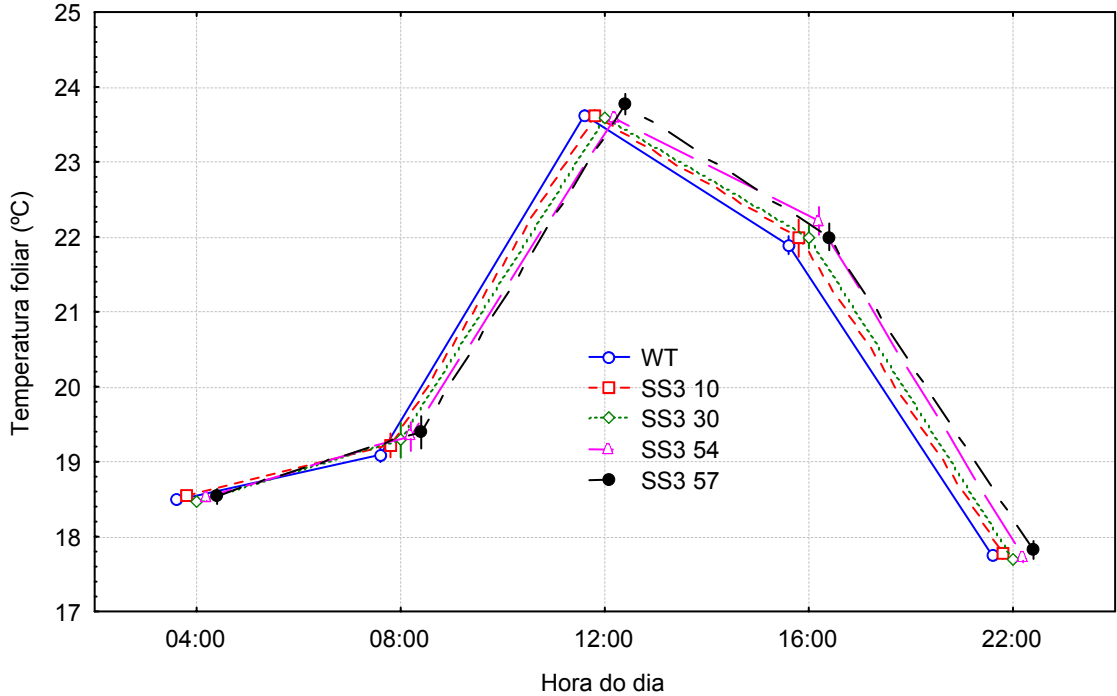


Figura 32: Curso diário das temperaturas foliares das plantas SS3 antisense e plantas não-transformadas (WT), aos 55 dias de idade. Para cada horário, os pontos foram ligeiramente deslocados horizontalmente, de modo a facilitar a visualização das linhas verticais, que representam o erro padrão da média. $n = 5$. Dentro de um mesmo horário, médias (pontos) precedidas de chaves e asterisco diferem significativamente ($P < 0,05$; teste de Duncan) em relação às das plantas-controle – WT

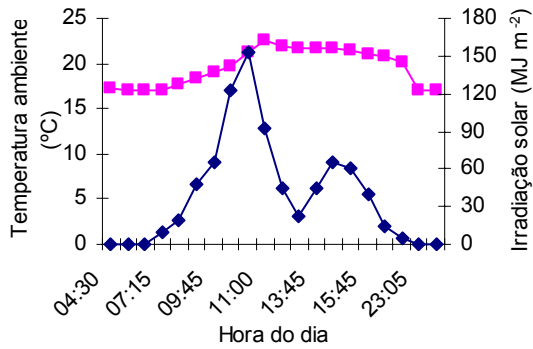


Figura 33: Curso diário da temperatura ambiente (róseo) e radiação solar (azul)

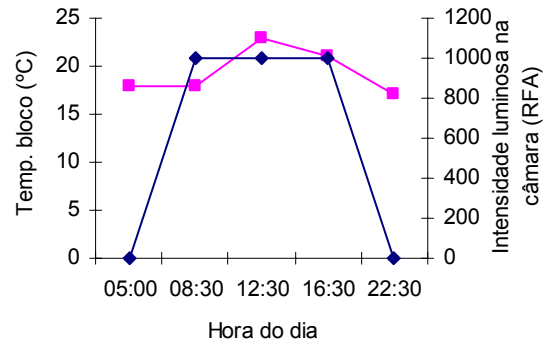


Figura 34: Curso diário da temperatura na câmara de medição das trocas gasosas (róseo) e radiação fotossinteticamente ativa aplicada (azul)

8.4 Curva de respostas fotossintéticas à luz

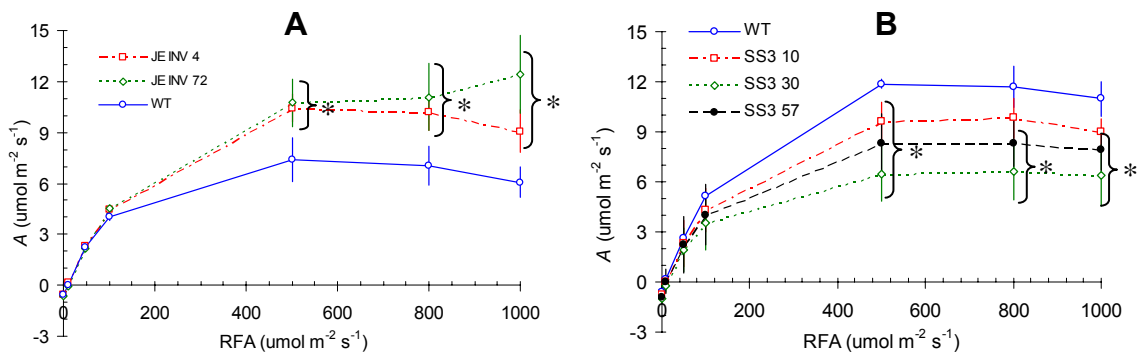


Figura 35: Curva de assimilação líquida de CO₂ (A) em função da intensidade de radiação fotossinteticamente ativa (RFA). **A** Plantas com superexpressão da invertase nas células-guarda (JE INV) e plantas não-transformadas (WT); **B** Plantas antisense da SuSy 3 (SS3) e plantas não-transformadas (WT). Chaves e asterisco diferem significativamente (P < 0,05; teste de Duncan) em relação às plantas-controle – WT

4 CAPÍTULO II

Metabolismo do carbono em plantas de batata com expressão alterada da sintase da sacarose e da invertase

1	RESUMO	43
2	ABSTRACT	44
3	INTRODUÇÃO	45
4	MATERIAL E MÉTODOS	47
	4.1 Material vegetal	47
	4.2 Condições de cultivo	48
	4.3 Experimentos.....	48
	4.3.1 Delineamento experimental.....	48
	4.3.2 Avaliações metabólicas	48
	4.3.2.1 Sacarose, glicose, frutose e amido.....	48
	4.3.2.2 Metabólitos glicolíticos.....	49
	4.3.2.3 Fluxo metabólico em folhas	50
	4.3.2.4 Preparo dos extratos enzimáticos	51
	4.3.2.5 Sintase da sacarose	51
	4.3.2.6 Invertases ácidas.....	52
	4.3.2.7 Sintase da sacarose-fosfato	52
	4.3.2.8 Pirofosforilase da ADP-glicose	53
	4.3.2.9 Bisfosfatase da frutose-1,6-P ₂	53
	4.3.2.10 Proteína nos extratos enzimáticos.....	53
	4.3.2.11 Celulose e outros componentes da parede celular em folhas.....	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
	5.1 Metabolismo do carbono em folhas das plantas SS3 antisenso	54
	5.2 Determinação dos fluxos metabólicos em folhas das plantas SS3 antisenso...	62
	5.3 Composição da parede celular das plantas SS3 antisenso	62
	5.4 Metabolismo de carbono em plantas JE INV	63
	5.5 Determinação dos fluxos metabólicos em plantas JE INV	67
6	CONCLUSÕES	68
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

METABOLISMO DO CARBONO EM PLANTAS DE BATATA COM EXPRESSÃO ALTERADA DA SINTASE DA SACAROSE E DA INVERTASE

Palavras-chave: açúcares, batata, folhas, metabolismo, sintase da sacarose

1 RESUMO

Fenótipos bioquímicos de plantas transgênicas antisense de batata (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée) para o gene da isoforma 3 da sintase da sacarose (SuSy 3), sob controle do promotor constitutivo CaMV 35S, e plantas com superexpressão do gene da invertase de levedura sob controle do promotor S1Δ4, exclusivo no citossol das células-guarda foram examinadas na tentativa de elucidar-se o papel fisiológico daquela isoforma; além disso, procurou-se testar a hipótese de que mudanças no comportamento estomático poderiam ser explicadas por outras alterações no metabolismo da folha. As plantas SuSy 3 antisense apresentaram aumentos na atividade da sintase da sacarose-fosfato (SPS) e pirofosforilase da ADP-glicose (AGPase), e um decréscimo na atividade da SuSy e invertases ácidas, refletindo-se em aumentos nos teores de sacarose e amido nas folhas. Os aumentos nas atividades da SPS e da AGPase podem estar ligados à redução no teores de ortofosfato inorgânico. Não foram observadas mudanças significativas na composição da parede celular do limbo foliar. Por outro lado, nas plantas com superexpressão da invertase, não houve mudanças nas atividades enzimáticas e dos açúcares analisados foi observada. Ressalta-se um incremento nos teores do ácido 3-fosfoglicérico e hexoses-P. Analisando-se em conjunto, estes resultados suportam a hipótese de que mudanças em g_s foram principalmente devido a mudanças no metabolismo de sacarose, exclusivamente em CG. Não se obteve evidências, neste trabalho, de que a SuSy 3 possa estar envolvida significativamente na síntese de parede celular nas folhas.

METABOLIC CHANGES IN POTATO PLANTS WITH ALTERED SUCROSE-CLEAVING ENZYMES EXPRESSION

Key words: leaf, metabolism, potato, sucrose synthase, sugar

2 ABSTRACT

Biochemical phenotypes of transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée) expressing antisense SuSy 3 gene under constitutive CaMV 35S promoter's control and expressing yeast invertase in the cytosol of guard-cells, under the control of the S1Δ4 promoter, were examined. This study aimed further elucidate the physiological role of that isoform, as well as evaluate if changes in stomatal behavior in transgenic potato plants could be explained by other physiological alterations in leaf metabolism. SuSy 3 antisense plants showed increases in sucrose levels and sucrose-phosphate synthase (SPS) and ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) activities, and decreases in SuSy and acid invertase activities. The enzymatic changes reflected in increases in leaf sucrose and starch levels. The raise in SPS and AGPase activities could be linked to a reduction in inorganic orthophosphate content. No significant changes in the levels of cellulose or in cell-wall composition were observed. None of these changes in plants expressing yeast invertase were found, but a significant increase in phosphoglyceric acid and hexoses-P contents was observed. Taken together, these results support the hypothesis that changes in stomatal conductance were due mainly to changes in sucrose metabolism exclusively in GC; also no evidences for an important role of SuSy 3 isoform in cell-wall synthesis in leaves could be herein found.

3 INTRODUÇÃO

A sacarose desempenha um papel central no crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo considerada o produto final da fotossíntese e o principal carboidrato transportado a longas distâncias na maioria das plantas superiores. Os teores de sacarose, em última análise, são resultantes de um balanço entre a sua biossíntese, catalisada pela sintase da sacarose-fosfato (SPS) e pela sintase da sacarose (SuSy), e pelas taxas de exportação/importação e alocação, mediada pelas invertases e pela SuSy. A SuSy promove a clivagem reversível da sacarose e UDP em frutose e UDP-glicose (Geigenberger & Stitt, 1993), enquanto a clivagem promovida pelas invertases é essencialmente irreversível.

O papel central da SuSy na clivagem da sacarose tem sido baseado na correlação existente entre indução do acúmulo de amido em tecidos-dreno e a atividade e expressão gênica da SuSy (Zrenner *et al.*, 1995). No entanto, essa associação não tem sido encontrada para a acumulação de sacarose em colmos de cana-de-açúcar, que é primariamente regulada pela diferença nas atividades das invertases e da SPS (Zhu *et al.*, 1997; Rohwer & Botha, 2001).

A atividade da SuSy varia com o órgão considerado, sendo elevada em órgãos-dreno e baixa em órgãos-fonte, como folhas expandidas. O padrão da atividade da SuSy pode ser alterado, em função de estresses ambientais (e.g., hipoxia, seca e salinidade), sendo aumentada nessas condições, possivelmente, para suprir a demanda de ATP, pela clivagem da sacarose, por uma rota energeticamente mais favorável que a clivagem promovida pelas invertases (Bologa *et al.*, 2003).

Um papel importante proposto para a SuSy é a geração de precursores para a síntese da parede celular (UDP-glicose). No endosperma do mutante *sh1* de milho, uma degeneração celular precoce tem sido observada, imediatamente após a divisão celular e coincidente com o período de expansão celular, argumento utilizado para sustentar a suposição de que a SuSy teria um papel fundamental na síntese da parede celular (Salnikov *et al.*, 2001). Primeiramente, a inibição do promotor do gene *Sh1* por um inibidor da biossíntese de celulose foi associada à acumulação de UDP-glicose (Maas *et al.*, 1990; Chourei *et al.*, 1991). Em segundo lugar, foi observada atividade da SuSy próximo à membrana da célula da fibra do algodão, a qual é capaz de transformar sacarose marcada em celulose e calose (Amor *et al.*, 1995). Em terceiro lugar, um forte sinal associado à membrana plasmática de células de milho foi

observado para a isoforma SS2, em experimentos de imunolocalização (Carlson & Chourey, 1996).

A regulação da atividade da SuSy pode ser também importante na aclimação ao estresse hídrico. Um aumento no ciclo fútil da sacarose por ação da SPS e SuSy foi observado nessa condição, o que ocorre quando a diminuição da taxa de degradação e aumento na síntese resultam em aumento na concentração da sacarose nas células do tubérculo da batata, em que um decréscimo no potencial hídrico pode ajudar na retenção da água e na manutenção da turgescência celular (Geigenberger *et al.*, 1997).

Os mecanismos que regulam os processos de clivagem da sacarose são centrais no metabolismo do carbono em plantas (Kock, 2004). A SuSy está envolvida em diversas rotas metabólicas, *e.g.*, biossíntese de amido e de celulose, determinação da força-dreno e partição de carbono, bem como, presumivelmente, no carregamento do floema, apresentando, no entanto, alta plasticidade funcional. Nenhuma dessas funções pode ser atribuída, especificamente, a cada uma das três isoformas conhecidas da SuSy em batata, que são codificadas por diferentes genes e reguladas diferentemente (Winter & Huber, 2000).

Em batata, a SuSy 1, previamente caracterizada por Zrenner *et al.* (1995), mostra-se bastante expressa em tubérculos, e a redução na expressão específica dessa isoforma promoveu reduções nos teores de amido e aumento nos de glicose e frutose. A SuSy 2 tem sido muito pouco caracterizada, e a redução na atividade dessa isoforma não levou a modificações nos teores de amido em tubérculos ou em folhas, como também não afetou os componentes de parede celular. A atividade específica da SuSy 2 parece muito baixa porque, nem mesmo a atividade total da SuSy foi alterada, ou seja, nenhuma modificação metabólica foi caracterizada e sua função permanece, ainda, desconhecida (M.E. Loureiro & W.C. Antunes, resultados não publicados). A isoforma 3 da SuSy corresponde a até 70% da atividade total da SuSy em folhas expandidas de batata (Meyer, 2003). Além disso, a SuSy apresenta alta atividade em células-guarda (CG) quando comparada aos demais tipos celulares encontrados na folha (Hite *et al.*, 1993). Não obstante, sob seca, o aumento na expressão do gene SS3 não é proporcional em células mesofílicas e estomáticas, sendo fortemente aumentada em células-guarda (Kopka *et al.*, 1997). Isso sugere que a maior atividade da SuSy, em células-guarda, é devida especificamente à isoforma SuSy 3, embora a relevância fisiológica dessas diferenças de atividade e na expressão não tenham sido esclarecidas.

Pelo motivo de a isoforma Susy 3 apresentar maior expressão e atividade em folhas de batata, pretendeu-se examinar a partição de carbono em plantas com expressão reduzida dessa isoforma. Para tal, procedeu-se à avaliação dos teores de açúcares, amido, celulose e outros componentes de parede celular, atividades enzimáticas relativas ao metabolismo de sacarose, além de análise de fluxos metabólicos, em folhas de batata.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Foram utilizadas plantas de batata (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée) transgênicas com superexpressão da invertase de levedura das linhagens JE INV 4 e JE INV 72, sob controle do promotor S1Δ4 (Fig. 1) [fragmento de 0,3 kb da região 5'-proximal do promotor da sub-unidade maior da pirofosforilase da ADP-glicose (AGPase), denominado de S1Δ4], específico de CG (Müller-Röber *et al.*, 1994). As linhas nas quais foram avaliados os diversos parâmetros em relação ao metabolismo foliar e fisiologia das CG foram cedidas pelo Prof. Nicholas J. Provar (Universidade de Toronto, Canadá). Também foram analisadas, neste trabalho, plantas transgênicas de batata das linhagens SS3 10, SS3 30, SS3 54 e SS3 57 (linhagens antisense para a isoforma 3 da SuSy), previamente transformadas por Loureiro (1999), sob controle do promotor constitutivo CaMV 35S (Fig. 2). Como controle dos experimentos, foram usadas plantas de batata não-transformadas (WT) da mesma cultivar (Désirée).

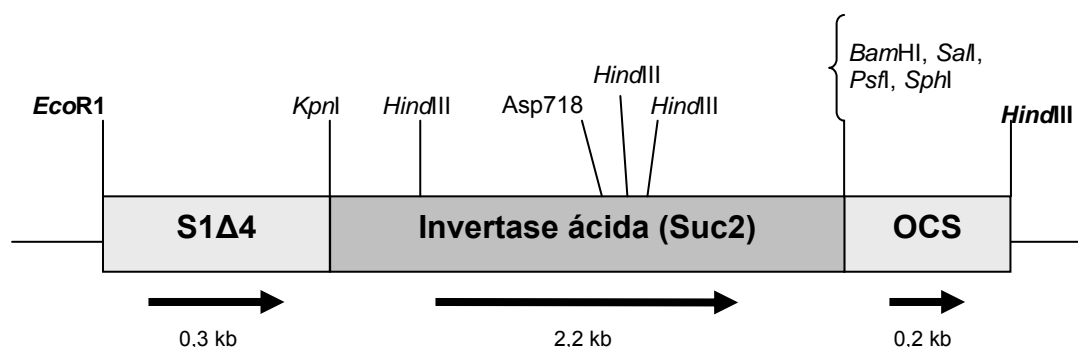


Figura 1: T-DNA usado na produção de plantas transgênicas expressando o gene da invertase ácida de levedura Suc2 (senso) no citossol de células-guarda (Provar, 1996)

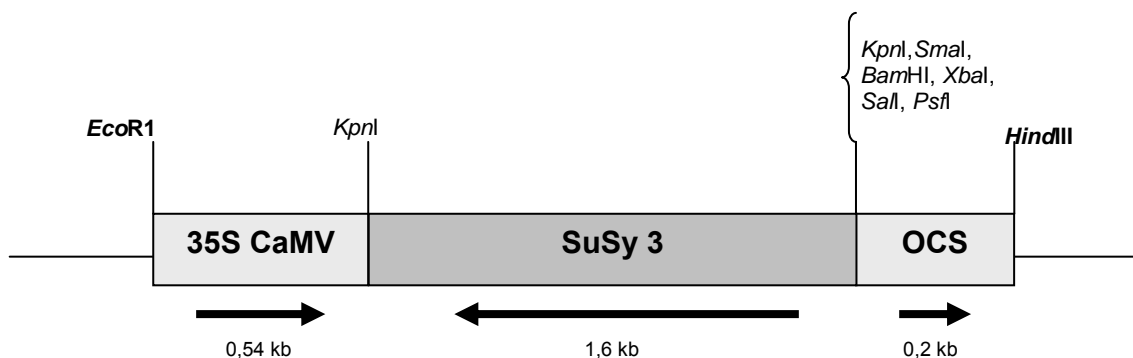


Figura 2: T-DNA usado na produção de plantas transgênicas expressando o gene da sintase da sacarose de batata, SuSy 3 (antisense) (Loureiro, 1999)

4.2 Condições de cultivo

Plantas, originadas de tubérculos com cerca de 20 g, foram cultivadas em vasos plásticos preenchidos com mistura de 5 dm³ de três partes de solo, duas de areia e uma de esterco bovino curtido e adubação necessária, à base de NPK. A irrigação era realizada, de maneira a manter a umidade do solo próxima à capacidade do vaso.

4.3 Experimentos

4.3.1 Delineamento experimental

O experimento com as plantas SS3 antisense consistiu de fatorial 5 x 5, sendo cinco genótipos de batata (um controle não-transformado e quatro linhas transgênicas) e cinco horários de avaliação, com cinco repetições. O delineamento experimental foi em blocos completamente casualizados. A unidade experimental foi composta de uma planta por vaso. O mesmo esquema foi adotado para avaliarem-se plantas JE INV, utilizando-se apenas três genótipos de batata. As análises estatísticas foram feitas por meio do uso do "software" Statistica (StatSoft Inc. 2001), considerando-se significativas as diferenças a $P < 0,05$ (teste de Duncan).

4.3.2 Avaliações metabólicas

4.3.2.1 Sacarose, glicose, frutose e amido

Durante intervalos regulares ao longo do dia (04:00h, 08:00h, 12:00h, 16:00h, 20:00h e 24:00h), foram coletadas amostras de discos foliares, de folhas jovens e

completamente expandidas, os quais foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C, para posterior avaliação de atividade de algumas enzimas e de alguns metabólitos do metabolismo de carboidratos.

A extração de açúcares foi feita de acordo com Trethewey *et al.* (1998). Cerca de 120 mg de tecido foliar (massa fresca) foi macerado em 500 µL de etanol a 80%, posteriormente, lavado com mais 500 µL de etanol a 80%, e mantido em banho-maria por 60 min, a 70 °C. Em seguida, o homogenato foi centrifugado por 10 min, a 13.000 g. A fração solúvel foi armazenada para determinação dos teores de glicose, frutose, sacarose. O sedimento da extração de açúcares foi utilizado para a extração do amido. Inicialmente, o resíduo foi lavado três vezes com etanol a 80% e, posteriormente, hidrolisado com 400 µL de KOH 0,2 N, por 90 min, a 95 °C. Em seguida, foram acrescentados 70 µL de ácido acético 1 N e centrifugado por 10 min, a 13.000 g. A fração solúvel correspondeu ao amido presente na amostra.

A determinação de glicose, frutose e sacarose, foi feita conforme Stitt *et al.* (1989). Resumidamente, uma alíquota do extrato etanólico foi usada em “Tampão A” (Imidazol 100 mM (pH 6,9); MgCl₂ 5 mM; NAD⁺ 2 mM; ATP 1 mM), contendo, ainda, 2 U mL⁻¹ de desidrogenase da glicose-6-fosfato, em volume final de 300 µL. A reação foi registrada continuamente em leitor de ELISA (ELISA Versamax, Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia EUA), a 340 nm, por cerca de 5 min, sendo então acrescentado 0,2 U reação⁻¹ de hexocinase, para a determinação da glicose. Depois de estabilizadas as leituras, foi adicionado 0,4 U reação⁻¹ de fosfoglicoisomerase, para determinação da frutose. Por último, a essa reação foram acrescentados 2 U de invertase (β-frutosidase), para a determinação dos teores de sacarose. A amostra-controle (branco) foi composta por uma solução de etanol a 80%, em substituição ao extrato.

Para determinação dos teores de amido, uma alíquota do extrato de amido foi incubada por 60 min, a 55 °C, com 30 µL de tampão citrato 300 mM (pH 4,6) e 2U reação⁻¹ de amiloglicosidase, num volume final de 300 µL. Alíquota da primeira reação (digestão do amido e liberação de glicose) foi usada para determinação de glicose equivalente.

4.3.2.2 Metabólitos glicolíticos

Os metabólitos glicolíticos analisados foram: glicose-6-fosfato (G6P), frutose-6-fosfato (F6P), glicose-1-fosfato (G1P), ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA), e ortofosfato inorgânico (Pi). Foram todos extraídos conforme Jelitto *et al.* (1992). Cerca de 500 mg de massa fresca do material coletado às 12:00h foi macerado em almofariz preenchido

com N₂ líquido. Após pulverização do material vegetal, foram acrescentados 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 16% (p/v), em éter dietílico, e deixado em gelo por cerca de 20 min, sendo, então, acrescentados 800 µL de solução aquosa a 16% TCA com EGTA 5 mM. O homogenato foi, então, transferido para microtubos de centrifuga e deixados em gelo, por 3h. Depois de completada a extração em gelo, as amostras foram centrifugadas por 5 min, a 13.000 g, aproveitando-se somente a fase aquosa, que foi transferida para outro microtubo. O sobrenadante foi posteriormente lavado três vezes com 1 mL de éter dietílico saturado em água, para removerem-se contaminações de caráter apolar. Todo o material usado na extração foi previamente lavado com HCl 2 M e exaustivamente enxaguado com água destilada e desionizada, para evitar-se contaminações com Pi. O branco foi feito seguindo-se todos os passos, excluindo-se a amostra. A determinação dos teores de G6P, F6P e G1P foi efetuada pelo método cíclico, conforme Gibon *et al.*, (2002); 3-PGA, conforme Stitt *et al.*, (1989); e Pi, segundo Penney (1976). Os teores de ATP, ADP, UTP, UDP e UDP-glicose foram determinados em cromatografia líquida de alta resolução (Regierer *et al.*, 2002), no Instituto Max Planck de Fisiologia Molecular de Plantas, Golm, Alemanha.

4.3.2.3 Fluxo metabólico em folhas

A análise de fluxo metabólico foi feita por meio de incorporação de ¹⁴CO₂ em discos foliares (Lytovchenko *et al.*, 2002). Resumidamente, a 400 µL de solução de NaH¹⁴CO₃ (100 Bq µL⁻¹) foram adicionados 10 µL de anidrase carbônica (0,5 U µL⁻¹), num eletrodo de oxigênio tipo Clark, no qual estavam acondicionados discos foliares das plantas em estudo. O eletrodo foi imediatamente vedado e os discos foliares foram mantidos sob iluminação saturante de 1300 µmol m⁻² s⁻¹ de radiação fotossinteticamente ativa (RFA). Após 30 min de exposição, a 30 °C, os discos foram imediatamente congelados em N₂ líquido e mantidos a -80 °C, até o fracionamento do tecido. Foi separada a fração insolúvel em etanol (amido e celulose) da fração solúvel, a qual, então, foi fracionada em resinas catiônica (DOWEX® 50 WXZ 100-200 mesh, HF form – Supelco) e aniônica (LOWEX® 1X2 100-200 mesh, CL Form – Supelco), sucessivamente, para separação das frações ácida (ácidos orgânicos), básica (aminoácidos) e neutra (açúcares). A extração dos compostos solúveis em etanol se deu por incubações com 1 mL de etanol, em diferentes diluições (80%, 50%, 20%, água destilada, 80%, respectivamente), por 10 min, em banho-maria, a 100 °C, em tubos vedados. Todas as amostras foram combinadas e concentradas por liofilização. A radioatividade incorporada nas diferentes frações foi determinada num cintilador

(Beckman LS 6500, Beckman Instruments, Fullerton, Califórnia, EUA), usando-se líquido de cintilação (Ready Safe™ Cocktail) em proporção sugerida pelo fabricante.

4.3.2.4 *Preparo dos extratos enzimáticos*

Para determinação de atividades enzimáticas, discos foliares previamente congelados (180-200 mg de massa fresca) foram preparados e dessalinizados de acordo com Stitt *et al.* (1989). Os extratos enzimáticos para a sintase da sacarose (SuSy; EC 2.4.1.13); invertase ácida (EC 3.2.1.26); sintase da sacarose-fosfato (SPS; EC 2.4.1.14); pirofosforilase da ADP-glicose (AGPase; EC: 2.7.7.27) e bisfosfatase da frutose-1,6-P₂ (FBPase; EC: 3.1.3.11) foram preparados em tampão de extração contendo: [Hepes-KOH 50 mM (pH 7,4); MgCl₂ 5 mM; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; β-mercaptoetanol 10 mM; benzamidina 2 mM; ácido ε-amino-n-capróico 2 mM; fenilmetilsulfonilfluoreto - PMSF 0,5 mM (dissolvido em dimetil-sulfóxido); glicerol 10% (v/v) e Triton® X-100 0,1% (v/v)]. O homogenato foi centrifugado por 3 min, a 13.000 g, e o sobrenadante foi dessalinizado em coluna Sephadex G-25 (3,0 x 1,0 cm) pré-equilibrada com aquele tampão. Os extratos dessalinizados em colula 3,0 x 1,0 cm com gel Sephadex G-25 foram armazenados a -80 °C, até os ensaios. O volume de extrato usado na reação enzimática foi determinado de acordo com a linearidade da resposta ao volume de extrato e tempo da reação. As reações-controle (brancos) foram avaliadas com o extrato fervido por 3 min, em substituição ao extrato nativo.

4.3.2.5 *Sintase da sacarose*

A atividade da SuSy foi determinada em uma reação acoplada na direção da degradação da sacarose, pela medição da quantidade de UDP-glicose liberada (Zrenner *et al.*, 1995), a 30 °C, e registrada a 340 nm, em microplaca, em um leitor de ELISA.

Na primeira reação (reação específica – degradação de sacarose e formação de UDPG), a mistura de reação (100 µL) consistiu de tampão contendo Hepes-KOH 20 mM (pH 7,0); sacarose 400 mM e UDP 4 mM, a uma temperatura de incubação de 30 °C. A reação foi interrompida por incubação, em banho-maria, a 100 °C, por 3 min. A segunda reação (determinação da concentração de UDPG) foi realizada em um volume de reação de 300 µL, contendo tampão glicina 200 mM (pH 8,9), MgCl₂ 5 mM e NAD⁺ 2 mM. A reação foi iniciada pela adição da desidrogenase de UDP-glicose, à quantidade final de 0,005 U por reação.

4.3.2.6 Invertases ácidas

As atividades dessas enzimas foram determinadas em reações acopladas na direção da degradação da sacarose, pela medição da quantidade de glicose liberada (modificado de Geigenberger & Stitt, 1993; Zrenner *et al.*, 1995).

Para determinação da atividade da invertase ácida, a mistura de reação (100 μ L) continha tampão acetato de sódio 100 mM (pH 4,6) e sacarose 100 mM. A reação foi iniciada pela adição do extrato, mantida em banho-maria, por 60 min, a 37 °C, e interrompida por adição de 10 μ L de tampão fosfato de sódio 1M (pH 7,2) e, em seguida, por colocação em água fervente, por 3 min. Para determinação dos teores da glicose liberada, utilizou-se o método anteriormente descrito (4.3.2.1)

4.3.2.7 Sintase da sacarose-fosfato

A atividade máxima (V_{max}) da SPS foi determinada segundo Huber *et al.* (1989), na direção de formação de sacarose-fosfato, em um volume final de reação de 70 μ L. A mistura de reação consistiu de uma alíquota de extrato dessalinizado em um tampão de reação contendo como concentração final HEPES-NaOH 50 mM (pH 7,4); $MgCl_2$ 12 mM; ditiotreitól 1 mM; UDP-glicose 6 mM; F6P 12 mM, e G6P 36 mM. A reação foi iniciada pela adição do extrato enzimático, mantida em temperatura de 25 °C, por 60 min, e paralisada com 70 μ L de KOH a 30% (p/v); em seguida, a mistura foi fervida em banho-maria, por 10 min. Posteriormente, foi adicionado 1,0 mL de uma solução de H_2SO_4 28 N, com antrona a 0,14%, prosseguindo-se a reação por 20 min, a 40 °C, determinando-se, então, a absorvância, a 620 nm.

A atividade seletiva (V_{sel}) da SPS foi determinada de forma semelhante à V_{max} , à exceção de que foram utilizadas concentrações finais de F6P, G6P de 2, 6 e Pi 5 mM, respectivamente.

O branco foi determinado da mesma forma que o V_{max} , excluindo-se F6P e G6P. As absorvâncias foram corrigidas seguindo curva de calibração, com 70 μ L em concentrações crescentes de sacarose, variando de 0 a 1000 μ M, em substituição à mistura de reação.

4.3.2.8 Pirofosforilase da ADP-glicose

A atividade da AGPase foi determinada na direção da formação de G1P, em reação acoplada à redução do NAD⁺ em microplaca de ELISA, e acompanhada continuamente a 340 nm. O método foi modificado de Müller-Röber *et al.* (1992), com a seguinte composição final: HEPES-NAOH 80 mM (pH 7,4); MgCl₂ 10 mM; glicose-1,6-bisfosfato 10 μM; 3-PGA 10 mM; ditiotreitol 3 mM; NAD⁺ 1,0 mM; ADP-glicose 1 mM; NaF 10 mM; fosfoglicomutase (PGM) 1 U mL⁻¹; e desidrogenase da G6P (*Leuconostoc mesenteroides*) 2,5 U mL⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de pirofosfato de sódio, à concentração final de 2 mM.

4.3.2.9 Bisfosfatase da frutose-1,6-bisfosfato

A atividade da FBPase foi determinada na direção da formação de F6P, em microplaca de ELISA, em volume final de 300 μL, e acompanhada continuamente a 340 nm, conforme Kruger & Beevers (1984). O tampão de reação foi composto de HEPES-NAOH 20 mM (pH 7,0); MgCl₂ 5 mM; NAD⁺ 0,5 mM; fosfoglicoisomerase (PGI) 0,25 U mL⁻¹; desidrogenase da G6P 0,25 U mL⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de frutose-1,6-P₂, à concentração final de 5,0 mM.

4.3.2.10 Proteína nos extratos enzimáticos

Foi utilizado o método de Bradford (1976) para determinação do teor de proteína nos extratos, com curva de calibração com albumina sérica bovina (BSA) para conversão da absorvância em teor de proteína.

4.3.2.11 Celulose e outros componentes da parede celular em folhas

Cerca de três folhas completamente expandidas foram liofilizadas e trituradas em nitrogênio líquido em um micro-homogenizador. A parede celular foi removida de contaminantes (amido) por meio de extração com dimetil sulfóxido, seguida por duas extrações em mistura de metanol/clorofórmio/H₂O (14:4:3). Após isso, foi feita uma extração em metanol 10%, a 70 °C, seguida de mais duas extrações por 60 min, a 70 °C, em metanol 90%. O sedimento foi lavado quatro vezes com água (1 mL cada), eliminando-se o sobrenadante. O teor de celulose correspondeu à fração de carboidratos que permaneceu insolúvel após a digestão da fração insolúvel com

ácidos acético e nítrico (Updegraff, 1969). O teor de ácidos urônicos foi determinado pelo método de Blumenkrantz & Asboe Hansen (1973).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Metabolismo do carbono em folhas das plantas SS3 antisenso

Nas plantas SS3 antisenso, a expressão reduzida da isoforma SuSy 3 acarretou em menor atividade total da SuSy em folhas, tendo as plantas transformadas uma atividade residual de 25% a 62% da atividade encontrada nas plantas-controle (WT), dependendo da linhagem (Fig. 3). Nessas plantas, usou-se o promotor 35S, que é constitutivo, de forma que a redução na expressão do gene SS3 deve ter ocorrido em todos os órgãos. Contudo, a atividade total da SuSy, em um determinado órgão, pode ser o resultado da ação conjunta de várias isoformas dessa enzima, que são codificadas por diferentes genes e, assim, a expressão desses outros genes pode ou não ser afetada pelo efeito antisenso produzido.

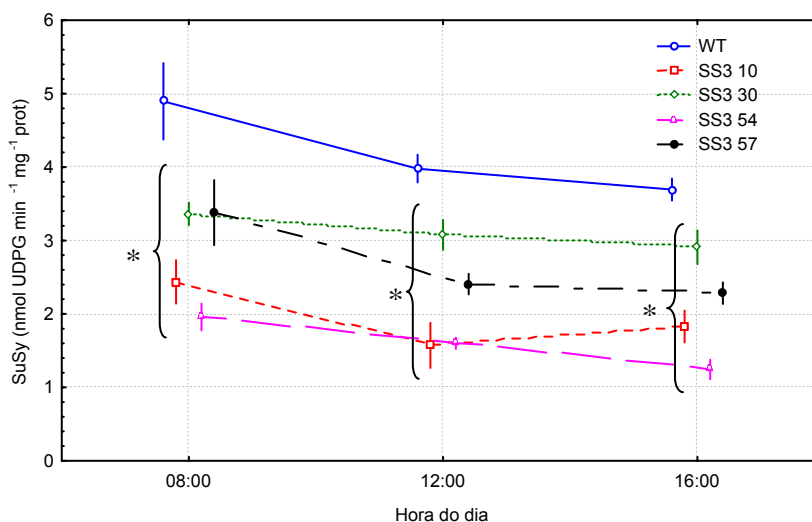


Figura 3: Curso diurno da atividade máxima da SuSy em folhas das plantas SS3 antisenso e plantas não-transformadas (WT). Em cada horário, os pontos foram ligeiramente deslocados horizontalmente, de modo a facilitar a visualização das linhas verticais, que representam o erro padrão da média. $n = 5$. Dentro de um mesmo horário, médias (pontos) precedidas de chaves e asterisco diferem significativamente ($P < 0,05$; teste de Duncan) em relação às das plantas-controle – WT

A redução na atividade da SuSy não afetou significativamente as concentrações de glicose e frutose (Fig. 4 e 5). Na linhagem SS3 30, às 12:00h, ocorreu uma redução nos teores de hexoses, ocorrendo em paralelo a um aumento de

sua taxa respiratória diurna (Tab.1), explicando, pelo menos em parte, a redução observada nos teores de glicose e frutose naquela linhagem. As razões para este aumento na respiração diurna permanecem, ainda, obscuros.

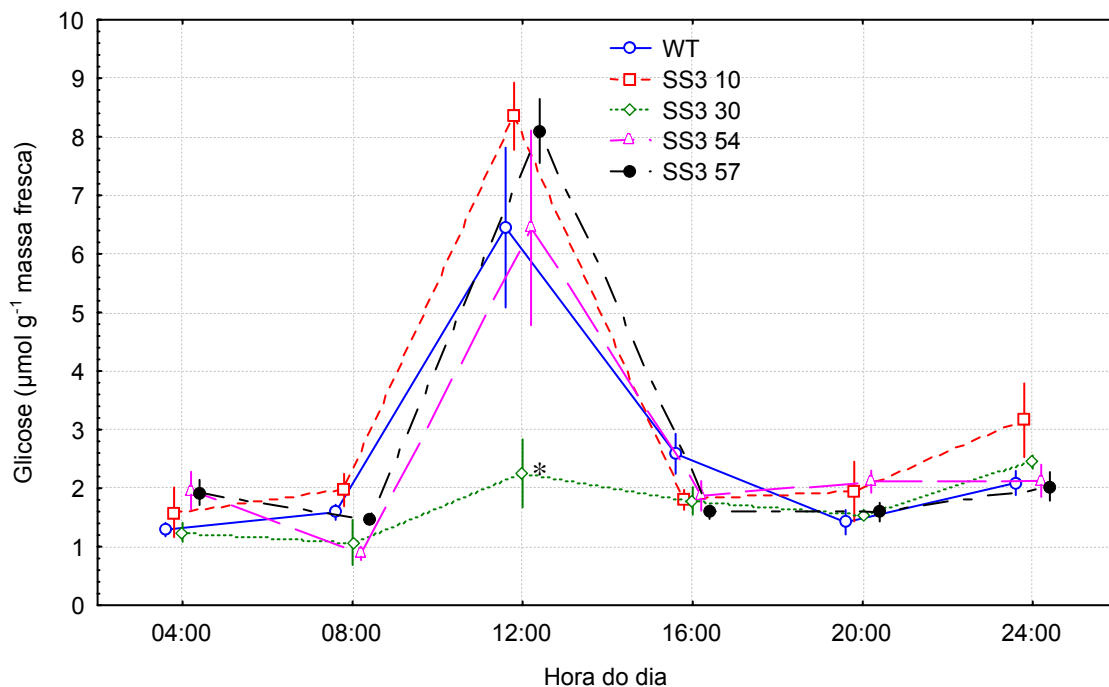


Figura 4: Curso diário da concentração de glicose em folhas das plantas SS3 antisense e plantas não-transformadas (WT). Para cada horário, os pontos foram ligeiramente deslocados horizontalmente, de modo a facilitar a visualização das linhas verticais, que representam o erro padrão da média. n = 5. Dentro de um mesmo horário, médias (pontos) precedidas de chaves e asterisco diferem significativamente ($P < 0,05$; teste de Duncan) em relação às das plantas-controle – WT

Tabela 1: Taxa de respiração diurna avaliada às 12:00 h das plantas SS3 antisense e plantas não-transformadas (WT). Dados são expressos em $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os resultados em **negrito e sublinhados** diferem significativamente ($P < 0,05$; teste de Duncan) em relação aos das plantas-controle – WT. Média +/- erro padrão da média. n = 5

	WT	SS3 10	SS3 30	SS3 57
Respiração	0,777 +/- 0,043	0,771 +/- 0,037	<u>1,133 +/- 0,070</u>	0,848 +/- 0,112

Aparentemente, os teores de glicose e frutose tenderam a manter-se em níveis relativamente constantes ao longo do dia, excetuando-se às 12:00 h, quando atingiu valores máximos, retornando aos níveis basais no final da tarde. Sabe-se que tanto os teores de glicose quanto os de frutose sofrem um controle homeostático fino com as suas formas fosforiladas, dependentes de uma série de outros metabólitos e enzimas, de forma a manter os teores de ATP constantes na célula (Tab. 2) (Plaxton, 1996; Noctor & Foyer, 1998, 2000; Scheibe *et al.*, 2005).

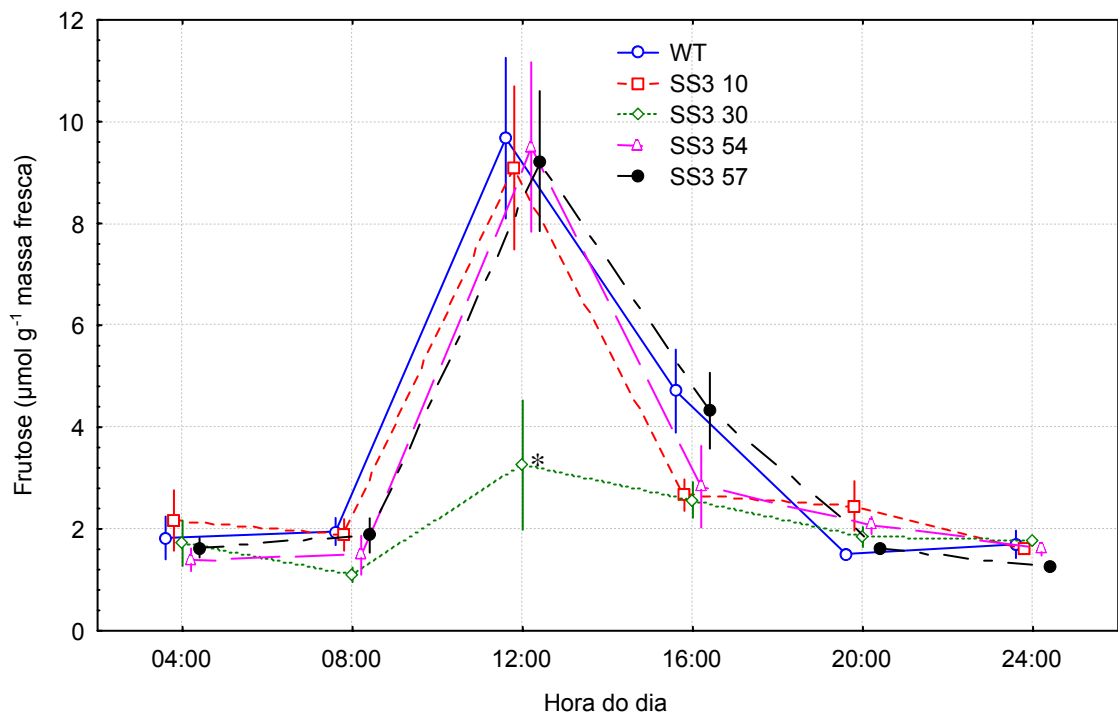


Figura 5: Curso diário da concentração de frutose em folhas das plantas SS3 antisense e plantas não-transformadas (WT). Para cada horário, os pontos foram ligeiramente deslocados horizontalmente, de modo a facilitar a visualização das linhas verticais, que representam o erro padrão da média. n = 5. Dentro de um mesmo horário, médias (pontos) precedidas de asterisco diferem significativamente ($P < 0,05$; teste de Duncan) em relação às plantas-controle – WT

A despeito da não alteração nos teores de hexoses nas folhas das plantas SS3 antisense (excetuando-se a linhagem SS3 30 às 12:00h), em relação às plantas-controle em um mesmo horário de avaliação, as concentrações de sacarose e amido sofreram aumentos diferenciados ao longo do dia, dependendo do horário de avaliação. Salienta-se que foram observados aumentos dos teores de sacarose às 04:00h, 08:00h e às 12:00h (Fig. 6), e os de amido, às 16:00h, 20:00h e 24:00h (Fig. 7). O aumento na concentração de amido em folhas pode ter sido reflexo da diminuição da densidade dos tubérculos das plantas transformadas (vide Fig. 17, Capítulo I). Esta diminuição estaria associada a uma redução no carregamento da sacarose, no qual, possivelmente, a SuSy estaria envolvida (Yang & Russel, 1990, Hänggi & Fleming, 2001), o que também explicaria, em parte, o acúmulo de sacarose na folha. Este, por sua vez, pode estar associado a uma retro-inibição na síntese de sacarose, que poderia afetar o fluxo de fosfato para o cloroplasto, aumentando a relação triose-P/Pi. Isso pode levar à ativação da AGPase (Fig 8), explicando-se, assim, o aumento nos teores de amido nas folhas. O aumento na razão 3-PGA/Pi ativa a AGPase e a síntese de amido (Preiss, 1982). Os resultados sugerem que a relação triose-P/Pi, ou a atividade do transportador triose-P/Pi, module a biossíntese de

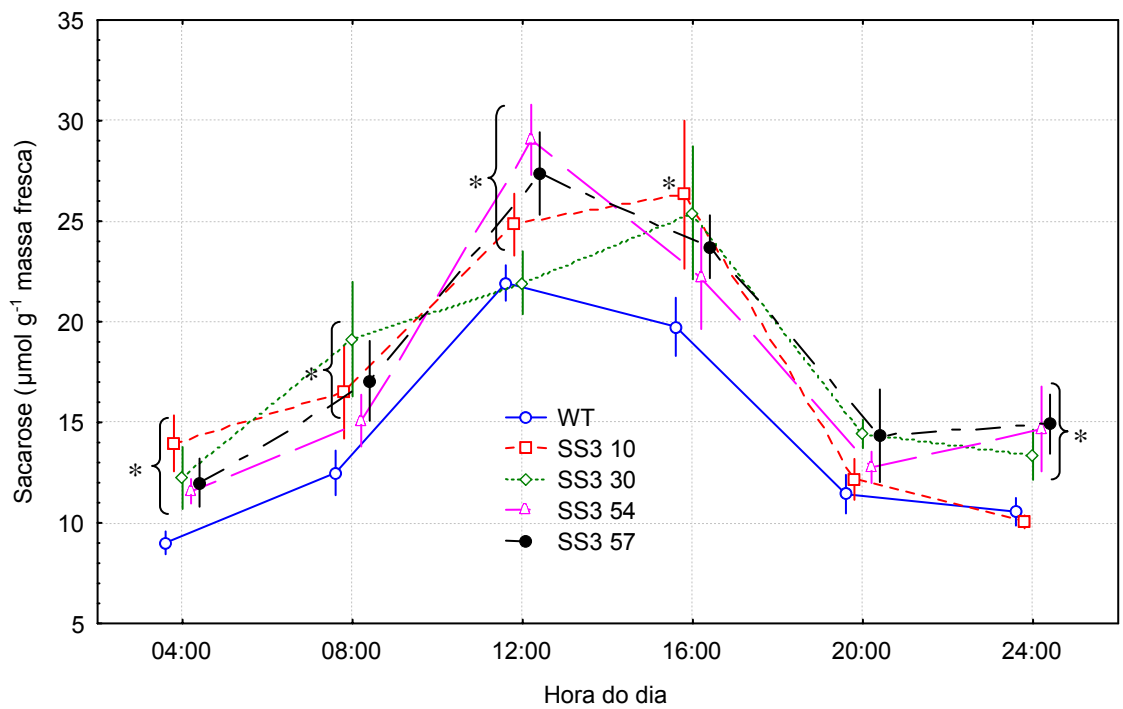


Figura 6: Curso diário da concentração de sacarose em folhas das plantas SS3 antisense e plantas não-transformadas (WT). Para cada horário, os pontos foram ligeiramente deslocados horizontalmente, de modo a facilitar a visualização das linhas verticais, que representam o erro padrão da média. n = 5. Dentro de um mesmo horário, médias (pontos) precedidas de chaves e asterisco diferem significativamente ($P < 0,05$; teste de Duncan) em relação às das plantas-controle – WT

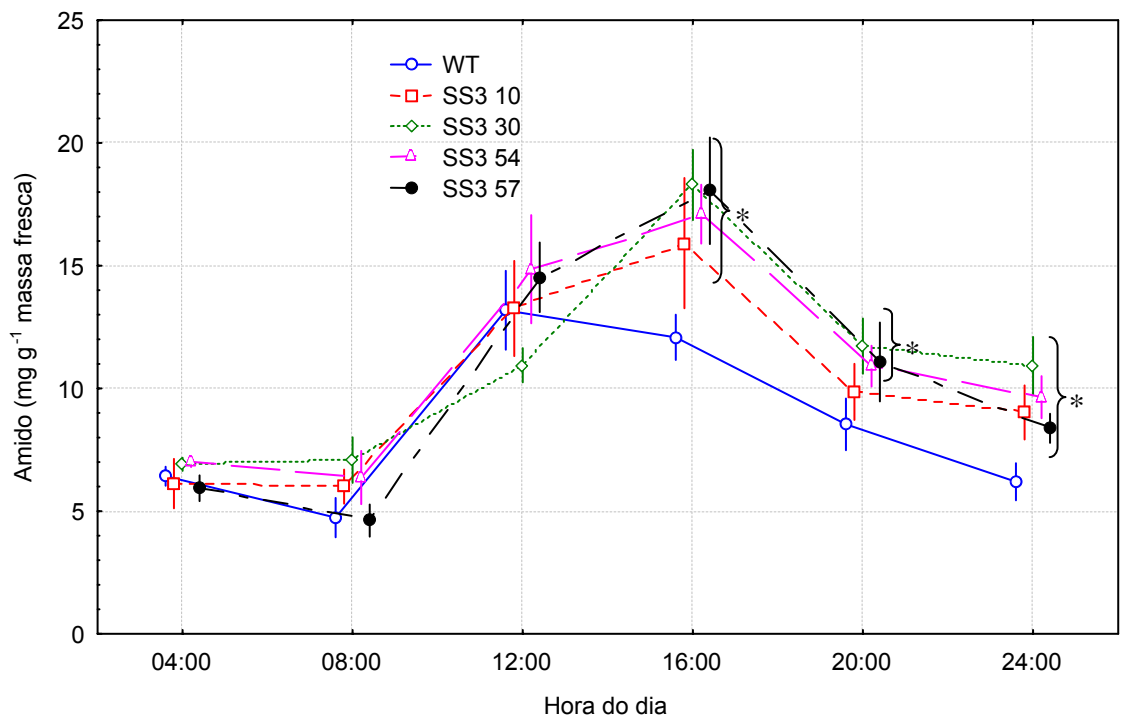


Figura 7: Curso diário concentração de amido em folhas das plantas SS3 antisense e plantas não-transformadas (WT). Para cada horário, os pontos foram ligeiramente deslocados horizontalmente, de modo a facilitar a visualização das linhas verticais, que representam o erro padrão da média. n = 5. Dentro de um mesmo horário, médias (pontos) precedidas de chaves e asterisco diferem significativamente ($P < 0,05$; teste de Duncan) em relação às das plantas-controle – WT

sacarose pela manhã, e a de amido, à tarde. Salienta-se que houve uma tendência de aumento na atividade da AGPase ao longo do dia, observando-se atividade catalítica máxima às 16:00h, fato que coincidiu com as diferenças mais expressivas nos teores de amido nas plantas SS3 antisense, em relação aos das plantas-controle (Fig. 7). O aumento na atividade da AGPase nas plantas SS3 antisense pode ser explicado, pelo menos em parte, pela redução dos teores de Pi (Tab. 2).

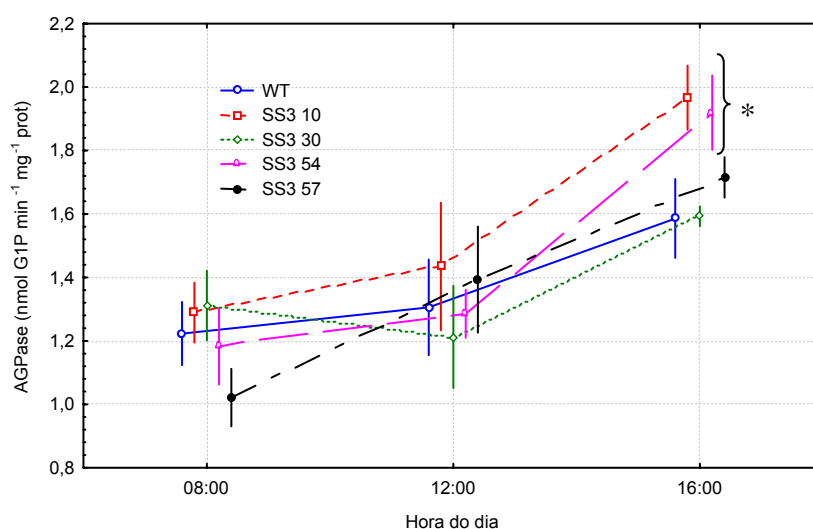


Figura 8: Curso diurno da atividade da AGPase das plantas SS3 antisense e plantas não-transformadas (WT). Para cada horário, os pontos foram ligeiramente deslocados horizontalmente, de modo a facilitar a visualização das linhas verticais, que representam o erro padrão da média. n = 5. Dentro de um mesmo horário, médias (pontos) seguidas de chaves e asterisco diferem significativamente ($P < 0,05$; teste de Duncan) em relação às das plantas-controle – WT

Nas plantas SS3 antisense, observaram-se aumentos nas atividades V_{max} (linhagem SS3 54 em todos os horários avaliados e linhagem SS3 30, às 08:00 e 16:00h) e V_{sel} (pela manhã em todas as linhagens) da SPS (Fig. 9 A e B), possivelmente promovido pela redução nos teores do inibidor, Pi (Tab. 2). Salienta-se que, durante o período avaliado, ocorreu aumento na atividade da AGPase, enquanto a ativação da SPS caiu. Salienta-se, ainda, que essas enzimas são inibidas por Pi, mas elas se encontram em compartimentos celulares distintos: a AGPase, nos cloroplastos e a SPS, no citossol.

Observa-se um papel importante do transportador de triose-P/Pi na regulação da partição de carbono entre amido e sacarose, bem como a reciclagem de Pi para sustentar elevadas taxas fotossintéticas, fato este, provavelmente, mais intenso nas plantas SS3 antisense, em que foram observados maiores teores de sacarose e amido com uma discreta redução na capacidade fotossintética, não devido a restrições mesofílicas ou deficiência de Pi, e sim, por restrições estomáticas naquelas plantas

(vide Capítulo I). Concomitantemente ao aumento nas atividades da SPS, ocorreu redução da atividade das invertases ácidas (Fig. 10), o que pode ter contribuído para o aumento dos teores de sacarose nas folhas sem, no entanto, afetar as concentrações de hexoses (Fig. 4 e 5).

Os teores de UDP-glicose, UTP, UDP não foram alterados nas folhas das plantas SS3 antisense (Tab. 2), o que sugere um baixo controle pela SuSy nos teores de seus substratos (UDP-glicose e UDP). De fato, a atividade da SuSy é bem mais baixa que a de outras enzimas que participam no metabolismo de uridinilatos, como a pirofosforilase da UDP-glicose (Zrenner *et al.*, 1993) ou SPS (Fig 3 e 9A), que, possivelmente, em conjunto com outras enzimas, podem exercer um controle fino das concentrações desses compostos na célula. Não obstante, o controle metabólico exercido pela SuSy parece ser uma via de modulação nos teores de sacarose, e não nos de uridinilatos.

Tabela 2: Teores de metabólitos em folhas de batata. Os dados são expressos em nmol g⁻¹ massa fresca e, para Pi, em µmol g⁻¹ massa fresca. Os resultados em negrito e sublinhados diferem significativamente (P < 0,05; teste de Duncan) em relação aos das plantas-controle – WT. n = 5 +/- erro padrão da média

	WT	SS3 10	SS3 30	SS3 54	SS3 57
3-PGA	125,0 +/- 19,58	81,5 +/- 4,96	117,6 +/- 12,70	94,9 +/- 9,12	96,6 +/- 8,81
Pi	4,78 +/- 0,35	5,01 +/- 0,47	<u>3,71 +/- 0,08</u>	<u>3,54 +/- 0,25</u>	<u>3,63 +/- 0,28</u>
ATP	21,6 +/- 1,29	25,5 +/- 1,45	23,9 +/- 0,63	23,5 +/- 2,36	23,7 +/- 1,40
ADP	36,5 +/- 2,20	40,1 +/- 6,06	41,2 +/- 3,77	41,5 +/- 4,17	40,1 +/- 3,09
ATP/ADP	0,6 +/- 0,05	0,7 +/- 0,08	0,6 +/- 0,05	0,6 +/- 0,06	0,6 +/- 0,04
Adenilatos totais	58,2 +/- 2,89	65,6 +/- 6,94	65,0 +/- 4,11	65,0 +/- 5,91	63,9 +/- 4,09
UDP glicose	28,1 +/- 3,51	32,2 +/- 4,27	29,5 +/- 3,39	28,8 +/- 3,32	27,8 +/- 3,31
UTP	15,7 +/- 0,63	17,2 +/- 0,85	16,5 +/- 0,87	15,3 +/- 1,09	16,9 +/- 0,76
UDP	6,2 +/- 0,30	7,4 +/- 0,68	6,5 +/- 0,45	6,4 +/- 0,40	6,3 +/- 0,28
UTP/UDP	2,5 +/- 0,08	2,4 +/- 0,25	2,7 +/- 0,34	2,4 +/- 0,19	2,7 +/- 0,18
Uridinilatos totais	50,0 +/- 3,50	56,8 +/- 5,37	52,4 +/- 4,10	50,4 +/- 4,58	51,0 +/- 3,92

Observou-se uma diminuição na atividade da FBPase no horário das 16:00h nas linhas SS3 30 e 57 (Fig. 11), fato que pode levar algum suporte à mudança de partição de esqueletos carbonados entre síntese de sacarose, pela manhã, e amido, à tarde. Salienta-se que essa enzima é inibida por frutose-2,6-P₂. Ademais, esse metabólito ativa a cinase da F6P dependente de P_i, governando o fluxo de carbono para a glicólise e inibindo a síntese de sacarose (Stitt, 1993). Isso pode ocorrer em paralelo à redução na ativação da SPS ao longo do dia (Fig. 9C) e redução na síntese de sacarose, à tarde.

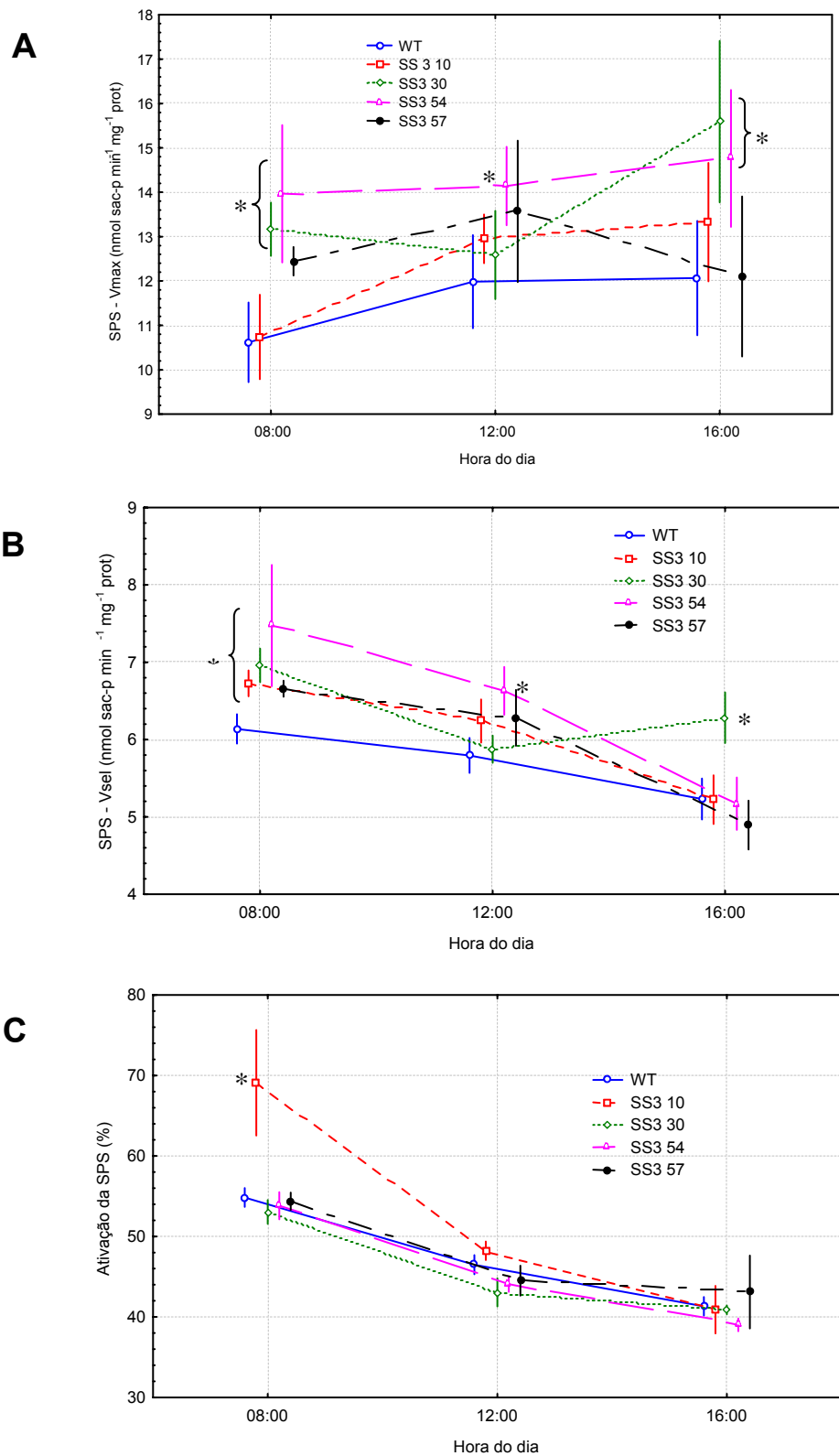


Figura 9: Curso diurno das atividades da SPS em folhas das plantas SS3 antisense e plantas não-transformadas (WT). **A** velocidade máxima (V_{max}); **B** velocidade seletiva (V_{sel}); **C** ativação (V_{max}/V_{sel}) da SPS. Para cada horário, os pontos foram ligeiramente deslocados horizontalmente, de modo a facilitar a visualização das linhas verticais, que representam o erro padrão da média. $n = 5$. Dentro de um mesmo horário, médias (pontos) precedidas de chaves e asterisco diferem significativamente ($P < 0,05$; teste de Duncan) em relação às das plantas-controle – WT

Em conjunto, as mudanças nos perfis das atividades enzimáticas (SPS, AGPase e FBPase) e das teores de metabólitos, principalmente Pi, explicam as mudanças na partição de carbono encontrada nas folhas ao longo do dia, bem como uma mudança substancial na alocação dos esqueletos carbonados entre sacarose e amido nas plantas transgênicas (Fig. 6 e 7).

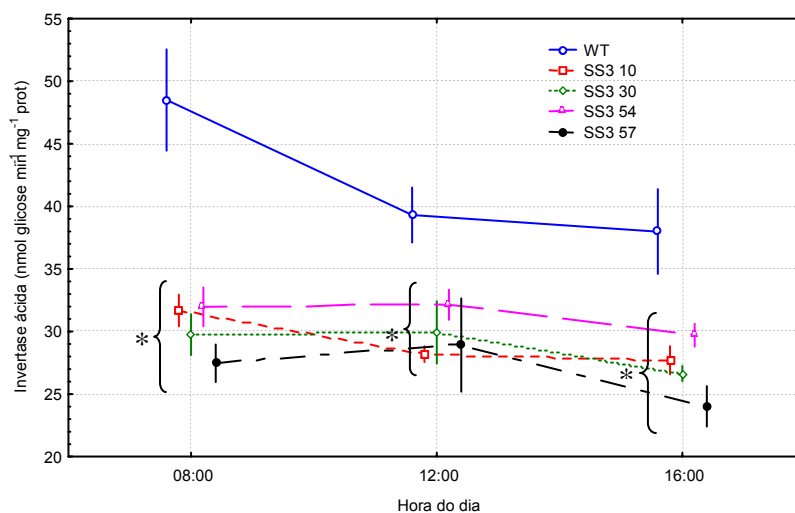


Figura 10: Curso diurno da atividade da invertase ácida das plantas SS3 antisense e plantas não transformadas – WT. Para cada horário, os pontos foram ligeiramente deslocados horizontalmente, de modo a facilitar a visualização das linhas verticais, que representam o erro padrão da média. n = 5. Dentro de um mesmo horário, médias (pontos) precedidas de chaves e asterisco diferem significativamente ($P < 0,05$; teste de Duncan) em relação às das plantas-controle – WT

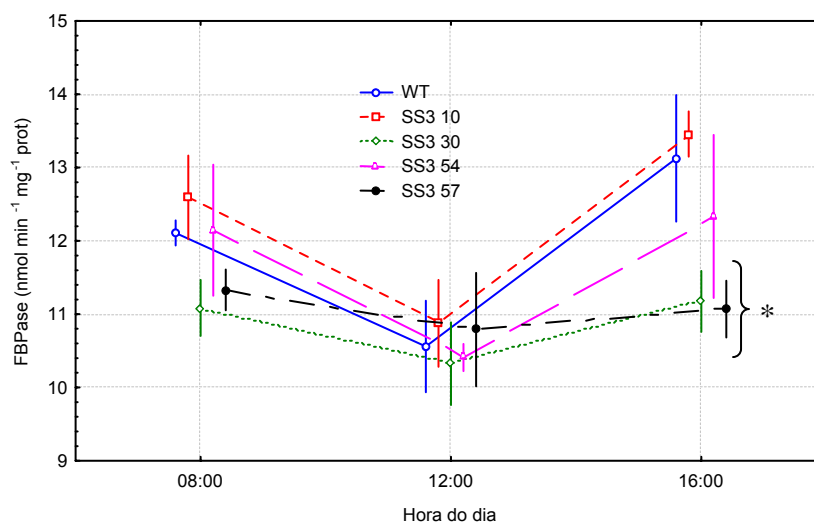


Figura 11: Curso diurno da atividade da FBPase das plantas SS3 antisense e plantas não transformadas – WT. Para cada horário, os pontos foram ligeiramente deslocados horizontalmente, de modo a facilitar a visualização das linhas verticais, que representam o erro padrão da média. n = 5. Dentro de um mesmo horário, médias (pontos) seguidas de chaves e asterisco diferem significativamente ($P < 0,05$; teste de Duncan) em relação às das plantas-controle – WT

5.2 Determinação dos fluxos metabólicos em folhas das plantas SS3 antisenso

Os resultados da Tab. 3 mostram que os principais fluxos biossintéticos avaliados não foram alterados nas folhas. Entretanto, pôde-se detectar uma mudança na alocação correspondente a um aumento significativo na fração de amido e parede celular, mas apenas na linhagem SS3 30. Possivelmente, o carbono assimilado desviado para a síntese de amido deve ter ocorrido em maior magnitude que para a síntese de celulose, pois se utilizaram discos de folhas completamente expandidas e, além disso, os teores de celulose não se modificaram nas plantas SS3 antisenso (Tab. 4). Portanto, pode-se especular que o aumento observado naquela fração seja correspondente ao aumento nos teores de amido naquelas plantas. Essa alteração não foi detectada nos teores de açúcares solúveis, embora uma ligeira redução na redistribuição de ^{14}C na fração de açúcares solúveis tenha sido observada, o que pode ser resultado de alocação diferencial de carbono entre biossíntese de amido e sacarose, dependendo do horário do dia (Fig. 6 e 7)

Tabela 3: Absorção de $^{14}\text{CO}_2$ expressos em Bq cm^{-2} nas plantas SS3 antisenso e plantas não-transformadas (WT). Os resultados em negrito e sublinhados diferem significativamente ($P < 0,05$; teste de Duncan) em relação às plantas-controle – WT. $n = 5$ +/- erro padrão da média

Parâmetro	Genótipo				
	WT	SS3 3	SS3 10	SS3 30	SS3 54
Absorção	57,8± 3,7	52,9± 4,3	55,6± 2,0	60,2± 2,5	56,1± 4,8
<i>Redistribuição do ^{14}C assimilado (como porcentagem do total assimilado)</i>					
Amido e parede celular	37,6± 0,4	38,2± 1,1	38,6 ± 0,5	<u>40,3 ± 1,0</u>	38,6 ± 0,5
Ácidos orgânicos	15,9± 0,3	17,4± 1,5	17,9 ± 1,8	16,2 ± 1,5	14,1 ± 2,9
Aminoácidos	0,7± 0,1	0,7± 0,1	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,0
Açúcares solúveis	45,7± 0,7	43,7± 1,8	41,6 ± 1,1	42,8 ± 1,3	45,3 ± 2,2

5.3 Composição da parede celular das plantas SS3 antisenso

Os resultados de composição de parede celular das plantas SS3 antisenso mostram uma tendência geral de redução no teor de celulose, embora não sendo significativo em nenhuma. Ainda, nenhuma mudança significativa nos conteúdos de ácidos urônicos, glicose, galactose, xilulose, manose, arabinose, fucose e ramnose foi observada (Tab. 4).

Acredita-se que a SuSy, em sua reação de degradação da sacarose, forneça a maior parte de UDP-glicose utilizada pela sintase da celulose, enquanto a degradação promovida pelas invertases forneceria os esqueletos carbonados necessários para a

demanda respiratória (Dick & ap Ress, 1976), embora esse modelo tenha sido bastante questionado (Haigler *et al.*, 2001). Ainda, o modelo proposto por Haigler *et al.* (2001) pressupõe que as enzimas SuSy e sintase da celulose estejam associadas num complexo ligado à membrana plasmática (Carlson & Chourey, 1996), permitindo uma integração metabólica no direcionamento para a síntese de componentes de parede celular (Carpita & Delmer, 1981). Sabe-se, no entanto, que as reduções nos teores de celulose não ocorrem na mesma extensão que a redução da na atividade da SuSy (Tang & Sturm, 1999; Haigler *et al.*, 2001), fato que pode ser explicado pela plasticidade metabólica, excesso de SuSy ou por um baixo controle da enzima sobre a biossíntese de celulose (Haigler *et al.*, 2001). Ainda assim, os modelos propostos indicam que a SuSy esteja envolvida nessa rota (Amor *et al.*, 1995), em especial na biossíntese de parede secundária (Salnikov *et al.*, 2001)

Tabela 4: Teores de celulose, ácido urônicos e de outros açúcares componentes da parede celular de folhas de plantas transgênicas com redução na expressão da isoforma SuSy 3 e plantas não-transformadas (WT) (μmol equivalente mg^{-1} de parede celular). n = 6 +/- erro padrão da média

Parâmetro	Genótipo				
	WT	SS3 10	SS3 30	SS3 54	SS3 57
Ac. Urônico	39,66 ± 5,66	30,89 ± 6,52	34,44 ± 1,19	48,41 ± 7,70	40,01 ± 4,17
Arabinose	22,91 ± 0,69	21,74 ± 0,39	24,18 ± 1,15	21,66 ± 0,81	21,07 ± 0,38
Celulose	10,63 ± 0,84	9,01 ± 0,62	8,97 ± 0,46	9,22 ± 0,49	9,10 ± 0,26
Fucose	1,44 ± 0,20	1,56 ± 0,13	1,38 ± 0,05	1,63 ± 0,20	1,43 ± 0,12
Galactose	25,05 ± 0,93	24,47 ± 0,30	27,06 ± 1,03	24,83 ± 0,51	24,78 ± 0,38
Glicose	8,23 ± 0,81	8,89 ± 0,25	6,73 ± 0,66	8,64 ± 0,80	9,54 ± 0,89
Manose	3,74 ± 0,13	4,03 ± 0,10	3,43 ± 0,18	4,10 ± 0,18	3,94 ± 0,18
Ramnose	15,87 ± 1,35	17,40 ± 0,47	13,86 ± 1,33	16,43 ± 0,61	15,94 ± 1,18
Xilulose	22,75 ± 0,83	21,91 ± 0,30	23,36 ± 0,36	22,71 ± 0,64	23,30 ± 0,28

5.4 Metabolismo de carbono em plantas JE INV

Foram avaliadas as atividades das enzimas invertase ácida, SuSy, FBPase e AGPase. Em nenhuma delas e em nenhum dos horários avaliados houve modificações significativas em relação às atividades das plantas-controle, num mesmo horário (Fig. 12).

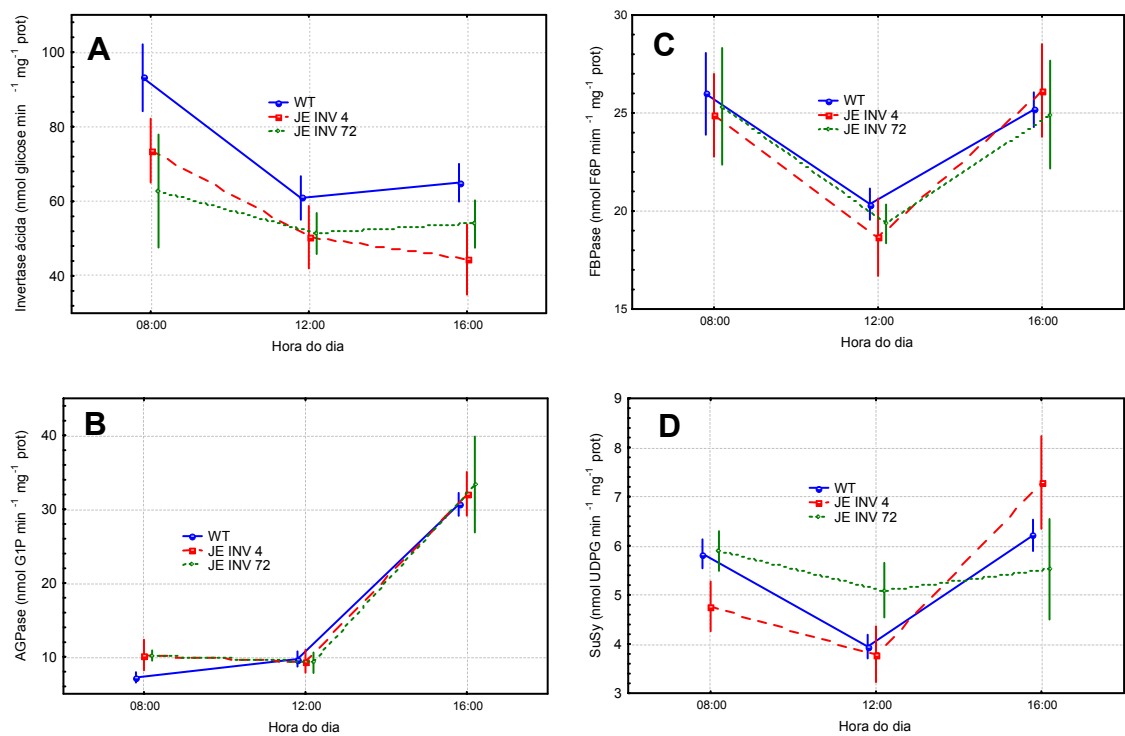


Figura 12: Curso diurno das atividades da invertase ácida (A), AGPase (B), FBPase (C), SuSy (D) em folhas das plantas com superexpressão da invertase em células-guarda (JE INV) e plantas não-transformadas (WT). Para cada horário, os pontos foram ligeiramente deslocados horizontalmente, de modo a facilitar a visualização das linhas verticais, que representam o erro padrão da média. $n = 5$. Dentro de um mesmo horário, médias (pontos) precedidas de chaves e asterisco diferem significativamente ($P < 0,05$; teste de Duncan) em relação às das plantas-controle – WT

Em geral, não houve diferenças significativas nos conteúdos de glicose, sacarose e amido nas folhas (Fig 13). As análises foram feitas apenas no horário das 12:00h, em função da não modificação no padrão das atividades das enzimas anteriormente citadas. Em decorrência, possivelmente, das maiores taxas fotossintéticas das plantas JE INV, foi observado um aumento nos teores de frutose na linhagem JE INV 72 (Fig. 13), tendo também conseqüências sobre a sua forma fosforilada (Fig. 14). Similarmente, a elevada taxa fotossintética das plantas JE INV deve ter acarretado aumento dos teores de 3-PGA, confirmando uma alta taxa de fixação de CO_2 na fotossíntese.

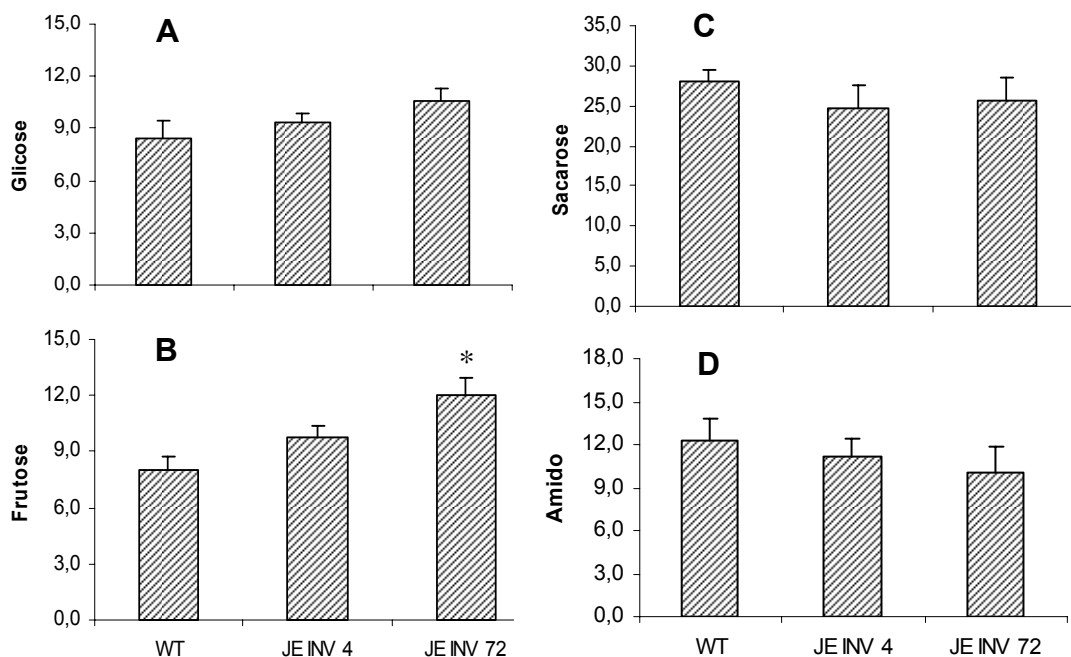


Figura 13: Teores de açúcares solúveis e amido em folhas das plantas com superexpressão da invertase no citossol, em células-guarda. **A** glicose; **B** frutose; **C** sacarose; **D** amido. Asteriscos representam diferenças significativas em relação às plantas não-transformadas (WT). ($P < 0,05$; teste de Duncan). $n = 5 \pm$ erro padrão da média. **ABC** $\mu\text{mol g}^{-1}$ massa fresca; **D** mg g^{-1} massa fresca

As concentrações de hexoses nas suas formas fosforiladas encontram-se em equilíbrio no citossol e nos plastídios, sendo dependentes de enzimas como a PGM e a PGI e, também, dos transportadores de hexoses. As reações catalisadas pela PGM e PGI são prontamente reversíveis e aparentemente próximas ao equilíbrio *in vivo* (Dennis & Blakeley, 2000). Como consequência dessa homeostase metabólica, foram observados aumentos nos teores de G6P e nos teores de hexoses-P totais (Fig. 14).

A razão G6P/G1P, importante no direcionamento de carbono entre síntese de sacarose e amido, não foi alterada, consistente com os resultados da não alteração nos teores de sacarose e amido em folhas. Os teores de Pi não se alteraram significativamente, entretanto os aumentos nos teores de 3-PGA contribuíram para o aumento da razão 3-PGA/Pi, mas não tiveram reflexos significativos sobre a atividade da AGPase, nem sobre os teores de amido.

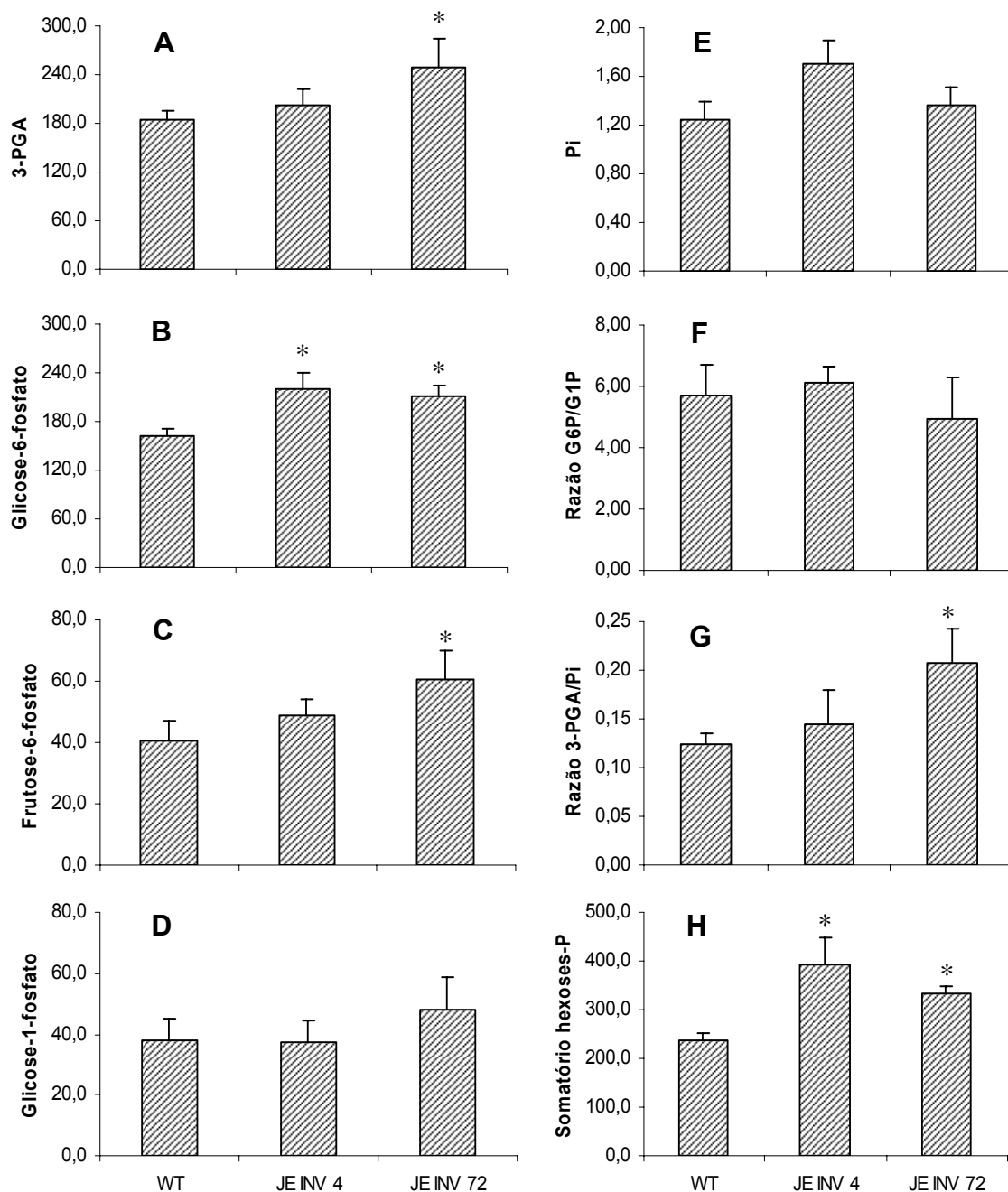


Figura 14: Teores de metabólitos glicolíticos em folhas das plantas com superexpressão da invertase no citossol, especificamente em células-guarda. **A** ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA); **B** glicose-6-fosfato (G6P); **C** Frutose-6-fosfato (F6P); **D** glicose-1-fosfato (G1P); **E** ortofosfato (Pi); **F** razão entre os teores de G6P/G1P; **G** razão entre 3-PGA/Pi; **H** hexoses-P totais, (G6P + F6P + G1P). Asteriscos representam diferenças significativas em relação às plantas-controle (WT) ($P < 0,05$; teste de Duncan). $n = 5 \pm$ erro padrão da média. **ABCDH** nmol g⁻¹ massa fresca; **E** μmol g⁻¹ massa fresca; **FG** adimensionais

A falta de variação no perfil metabólico nas plantas JE INV reforça a hipótese de que a manipulação do metabolismo de sacarose ocorreu somente nas células-guarda, sem conseqüências sobre a partição de carbono nas células mesofílicas. Aliás, as respostas fotossintéticas ao CO₂, por meio de curva A/C_i (fotossíntese líquida, A, *versus*, concentração de CO₂ na câmara subestomática, C_i) indicaram que não houve limitações mesofílicas diferenciais entre as plantas JE INV em relação às das plantas-controle (vide Fig. 13, Capítulo I), indicando que as menores restrições estomáticas encontradas naquelas plantas são responsáveis pelo fenótipo bioquímico observado com relação aos metabólitos glicolíticos.

5.5 Determinação dos fluxos metabólicos em plantas JE INV

Para um melhor entendimento dos efeitos da atividade de invertase ácida nas plantas transgênicas JE INV sobre a fotossíntese, determinou-se a contribuição dos principais fluxos metabólicos em discos foliares provenientes de folhas jovens completamente expandidas, retiradas de plantas com seis semanas de idade. Observou-se que não houve alteração na assimilação total de ¹⁴CO₂ e nos fluxos metabólicos nas plantas JE INV (Tab. 5), corroborando os resultados previamente observados com as plantas SS3 antisenso. Entretanto, verificaram-se pequenas alterações na partição do ¹⁴CO₂ assimilado para as frações correspondentes aos açúcares solúveis e aos componentes insolúveis, como parede celular e amido (Tab. 5). Estes experimentos indicam que a capacidade do mesofilo de metabolizar o CO₂ não foi alterada, em função do aumento na expressão de invertase no estômato. Entretanto, cabe lembrar que experimentos para a determinação de fluxos metabólicos são realizados em condições supra-ótimas de CO₂ e luz, diferentemente das encontradas naturalmente, o que não permitiria a observação de possíveis efeitos estomáticos. Porém, outros dados indicam que não ocorrem alterações pleiotrópicas no metabolismo, as quais poderiam ou não ser associadas com o fenótipo observado, em relação à condutância estomática. Assim, estes dados suportam a hipótese de que as mudanças na condutância estomática foram devidas a alterações no metabolismo das células estomáticas.

Tabela 5: Absorção de $^{14}\text{CO}_2$ expressa em Bq cm^{-2} nas plantas com superexpressão da invertase em células-guarda (JE INV) e plantas não-transformadas (WT). Os resultados em negrito e sublinhados diferem significativamente ($P < 0,05$; teste de Duncan) em relação aos das plantas-controle – WT. $n = 5 \pm$ erro padrão da média

Parâmetro	Genótipo		
	WT	JEINV 4	JEINV 72
Absorção Total	207,6 \pm 10,7	198,6 \pm 21,6	196,0 \pm 20,9
<i>Redistribuição do ^{14}C assimilado (como porcentagem do total assimilado)</i>			
Ácidos orgânicos	13,5 \pm 1,0	14,4 \pm 0,9	14,6 \pm 1,1
Aminoácidos	1,8 \pm 0,3	1,9 \pm 0,2	2,3 \pm 0,2
Açúcares solúveis totais	46,4 \pm 1,4	<u>41,9</u> \pm <u>1,0</u>	45,2 \pm 0,6
Amido e parede celular	38,3 \pm 0,5	<u>41,8</u> \pm <u>1,3</u>	37,9 \pm 0,8

6 CONCLUSÕES

Em plantas de batata, a redução da atividade da SuSy 3 promoveu uma série de alterações metabólicas em folhas, resultando no aumento dos teores de sacarose em plantas SS3 antisense, em decorrência, possivelmente, de pelo menos dois fatores: 1) aumento na sua biossíntese, promovida pela SPS; e 2) redução da degradação pelas invertases ácidas e pela SuSy. Os incrementos nas atividades da SPS e AGPase podem estar associados à redução dos teores de Pi, explicando, assim, os aumentos nos teores de amido.

Nas plantas com superexpressão de invertase no citossol das células-guarda, não se observaram alterações significativas nas atividades das invertases, SuSy, SPS e FBPase no limbo foliar. Aumentos foram observados nos teores 3-PGA, G6P e F6P, reflexo das maiores taxas de assimilação de CO_2 dessas plantas. Assim, estes dados suportam a hipótese de que as mudanças na condutância estomática foram devidas, possivelmente, a alterações no metabolismo das células estomáticas *per se*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amor Y, Haigler CH, Johnson S, Wainscott M, Delmer DP** (1995) A membrane-associated form of SuSy and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:9353-9357
- Bologa KL, Fernie AR, Leisse A, Loureiro ME, Geigengerger P** (2003) A bypass of sucrose synthase leads to low internal oxygen and impaired metabolic performance in growing potato tubers. *Plant Physiol* **132**:2058-2072
- Bradford MM** (1976) Rapid and quantitative method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-252
- Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G** (1973) New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem* **54**:484-489
- Carlson SJ, Chourey P** (1996) Evidence for plasma membrane-associated forms of sucrose synthase in maize. *Mol Gen Genet* **252**:303-310
- Carpita NC, Delmer DP** (1981) Concentration and metabolic turnover of UDP-glucose in developing cotton fibers. *J Biol Chem* **256**:308-315
- Chourey P, Chen Y, Miller M** (1991) Early cell degeneration in developing endosperm is unique to the shrunken1 mutation in maize. *Maydica* **36**:141-146
- Dennis DT, Blakeley SD** (2001) Carbohydrate metabolism. In BB Buchanan, W Gruissem, RL Jones (eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville. pp.630-675
- Dick PS, ap Rees T** (1976) Sucrose metabolism by roots of *Pisum sativum*. *Phytochemistry* **15**:255-259
- Geigenberger P, Reimholz R, Geiger M, Merlo L, Canale V, Stitt M** (1997) Regulation of sucrose and starch metabolism in potato tubers in response to short-term water deficit. *Planta* **201**:502-518
- Geigenberger P, Stitt M** (1993) Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction in vivo in developing potato tubers and other plant tissues. *Planta* **190**:440-450
- Gibon Y, Vigeolas H, Geigenberger P, Stitt M** (2002) Sensitive and high throughput metabolite assays for inorganic pyrophosphate, ADPGlc, nucleotide phosphates, and glycolytic intermediates based on a novel enzymatic cycling system. *Plant J* **30**:221-235
- Haigler CH, Ivanova-Datcheva, Hogan PS, Salnikov VV, Hwang S, Martin K, Delmer DP** (2001) Carbon partitioning to cellulose synthesis. *Plant Mol Biol* **47**:29-51
- Hänggi E, Fleming AJ** (2001) Sucrose synthase expression pattern in young maize leaves: implications for phloem transport. *Planta* **214**:326-329

- Hite DRC, Outlaw WH Jr, Tarczynski MC** (1993) Elevated levels of both sucrose-phosphate synthase and sucrose synthase in *Vicia faba* guard cells indicate cell-specific carbohydrate interconversions. *Plant Physiol* **101**:1217-1221
- Kopka J, Provart NJ, Müller-Röber B** (1997) Potato guard cells respond to drying soil by a complex change in the expression of genes related to carbon metabolism and turgor regulation. *Plant J* **11**:871-882
- Huber SC, Huber JLA, Nielson TH** (1989) Protein phosphorylation as a mechanism for regulation of spinach leaf sucrose-phosphate synthase activity. *Arch Biochem Biophys* **270**:681-690
- Jelitto T, Sonnewald U, Willmitzer L, Hajirezaei M, Stitt M** (1992) Inorganic pyrophosphate content and metabolites in leaves and tubers of potato and tobacco plants expressing *E. coli* pyrophosphatase in their cytosol: biochemical evidence that sucrose metabolism has been manipulated. *Planta* **188**:238-244
- Kruger NJ, Beevers H** (1984) Effect of fructose 2-6 bisphosphate on the kinetic properties of cytoplasmic fructose 1-6 bisphosphate from germinating castor bean endosperm. *Plant Physiol* **76**:49-59
- Kock K** (2004) Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr Opin Plant Biol* **7**:235-246
- Loureiro ME** (1999) *The role of SNF1 and sucrose synthase in metabolism of potato tubers*. PhD Thesis. Freie Universität Berlin. 172p
- Lytovchenko A, Sweetlove L, Pauly M, Fernie AR** (2002) The influence of cytosolic phosphoglucomutase on photosynthetic carbohydrate metabolism. *Planta* **215**:1013-1021
- Maas C, Schaal S, Werr W** (1990) A feedback control element near the transcription start site of the maize Shrunken gene determines promoter activity. *EMBO J* **9**:3447-52
- Meyer LE** (2003) *Papel fisiológico de uma isoenzima de sintase de sacarose em folhas de batata*. Tese MS. Universidade Federal de Viçosa. 48p
- Müller-Röber B, La Cognata U, Sonnewald U, Willmitzer L** (1994) A truncated version of an ADP-glucose pyrophosphorylase promoter from potato specifies guard cell-selective expression in transgenic plants. *Plant Cell* **6**:601-612
- Müller-Röber B, Sonnewald U, Willmitzer L** (1992) Antisense inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage proteins. *EMBO J* **11**:1229-1238
- Noctor G, Foyer CH** (1998) A re-evaluation of the ATP:NADPH budget during C3 photosynthesis. A contribution from nitrate assimilation and its associated respiratory activity. *J Exp Bot* **49**:1895-1908
- Noctor G, Foyer CH** (2000) Homeostasis of adenylate status during photosynthesis in a fluctuating environment. *J Exp Bot* **51**:347-356

- Penney CL** (1976) A simple micro-assay for inorganic phosphate. *Anal Biochem* **75**:201-210
- Plaxton WC** (1996) The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**:185-214
- Preiss J** (1982) Regulation of the biosynthesis and degradation of starch. *Annu Rev Plant Physiol* **33**: 431-454
- Provart NJ** (1996) *The molecular biology of guard cells in Solanum tuberosum*. PhD Thesis. Freie Universität Berlin. 115p
- Regierer B, Fernie AR, Springer F, Perez-Melis A, Leisse A, Kochl K, Willmitzer L, Geigenberger P, Kossmann J** (2002) Starch content and yield increase as a result of altering adenylate pools in transgenic plants. *Nat Biotechnol* **20**:1256-1260
- Rohwer JM, Botha FC** (2001) Analysis of sucrose accumulation in the sugar cane culm on the basis of *in vitro* kinetic data. *Biochem J* **358**:437-445
- Salnikov VV, Grimson MJ, Delmer DP, Haigler CH** (2001) Sucrose synthase localizes to cellulose synthesis sites in tracheary elements. *Phytochemistry* **57**:823-833
- Scheibe R, Backhausen JE, Emmerlich V, Holtgreffe S** (2005) Strategies to maintain redox homeostasis during photosynthesis under changing conditions. *J Exp Bot* **56**:1481-1489
- StatSoft, Inc.** (2001) STATISTICA (data analysis software system), Version 6. www.statsoft.com
- Stitt M** (1993) Fructose-2,6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **41**:153-185
- Stitt M, Lilley RM, Heldt HW** (1989) Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Meth Enzymol* **174**:518-552
- Tang GQ, Sturm A** (1999) Antisense repression of sucrose synthase in carrot (*Daucus carota* L.) affects growth rather than sucrose partitioning. *Plant Mol Biol* **41**:456-479
- Trethewey RN, Geigenberger P, Riedel K, Hajirezaei MR, Sonnewald U, Stitt M, Riesmeier JW, Willmitzer L** (1998) Combined expression of glucokinase and invertase in potato tubers leads to dramatic reduction in starch accumulation and a stimulation of glycolysis. *Plant J* **15**:109-118
- Updegraff DM** (1969) Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Anal Biochem* **32**:420-424
- Winter H, Huber SC** (2000) Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. *Crit Rev Plant Sci* **19**:31-67

- Yang N-S, Russel D** (1990) Maize sucrose synthase-1 promoter directs phloem cell-specific expression of Gus gene in transgenic tobacco plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:4144-4148
- Zhu YJ, Komor E. Moore PH** (1997) Sucrose accumulation in the sugarcane stem is regulated by the difference between the activities of soluble acid invertase and sucrose phosphate synthase. *Plant Physiol* **115**:609-616
- Zrenner R, Salanoubat M, Willmitzer L, Sonnewald U** (1995) Evidence for the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J* **7**:97-107
- Zrenner R, Willmitzer L, Sonnewald U** (1993) Analysis of the expression of potato uridinediphosphate-glucose phyrophosphorylase and its inhibition by antisense RNA. *Planta* **190**:247-252

5 CONCLUSÕES GERAIS

A manipulação do metabolismo de sacarose em células-guarda influenciou os movimentos estomáticos, mas não a capacidade mesofílica de assimilação do CO₂ (*A*). Por um lado, a redução na atividade sacarolítica, imposta pela redução na expressão da SuSy 3, reduziu *g_s* e, por outro, o aumento da atividade da invertase, aumentou *g_s*. As modificações na magnitude de *A* são, aparentemente, decorrentes das mudanças nas limitações estomáticas nas plantas transformadas.

A redução da atividade da SuSy 3 promoveu uma série de alterações metabólicas em folhas, resultando no aumento dos teores de sacarose pela manhã, em decorrência, provavelmente, da ação conjunta do aumento na biossíntese da sacarose promovida pela sintase da sacarose-fosfato (SPS) e redução na degradação pelas invertases ácidas e pela SuSy. Os incrementos nas atividades da SPS e pirofosforilase da ADP-glicose parecem associados à redução dos teores de ortofosfato inorgânico, explicando, assim, os aumentos nos teores amido à tarde.

As plantas SuSy 3 antisense foram caracterizadas por uma maior área foliar e massa seca da parte aérea, com redução na densidade dos tubérculos.