

DANIELLE SANTOS BRITO

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DO GENE HOMÓLOGO AO
TRANSPORTADOR MITOCONDRIAL SUCINATO-FUMARATO (SFC1)
DE *Arabidopsis thaliana* EM *Solanum tuberosum***

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012**

DANIELLE SANTOS BRITO

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DO GENE HOMÓLOGO AO
TRANSPORTADOR MITOCONDRIAL SUCINATO-FUMARATO (SFC1)
DE *Arabidopsis thaliana* EM *Solanum tuberosum***

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

APROVADA: 20 de julho de 2012.

Thomas Christopher R. Williams

Marcelo Rogalski

Wagner L. Araújo
(Coorientador)

Adriano Nunes Nesi
(Orientador)

Dedico esta dissertação aos meus exemplos de vida, Arnaldo Brito de Lima e Lucineide Santos Brito que sempre me estimularam a dar esse grande passo. Estas duas pessoas com muita sabedoria e dedicação estiveram ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória. Obrigada por serem meus pais.

AGRADECIMENTOS

Meu maior agradecimento é dirigido a Deus por nos momentos difíceis, dar-me força interior para superar as dificuldades, mostrando os caminhos nas horas incertas e em todas as minhas necessidades.

Aos meus pais Arnaldo Brito de Lima e Lucineide Santos Brito por terem sido o contínuo apoio em todos estes anos, ensinando-me, principalmente, a importância da construção e coerência de meus próprios valores.

As minhas irmãs Gabrielle e Tatielle pelo amor incondicional e por compreenderem os motivos da minha ausência em muitos momentos.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Vegetal por proporcionar os meios para a realização do Curso de Mestrado.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Ao Professor Adriano Nunes Nesi pela inestimável orientação, oportunidade de crescimento, aprendizado, realização profissional, amizade, paciência, incentivo e pela confiança em mim depositada.

Incluo, de forma especial, Robson Loterio. Foi muita sorte ele ter cruzado o meu caminho nesta etapa de conclusão de Mestrado. Sei que não foi fácil Robito, madrugadas frias, finais de semana sem almoço, mas fomos fortes. Agradeço-o pela sua agilidade, organização, dedicação e amizade.

Aos amigos: Jocimar Caiafa, Vicente Júnior, Luís Fernando, Josélia França, Amana Obolari, Franklin Magnum, Laíse Rosado, Renan, Genáina, Alexmiliano, Sabrina Helena, Paula Pereira, Izabel Chaves, Auxiliadora e João Henrique pelas trocas de conhecimento, amizade, pelo bom convívio e momentos de descontração. Juntos contribuíram de diferentes formas para a realização deste trabalho. A vocês, um muito-obrigada mais que especial.

Ao Professor Dr. Antônio Oliveira, que tem paixão pelo conhecimento e que permanentemente acompanha os passos de seus *aprendizes*. Ele foi o grande incentivador da minha vontade de pesquisar e de aprender.

À Professora e também amiga Débora Leonardo dos Santos, que com nossa grande história de trabalho e amizade, é sempre fonte de inspiração.

Às amigas: Viviane Guzzo, Rosilene Mesquita, Monalessa e Tatiane. Agradeço antes de tudo a amizade de vocês. Obrigada pelas palavras, lanches e almoços nos intervalos de trabalho. Agradeço-as também por disponibilizarem seus tempos para explicar algumas técnicas moleculares. Vocês foram e são muito importantes para mim. Obrigada meninas. Adoro vocês.

Ao Professor Wagner Araújo pela colaboração intelectual, amizade e incentivo. Suas ideias permearem o trabalho de mestrado.

Aos Professores Raimundo e Edgard Picoli por disponibilizarem a estrutura de seus laboratórios para a realização de experimentos.

Aos amigos da Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) pela forma amável e atenciosa como fui recebida.

A empresa Fitoclone, especialmente Antônio Cordeiro e Fernanda Sartor pela amizade e apoio técnico. Neste mesmo parágrafo não posso deixar de incluir meu grande amigo Sânzio Dias. Obrigada pelas alegrias e palavras sábias. Os meus dias no laboratório não teriam as mesmas motivações sem a sua amizade.

A Wedisson e Sebástian, pelo auxílio no controle fitossanitário das batatas.

Aos colegas de laboratório: Alyne Lavysnki, Kelly Dettman, Leandro Elias, Samuel Cordeiro, Nelson, Paulo Eduardo, Paulo Cezar, Lucas Felisberto, pela ajuda e amizade.

Aos demais professores do curso, funcionários e colegas que, de alguma forma, auxiliaram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 MATERIAL E MÉTODOS	7
2.1 Clonagem e transformação de plantas de <i>Solanum tuberosum</i>	7
2.2 Material vegetal e condições de cultivo	8
2.3 Análise da sequência do gene SFC1	9
2.4 Seleção das linhagens transgênicas de <i>Solanum tuberosum</i>	11
2.4.1 Preparação das linhas transgênicas	11
2.4.2 Extração do DNA total	11
2.4.3 Triagem dos transformantes via PCR	12
2.4.4 Análise de expressão via qRT-PCR	13
2.5 Análises fisiológicas	14
2.5.1 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i>	15
2.5.2 Análise da taxa respiratória em tubérculos	15
2.5.3 Parâmetros biométricos	16
2.6 Análises bioquímicas	16
2.6.1 Processamento e extração	16
2.6.2 Determinação dos pigmentos em tecidos foliares	17
2.6.3 Determinação de açúcares	17
2.6.4 Determinação de aminoácidos totais	18
2.6.5 Determinação de nitrato	19

2.6.6 Determinação de malato e fumarato	20
2.6.7 Determinação de proteína	21
2.6.8 Determinação de amido	21
2.7 Incubação de discos de tubérculos com [¹⁴ C]-Glicose.....	22
2.7.1 Incubação com [1- ¹⁴ C]-Glicose e [3,4- ¹⁴ C]-Glicose	22
2.7.2 Incubação com [U- ¹⁴ C]-Glicose.....	23
2.8 Análises estatísticas	23
3 RESULTADOS	24
3.1 Análise da sequência do gene SFC1.....	24
3.2 Seleção das linhagens de <i>Solanum tuberosum</i>	28
3.3 Análises fisiológicas.....	29
3.3.1 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i>	29
3.3.2 Parâmetros de crescimento	32
3.4 Análises bioquímicas.....	34
3.5 Análises bioquímicas em tubérculos.....	38
3.6 Incubação de discos de tubérculos com [¹⁴ C]-Glicose.....	40
3.6.1 Incubação com [1- ¹⁴ C]-Glicose e [3,4- ¹⁴ C]-Glicose	40
3.6.2 Incubação com [U- ¹⁴ C]-Glicose.....	43
3.7 Taxa de respiração em tubérculos	43
3.8 Parâmetros relacionados à produção de tubérculos.....	44
4 DISCUSSÃO	46
5 CONCLUSÕES	51
6 REFERÊNCIAS	52
7 ANEXOS	59
7.1 ANEXO 1	59
7.2 ANEXO 2	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da construção RNAi utilizada para a produção de plantas transgênicas de <i>Solanum tuberosum</i>.	7
Figura 2: Alinhamento entre sequências de aminoácidos de transportadores mitocondriais de algumas espécies homólogos ao SFC1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>.	25
Figura 3: Análise filogenética a partir de um alinhamento múltiplo pelo ClustalW (http://www.genome.jp/tools/clustalw) e GENEDOC (Nicholas e Nicholas, 1997) de sequências de aminoácidos homólogos ao SFC1 de <i>Arabidopsis thaliana</i> e outros transportadores mitocondriais.	27
Figura 4: Análise da expressão do SFC1 em tecidos foliares de plantas transgênicas de <i>Solanum tuberosum</i>.	29
Figura 5: Parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i> em plantas transgênicas de <i>Solanum tuberosum</i> com redução na expressão do gene <i>StSFC1</i>.	31
Figura 6: Crescimento de plantas transgênicas de <i>Solanum tuberosum</i> com redução na expressão do gene <i>StSFC1</i>.	33
Figura 7: Alterações ao longo do dia nos conteúdos de pigmentos foliares de plantas transgênicas de <i>Solanum tuberosum</i> com redução na expressão do gene <i>StSFC1</i>.	34
Figura 8: Alterações ao longo do dia nos conteúdos de metabólitos chaves do metabolismo do carbono e do nitrogênio em folhas de plantas transgênicas de <i>Solanum tuberosum</i> com redução na expressão do gene <i>StSFC1</i>.	36
Figura 9: Alterações ao longo do dia nos conteúdos de metabólitos chaves em folhas de plantas transgênicas de <i>Solanum tuberosum</i> com redução na expressão do gene <i>StSFC1</i>.	37
Figura 10: Conteúdo de metabólitos em tubérculos de plantas transgênicas de <i>Solanum tuberosum</i> com redução na expressão do gene <i>StSFC1</i>.	39
Figura 11: Evolução de $^{14}\text{CO}_2$ com [1-^{14}C]-; [3,4-^{14}C]-Glicose em discos de tubérculos de plantas transgênicas de <i>Solanum tuberosum</i> com redução na expressão do gene <i>StSFC1</i>.	42
Figura 12: Evolução de $^{14}\text{CO}_2$ com [U-^{14}C]-Glicose em discos de tubérculos de plantas transgênicas de <i>Solanum tuberosum</i> com redução na expressão do gene <i>StSFC1</i>.	43

Figura 13: Respiração de discos obtidos de tubérculos em desenvolvimento destacados de plantas transgênicas de <i>Solanum tuberosum</i> com redução na expressão do gene <i>StSFC1</i>.	44
Figura 14: Curva de assimilação líquida de CO₂ em função da intensidade de irradiância de plantas transgênicas de <i>Solanum tuberosum</i> redução na expressão do gene <i>StSFC1</i>.	59
Figura 15: Curso diário da assimilação líquida de CO₂ de plantas transgênicas de <i>Solanum tuberosum</i> com redução na expressão do gene <i>StSFC1</i>.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies, número de acesso no GenBank e descrição das proteínas transportadoras pertencentes à MCF, cujas sequências obtidas no NCBI, Phytozome e Sol Genomics foram utilizadas neste trabalho.....	10
Tabela 2: Oligonucleotídeos específicos para a região do gene <i>nptII</i> utilizados para a confirmação dos transgenes 35S-RNAi-SFC1 em <i>Solanum tuberosum</i>...	12
Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados na qRT-PCR em <i>Solanum tuberosum</i>...	14
Tabela 4. Similaridades entre a sequência de aminoácidos do SFC1 de <i>Arabidopsis thaliana</i> com a de outras espécies.....	26
Tabela 5: Rendimento, número e peso médio de tubérculos em plantas transgênicas de <i>Solanum tuberosum</i> com redução na expressão de gene <i>StSFC1</i>	45

LISTA DE ABREVIATURAS

AAC	Carreador de ADP/ATP
ADNT1	Transportador de nucleotídeos de adenina
ADP	Adenosina difosfato
AGPase	ADP-glicose pirofosforilase
ATP	Adenosina trifosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albumina do soro bovino
CaMV	Vírus do mosaico da couve-flor
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
DIC	Transportador dicarboxilato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Enzima do Ácido desoxirribonucleico
DTC	Transportador di-tricarboxilato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EF1- α	Fator de alongamento1 - α
G6PDH	Glicose 6-fosfato desidrogenase
IRGA	Analisador de gases no infravermelho
KDa	Kilodáton
MCF	Família de carreadores mitocondriais
MS	Meio Murashige e Skoog
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NCBI	<i>Nacional Center for Biotechnology Information</i>
NDT	Transportador de nicotinamida adenina dinucleotídeo
NPK	Nitrogênio, fosfato e potássio
OD	Densidade ótica
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia de polimerase
p/v	Peso/volume
qRT-PCR	Reação em cadeia de polimerase em tempo real quantitativo
RNA	Ácido ribonucleico
SFC1	Transportador de succinato-fumarato
RNAi	Ácido ribonucleico de interferência
T-DNA	Ácido desoxirribonucleico transferido
TAIR	<i>The Arabidopsis Information Resource</i>
WT	<i>Wild type</i> (selvagem)
UCP	Proteína desacopladora

RESUMO

BRITO, Danielle Santos, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **Caracterização fisiológica do gene homólogo ao transportador mitocondrial succinato-fumarato (SFC1) de *Arabidopsis thaliana* em *Solanum tuberosum*.** Orientador: Adriano Nunes Nesi. Coorientadores: Edgard Augusto de Toledo Picoli, Marcelo Ehlers Loureiro e Wagner L. Araújo.

Este trabalho objetivou caracterizar o papel fisiológico do transportador mitocondrial de succinato-fumarato (mSFC1) em plantas de *Solanum tuberosum*. Para tanto, introduziu-se no genoma da batata um cassete contendo um fragmento do gene que codifica o SFC1 em *Arabidopsis thaliana* (*AtmSFC1*), cuja expressão foi reduzida pela técnica de RNA de interferência (RNAi). Por meio da técnica de PCR em tempo real a expressão do gene *StSFC1*, homólogo a *AtmSFC1*, foi quantificada. As linhas com menor expressão foram posteriormente cultivadas em casa de vegetação para as análises de trocas gasosas, parâmetros de fluorescência da clorofila *a* e de crescimento, bem como análises bioquímicas. Os resultados obtidos revelaram que, apesar de as linhas transgênicas apresentarem uma maior biomassa na parte aérea, a redução na expressão de *StSFC1* não proporcionou nenhuma alteração fisiológica e bioquímica significativa nas variáveis analisadas em folhas. Já em tubérculos, observou-se um decréscimo significativo nos níveis de amido nas linhas transgênicas, em relação ao controle. Os resultados obtidos sugerem que o gene SFC1 em batata parece possuir uma função fisiológica minoritária em tecidos autotróficos como folhas. Entretanto, em tecidos heterotróficos, como tubérculos em desenvolvimento, a ausência do transportador leva a alterações metabólicas que podem limitar o acúmulo e/ou a síntese de amido nos amiloplastos.

ABSTRACT

BRITO, Danielle Santos, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July de 2012. **Physiological characterization of the homologous gene to the mitochondrial succinate-fumarate carrier (SFC1) of *Arabidopsis thaliana* in *Solanum tuberosum*.** Adviser: Adriano Nunes Nesi. Co-advisers: Edgard Augusto de Toledo Picoli, Marcelo Ehlers Loureiro and Wagner L. Araújo.

This study aimed to characterize the role of the mitochondrial succinate-fumarate carrier (mSFC1) in *Solanum tuberosum*. To this end, it was introduced into the potato genome one cassette containing a gene fragment from *Arabidopsis thaliana*, which encodes the *AtmSFC1*, whose expression was reduced by the technique of interference RNA (RNAi). Through the technique of real time PCR gene expression of the *StSFC1*, homologous to *AtmSFC1*, was quantified. Lines with lower expression were subsequently grown under standard growth conditions for the analysis of gas exchange, chlorophyll *a* fluorescence parameters as well as growth and biochemical analyzes. The results revealed that while transgenic lines present a higher shoot biomass, reductions in the expression of *StSFC1* did not culminate in any significant changes in physiological and biochemical parameters analyzed in leaves. By contrast, significant decreased levels of starch in tubers of the transgenic lines, compared to the control, were observed. Those results suggest that the SFC1 in potato seems to have a minor physiological function in autotrophic tissues such as leaves. However, in heterotrophic tissues (e.g. tubers in development), the absence of this carrier leads to metabolic changes that may limit both the accumulation and/or synthesis of starch in amyloplasts.

1 INTRODUÇÃO

A operação simultânea de várias vias metabólicas é possível graças à compartimentação celular (Linka e Weber, 2010), fato este que se destaca como uma característica distintiva do metabolismo em células eucarióticas (Farré *et al.*, 2001; Lunn, 2007; Linka e Weber, 2010). Neste contexto, em células de tecidos autotróficos, as diferentes rotas metabólicas ocorrem principalmente em três organelas: cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos. Estas organelas participam de processos fundamentais como, fotossíntese, fotorrespiração, respiração, gliconeogênese e assimilação do nitrogênio (Laloi, 1999; Picault *et al.*, 2004; Sweetlove *et al.*, 2007).

Para um adequado funcionamento, os processos metabólicos necessitam de trocas rápidas de moléculas entre os diferentes compartimentos celulares. Esta comunicação metabólica é facilitada pela presença de proteínas específicas inseridas em suas membranas.

Na membrana interna mitocondrial, o transporte de metabólitos pode ser mediado por proteínas carreadoras pertencentes a uma família de transportadores mitocondriais (Mitochondrial Carrier Family, MCF; Picault *et al.*, 2004). Os membros desta família apresentam algumas características estruturais em comum, como estrutura primária com três domínios homólogos em tandem, os quais contêm aproximadamente 100 aminoácidos de comprimento. Além disso, cada domínio possui duas proteínas transmembrana do tipo α -hélice separadas por um 'loop' hidrofílico extramembrana (Picault *et al.*, 2004; Palmieri *et al.*, 2011).

Essas proteínas são relativamente pequenas, com massa molecular entre 30-34 kDa (Millar e Heazlewood, 2003; Picault *et al.*, 2004; Palmieri e Pierri, 2010),

podendo transportar uma variedade de moléculas que variam desde H^+ a NAD^+ (Palmieri *et al.*, 2011).

A estrutura básica comum a todos os membros da MCF sugere que todos carreadores surgiram de uma única sequência ancestral que foi duplicada e diferenciada em vários momentos. Contudo, a origem evolutiva da primeira proteína mitocondrial ainda não foi completamente elucidada. Cumpre ressaltar que provavelmente a estrutura tripartida dessas proteínas reflita também a estrutura da primeira MCF (Haferkamp e Schmitz-Esser, 2012).

Registre-se, entretanto, que as proteínas pertencentes à MCF não são restritas apenas as mitocôndrias, mas também estão presentes em outros compartimentos celulares (Bouvier *et al.*, 2006; Linka *et al.*, 2008; Palmieri *et al.*, 2009; 2011; Palmieri e Pierri, 2010). Assim, investigações em nível molecular e bioquímico demonstraram que alguns membros da MCF em plantas podem também estar presentes nas membranas de plastídios, como cloroplastos (Bouvier *et al.*, 2006; Palmieri *et al.*, 2009).

Até o final dos anos 90, somente seis transportadores mitocondriais foram sequenciados e caracterizados (Indiveri *et al.*, 1997). Porém, com o advento da era genômica e pós-genômica pelo menos 24 transportadores com características similares à MCF foram e estão sendo estudados (Catoni *et al.*, 2003; Picault *et al.*, 2004; Palmieri *et al.*, 2008b). Contudo, o papel fisiológico da maioria desses carreadores ainda não foi completamente esclarecido (Palmieri *et al.*, 2011; Haferkamp e Schmitz-Esser, 2012).

A caracterização de alguns transportadores mitocondriais possibilitou classificá-los com base em sua especificidade por substrato, sendo assim agrupados em quatro subfamílias, a saber: (i) nucleotídeos e dinucleotídeos; (ii)

di/tricarboxilatos e cetoácidos; (iii) aminoácidos; e (iv) outros substratos. Porém, cumpre ressaltar que, um mesmo substrato, pode ser transportado por mais de uma subfamília, assim como uma mesma subfamília, além de transportar preferencialmente um determinado substrato pode também ter afinidade por outros (Palmieri *et al.*, 2011).

De um ponto de vista fisiológico, dentre os transportadores até então caracterizados, pode-se destacar, principalmente aqueles envolvidos na respiração e na síntese de ATP: (i) AAC (ADP/ATP Carrier), que catalisa o efluxo de ATP para o citosol em um sistema de co-transporte com o ADP, cuja função é suprir ATP ao citosol (Klingenberg, 2008); (ii) UCPs (UnCoupling Proteins), que permitem o retorno de prótons do espaço intermembrana para a matriz mitocondrial (Sweetlove *et al.*, 2007); (iii) ADNT1 (Adenine Nucleotide Transporter), proteína que medeia o transporte de ATP da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana em troca de ADP citosólico (Palmieri *et al.*, 2008a); (iv) NDT (Nicotineamide Adenine Dinucleotide Transporter), localizado em cloroplastos (NDT1), e localizado em mitocôndrias (NDT2), ambos permitindo a importação de NAD^+ para o interior destas organelas onde este atua comoceptor de elétrons; e (v) há aqueles transportadores diretamente envolvidos no ciclo de Krebs e na assimilação de nitrato, como DTC (Dicarboxylate/Tricarboxylate Carrier), envolvido no transporte de ácidos di- e tricarboxílicos (e.g. 2-oxoglutarato), que é exportado da matriz mitocondrial para o citosol onde participa em reações envolvidas na assimilação de nitrogênio (Picault *et al.*, 2002), e DIC (Dicarboxylate Carrier) um transportador de dicarboxilatos, (e.g. malato e 2-oxoglutarato) que são exportados do citosol para a matriz mitocondrial. Percebe-se, portanto que esses transportadores caracterizados

até o momento têm enorme importância metabólica estando associados a inúmeros processos celulares.

Há quase uma década outro transportador mitocondrial, homólogo ao transportador de succinato-fumarato (ACR1) de *Saccharomyces cerevisiae*, foi identificado em *Arabidopsis thaliana* (Catoni *et al.*, 2003). Esse transportador foi denominado *AtmSFC1* (*mitochondrial succinate-fumarate carrier 1*). Estudos de complementação funcional realizados em leveduras mutantes, deficientes em ACR1, sugerem que *AtmSFC1* atue como transportador de succinato do citosol para o interior da matriz mitocondrial, ao passo que fumarato é transportado para o citosol (Catoni *et al.*, 2003). Foi verificado que a expressão do gene que codifica o *AtmSFC1* (At5g01340) ocorre em vários órgãos, a saber: folhas fonte e dreno, raízes, caules, flores abertas e fechadas. Verificou-se ainda uma maior expressão em flores nos estádios iniciais do desenvolvimento e em raízes (Catoni *et al.*, 2003). Em adição, estudos de expressão gênica *in silico* sugerem uma expressão praticamente constitutiva de *AtmSFC1* em vários tecidos e em distintos estádios de crescimento da planta, tais como: antese, senescência foliar, pólen maduro e na germinação deste, assim como na diferenciação e expansão das pétalas, dentre outros (Brito e Nunes-Nesi, resultados não publicados).

Acredita-se, portanto, que a expressão de *AtmSFC1* em órgãos e tecidos com alta atividade metabólica, como descrito anteriormente, possa ser explicada, ao menos parcialmente pela atividade do ciclo do glioxilato no glioxissomo, durante a mobilização de ácidos graxos como fonte de carbono para promover a germinação e o estabelecimento da plântula (Eastmond e Graham, 2001; Kunze *et al.*, 2006; Graham, 2008). Esta atividade do ciclo do glioxilato resultaria em um maior fornecimento de succinato ao citosol, o qual é então importado pela mitocôndria com

a exportação de fumarato pelo transportador *AtmSFC1*, sendo então metabolizado por reações do ciclo de Krebs na matriz mitocondrial (Palmieri *et al.*, 1997; Catoni *et al.*, 2003; Pracharoenwattana *et al.*, 2010). Neste contexto, acredita-se também que o *AtmSFC1* represente a única forma de importação de succinato do citosol pela mitocôndria. Por outro lado, a expressão de *AtmSFC1* em folhas maduras, que pode estar relacionada com a mobilização de reservas durante a senescência foliar, não pode ser explicada simplesmente pelo aumento na atividade do ciclo do glioxilato, como em sementes, uma vez que alguns dos genes envolvidos neste ciclo (e.g. sintetase do malato e isocitrato liase) não tem seus níveis de expressão elevados durante a senescência foliar (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2010).

Percebe-se então, que *AtmSFC1* parece estar envolvido em eventos cruciais do ciclo de vida vegetal sendo de fundamental importância o entendimento do papel fisiológico dessa proteína. Entretanto, apesar das evidências descritas, até o momento, um único trabalho foi realizado objetivando compreender a contribuição fisiológica desse transportador em plantas. Contudo, essa caracterização realizada em *A. thaliana* permitiu apenas, a identificação de tecidos e órgãos vegetais onde essa proteína é mais expressa (Catoni *et al.*, 2003).

Salienta-se, assim, que o sequenciamento completo do genoma de outras espécies vegetais como, arroz (2001), soja, (2008), milho (2009), e mais recentemente a batata (2011), deu um maior respaldo e confiabilidade na utilização dessas espécies, de grande valor comercial, em pesquisas com o intuito de verificar a cinética e especificidade por substrato de transportadores de membrana. Neste sentido, tubérculos de batatas (*Solanum tuberosum*), por exemplo, têm sido utilizados como um sistema modelo para estudar a estrutura e regulação de rotas metabólicas chaves do metabolismo heterotrófico (Riewe *et al.*, 2008), especialmente na

biossíntese de amido (Geigenberger, 2003; Geigenberger e Fernie, 2006) e rotas respiratórias (Fernie *et al.*, 2004). Desse modo, estudos fisiológicos detalhados em várias espécies são imprescindíveis para uma melhor compreensão da forma pela qual o transporte de um determinado metabólito é importante para o metabolismo celular, tanto em tecidos autotróficos quanto em heterotróficos.

Diante do exposto acima e em função da caracterização bioquímica da proteína SFC1 não ter sido ainda completa, constitui-se objetivo desta pesquisa elucidar o papel fisiológico de um gene homólogo ao SFC1 de *A. thaliana* em plantas transgênicas de batata. Assim, para identificar e compreender o possível papel desse transportador, estudos mais detalhados foram realizados em órgãos autotróficos e heterotróficos. Os resultados obtidos são discutidos em função do conhecimento recente das interações metabólicas entre diferentes vias metabólicas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP), e nos Laboratórios de Nutrição e Metabolismo Vegetal e Molecular de Plantas do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

2.1 Clonagem e transformação de plantas de *Solanum tuberosum*

Foi introduzido em plantas de *Solanum tuberosum*, via *Agrobacterium tumefaciens*, um cassete contendo um fragmento do gene de *Arabidopsis thaliana*, que codifica o transportador de succinato-fumarato (SFC1; At5g01340) cuja expressão foi reduzida via construção CaMV 35S-SFC1-RNAi (RNA de interferência) (Figura 1).

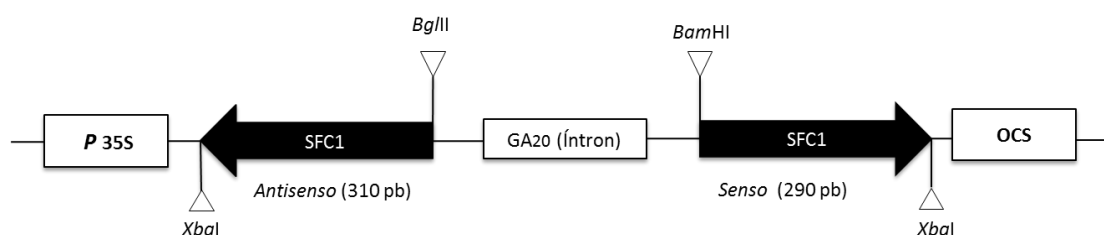


Figura 1: Representação esquemática da construção RNAi utilizada para a produção de plantas transgênicas de *Solanum tuberosum*. As setas representam os fragmentos do gene SFC1 de *Arabidopsis thaliana* e o sentido de transcrição. Nas extremidades das setas estão as enzimas de restrição. Entre as setas está a região intergênica (o íntron GA20). O retângulo à esquerda representa a região promotora (CaMV 35S), e o retângulo à direita representa a região terminadora (OCS).

Essa construção foi feita no Instituto Max Planck para Fisiologia Molecular de Plantas (Golm-Potsdam, Alemanha) e as plantas transformantes foram gentilmente cedidas pelo Dr. Alisdair R. Fernie.

2.2 Material vegetal e condições de cultivo

Após o processo de transformação, as linhas transgênicas de batata (*Solanum tuberosum* L. cv. Desiree) foram cultivadas *in vitro*, em sala de crescimento sob fotoperíodo 16h-luz/8h-escuro e temperatura média de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, mediante subcultivos em meio MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 2% de sacarose (*p/v*).

Antes de serem transferidas para casa de vegetação, as plantas de batata foram aclimatadas durante duas semanas sob temperatura ambiente e luz artificial. Na primeira semana, as plantas oriundas da cultura *in vitro* foram transplantadas para recipientes plásticos transparentes com capacidade de $0,3 \text{ dm}^3$, contendo uma folha de papel Germtest[®] (5 cm^2), o qual foi disposto no interior do recipiente como base de apoio para a planta. Estes recipientes foram umedecidos com água comum, mantendo o papel Germtest[®] umedecido facilitando a absorção de água através das raízes. Em seguida, estes recipientes foram cobertos com sacos plásticos transparentes simulando o ambiente da cultura *in vitro*. Após três a quatro dias sob estas condições, furos nos sacos plásticos foram feitos para favorecer a evapotranspiração. Na segunda semana, as plantas foram transferidas para novos recipientes plásticos contendo substrato comercial Plantmax[®]. Estes recipientes apresentavam furos em sua base e foram colocados numa bandeja contendo água, a qual mantinha o substrato úmido por capilaridade.

Após a aclimação, as plantas foram transferidas para vasos plásticos com capacidade de 3 dm^3 contendo substrato fertilizado com NPK na proporção 4:14:8 sendo utilizado 10 kg de dessa formulação para cada 25 kg de substrato e mantidos em casa de vegetação com temperatura (com variação entre 15 e 28°C) e

luminosidade (com variação entre 60 e 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ambiente. A irrigação foi realizada de maneira a manter a umidade do substrato próxima à capacidade do vaso definida como a máxima retenção de água no substrato depois que o excesso tenha sido drenado.

Como controle dos experimentos foi utilizado plantas de batatas não transformadas da mesma cultivar, a saber Desiree.

2.3 Análise da sequência do gene SFC1

A sequência de aminoácidos da proteína SFC1 de *Arabidopsis thaliana* obtida no site *The Arabidopsis Information Resource-TAIR* (<http://www.arabidopsis.org>) foi utilizada para encontrar a sequência de aminoácidos em *Solanum tuberosum* e *Solanum lycopersicum*, através da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) no banco de dados Sol Genomics Network (<http://solgenomics.net/tools/blast/index.pl>).

No banco de dados do Phytozome (<http://www.phytozome.org>) e *Nacional Center for Biotechnology Information* (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) um BLAST, também foi feito para encontrar peptídeos homólogos ao SFC1 de *A. thaliana*. As sequências de aminoácidos foram alinhadas pelo programa de alinhamento múltiplo ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw>) e GENEDOC (Nicholas e Nicholas, 1997). Foi utilizado o programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) para a construção da árvore filogenética. O método utilizado para a construção da árvore foi o *Neighbor-joining*. Para avaliar a confiabilidade das árvores filogenéticas foi aplicado um *bootstrap* de 1000. Os organismos das quais as sequências foram obtidas estão listados na Tabela 1.

Tabela 1: Espécies, número de acesso no GenBank e descrição das proteínas transportadoras pertencentes à MCF, cujas sequências obtidas no NCBI, Phytozome e Sol Genomics foram utilizadas neste trabalho.

Espécie	Número de acesso	Descrição
<i>Brachypodium distachyon</i>	XP003558152	
<i>Glycine max</i>	XP003519192	
<i>Populus trichocarpa</i>	XP002322991.1	
<i>Solanum lycopersicum</i>	*	Proteína putativa: transportador de succinato/ fumarato
<i>Solanum tuberosum</i>	*	
<i>Vitis vinifera</i>	XP002263020.1	
<i>Ajellomyces dermatitidis</i>	EEQ84397.1	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP195754.1	
<i>Candida albicans</i>	EEQ46462.1	Transportador de succinato/fumarato
<i>Coprinopsis cinérea</i>	XP001830006.2	
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	CAA80973.1	
<i>Capsella rubella</i>	*	
<i>Citrus clementina</i>	*	
<i>Manihot esculenta</i>	*	Transportador di/tricarboxílico
<i>Sorghum bicolor</i>	*	
<i>Oryza sativa</i>	ABF95404.1	Transportador mitocondrial
<i>Zea mays</i>	NP001130180.1	Proteína não caracterizada
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP196509	Transportador dicarboxílico
<i>Ricinus cummunis</i>	XP002530508.1	Transportador tricarboxílico
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP568894	Proteína desacopladora – UCP2
	NP190979.1	Proteína desacopladora – UCP1

* Número de acesso não identificado.

2.4 Seleção das linhagens transgênicas de *Solanum tuberosum*

2.4.1 Preparação das linhas transgênicas

As mudas transgênicas de batata apresentavam como agente de seleção o antibiótico canamicina (Kan). O gene que confere resistência à Kan é o neomicina fosfotransferase (*nptII*), o qual codifica um aminoglicosídeo 3-fosfotransferase que inativa este antibiótico por fosforilação (Libiakova *et al.*, 2001). Desse modo, plantas com 20 dias de subcultivo foram individualizadas e transferidas para tubos de ensaio contendo 12 mL de meio MS (Murashige e Skoog, 1962), acrescido de 20 g L⁻¹ de sacarose. Para os testes de sobrevivência dos explantes ao antibiótico, foram adicionados ao meio de regeneração 50 mg L⁻¹ de Kan (Barrell *et al.*, 2002). Após 30 dias de subcultivo, coletaram-se folhas completamente expandidas das plantas *in vitro* para extração de DNA.

2.4.2 Extração do DNA total

A extração de DNA total foi realizada segundo Doyle e Doyle (1987). Amostras de folhas (~30 mg), congeladas em nitrogênio líquido foram maceradas em líquido até a obtenção de um pó fino. Após a maceração adicionou-se 400 µL de tampão de extração (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; CTAB 2%; EDTA 20 mM; NaCl 1,4 mM; PVP 1%; β-Mercaptoethanol 1µL mL⁻¹) e mantido em banho-maria com agitação leve a 60 °C por 20 minutos. Em seguida, foram adicionados nos tubos 400 µL de clorofórmio, sendo posteriormente homogeneizados no vórtex por 5 segundos e centrifugados a 16200 x g por 5 minutos à temperatura ambiente. Retirou-se 200 µL do sobrenadante, o qual foi transferido para outro tubo de 1,5 mL e acrescido 200 µL de isopropanol e incubados por 30 minutos a -20 °C. Após este tempo, essa

solução foi centrifugada a 16200 x g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 200 µL de etanol 70% (v/v). Este sobrenadante foi posteriormente descartado, sendo o precipitado seco à temperatura ambiente. Em seguida, o precipitado foi ressuspendido em 20 µL de água desionizada autoclavada. Os tubos contendo DNA foram armazenados a -20 °C.

2.4.3 Triagem dos transformantes via PCR

Para selecionar os transformantes contendo a construção RNAi para o gene de interesse foi realizada uma reação de PCR, com oligonucleotídeos específicos para a região do *nptII* (Tabela 2). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% para a confirmação do genótipo mutante. As amplificações foram realizadas com a enzima *Taq* DNA polimerase (Phoneutria), conforme as instruções do fabricante, em um termociclador programado para realizar uma desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos; 58 °C por 30 segundos e 72 °C por 45 segundos, e uma extensão final de 72 °C por 1 minuto.

Tabela 2: Oligonucleotídeos específicos para a região do gene *nptII* utilizados para a confirmação dos transgenes 35S-RNAi-SFC1 em *Solanum tuberosum*.

Identificação	Sequência
KAN 227	5'-AGTGACAACGTCGAGCACAG-3'
KAN 611	5'-GCGTTCAAAAGTCGCCTAAG-3'

2.4.4 Análise de expressão via qRT-PCR

Após quatro semanas em casa de vegetação, folhas totalmente expandidas foram coletadas e utilizadas para isolamento de RNA total. Este foi extraído utilizando o TRIzol[®] Reagente (Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, o RNA total foi submetido a um tratamento com DNase RNase-free (Invitrogen[™]). As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro ao comprimento de onda de 260 nm. A qualidade do RNA foi avaliada, conforme a integridade das bandas do RNA ribossômico em gel de agarose 1% (p/v).

A transcrição reversa foi realizada com 2 µg de RNA com o kit ImProm-II^(™) Reverse Transcription System (Promega, Brasil) utilizando Oligo (dT)₁₅ seguindo as recomendações do fabricante. As sequências do gene *StSFC1* (denominação SFC1 para *Solanum tuberosum*) foram desenhadas a partir de sequências homólogas de cDNA de *Solanum lycopersicum*, as quais eram homólogas a sequência de cDNA de *Arabidopsis thaliana*, utilizando *QuantPrime-qPCR primer designed tool* (<http://www.quantprime.de>). Como controle endógeno, para normalização dos valores da expressão gênica, foi utilizado o oligonucleotídeo, **ef1-α** (número de acesso: AB061263.1). Os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do gene endógeno e do gene de interesse se encontram listados na Tabela 3.

Todas as amostras foram amplificadas em triplicata segundo o seguinte programa: 94 °C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 15 segundos, 56 °C por 15 segundos e 72 °C por 15 segundos. Para confirmar a presença de um único produto de amplificação, específico para cada reação, uma curva de desnaturação foi realizada imediatamente após a amplificação. Os produtos foram desnaturados a 94 °

C por 15 segundos, e reanelados a 60 °C por 1 minuto e 94°C por 15 segundos. As leituras foram realizadas em um equipamento Applied Biosystem StepOnePlus™ Software v2.0

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados na qRT-PCR em *Solanum tuberosum*.

Identificação	Sequência
<i>St</i> SFCa	5'-TATTGTCACGCCCTTTGAGGTG-3'
<i>St</i> SFCb	5'-AGGACTTAATCCTCTCTGCTGCTG-3'
ef1 α F	5'-ATTGGAAACGGATATGCTCCA-3'
ef1 α R	5'-TCCTTACCTGAACGCCTGTCA-3'

Os níveis de expressão foram determinados pelo método comparativo do C_T (*Threshold Cycle*) segundo Schmittgen e Livak (2008):

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = [(C_T \text{ gene de interesse} - C_T \text{ controle endógeno}) \text{ amostra A} - (C_T \text{ gene de interesse} - C_T \text{ controle endógeno}) \text{ amostra B}]$$

A qualidade dos produtos de amplificação foi avaliada em gel de agarose 1% (*p/v*).

2.5 Análises fisiológicas

As três linhagens de menor expressão do gene *St*SFC1 foram selecionadas para as avaliações fisiológicas descritas abaixo. Assim, as linhagens transferidas para casa de vegetação foram: WT (controle) e as transgênicas, L86, L81 e L71.

2.5.1 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*

A caracterização de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* foram feitas em folhas completamente expandidas de plantas com quatro semanas na casa de vegetação. Foi utilizado um sistema aberto com um analisador de gases a infravermelho com fluorômetro acoplado (IRGA, Li-cor Inc. LI-6400XT, Lincoln, EUA) para a determinação da taxa de assimilação líquida do carbono (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), concentração interna de CO_2 (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$), transpiração (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), fluorescência mínima (F_0), fluorescência máxima emitida (F_m) e os demais parâmetros relacionados à fluorescência sob concentração de CO_2 e temperatura e vapor de água ambientes. A estimativa destes parâmetros relacionados à fluorescência procedeu-se conforme descrito por Lima *et al.* (2002).

2.5.2 Análise da taxa respiratória em tubérculos

A taxa de consumo de oxigênio em discos de tubérculos seguiu a metodologia de Lytovchenko *et al.* (2005) com algumas adaptações. Na 11ª semana dois discos frescos de tubérculos (6 mm de diâmetro e 2 mm de espessura) foram coletados para análise da taxa de consumo de oxigênio. Estes discos foram transferidos para uma câmara de fase líquida no eletrodo de oxigênio (tipo Clark) contendo 2 mL de solução (10 mM MES/KOH, pH 6,5 e 20 mM de sacarose). Cada leitura foi realizada durante 15 min. A câmara foi lavada várias vezes antes de cada subsequente amostra. Após serem retirados os discos foram lavados com solução 10 mM MES/KOH, pH 6,5 antes de serem acondicionados na câmara. Após a leitura, os discos foram pesados para normalização.

2.5.3 Parâmetros biométricos

Foram avaliados número, peso médio de tubérculos, e massas seca da parte aérea e da raiz (Ferne *et al.*, 2001).

2.6 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas foram feitas em folhas e em tubérculos. Para as análises em folhas, dois discos foliares do segundo folíolo da terceira folha completamente expandida foram coletados em quatro horários distintos: 5 h, 12 h, 18 h e 00 h. Para as análises em tubérculos, 30 discos por amostra foram coletados e macerados no almofariz em nitrogênio líquido. Em um tubo de 1,5 mL, pesou-se 50 mg de massa fresca do macerado. As amostras foram armazenadas a -80 °C até a realização das análises.

2.6.1 Processamento e extração

As amostras acondicionadas nos tubos de 1,5 mL foram pulverizadas em nitrogênio líquido e posteriormente os metabólitos foram extraídos em etanol (Gibon *et al.*, 2004; Nunes-Nesi *et al.*, 2005; 2007). Para as amostras foliares foram adicionados em cada tubo 250 µL de etanol 98%, seguido de uma homogeneização, incubação e agitação por 20 min a 80 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 16200 x g a 4 °C. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado em um novo tubo de 2 mL e o precipitado submetido a duas novas extrações consecutivas com 150 µL e 250 µL de etanol 80% e 50%, respectivamente. Os extratos etanólicos foram combinados num mesmo tubo para posterior quantificação

dos metabólitos. O precipitado foi lavado duas vezes em etanol 80% e armazenados a -20 °C, para posterior quantificação de amido e proteína (Gibon *et al.*,2004).

As alíquotas de etanol 98, 80 e 50% para os tubérculos foram 500, 300 e 500 µL respectivamente sendo adotados os mesmos procedimentos de extração.

2.6.2 Determinação dos pigmentos em tecidos foliares

Para quantificação dos pigmentos foi utilizado o protocolo descrito por Porra *et al.* (1989). Após a extração, foram homogeneizados em uma microplaca de 96 poços 25 µL do extrato etanólico, 25 µL de etanol 80% e 120 µL de etanol 98%. Por meio de um leitor de microplacas, modelo OptiMax Tunable Microplate Reader, foram feitas leituras de absorbâncias de cada amostra a 645 e 665 nm. Uma vez obtidas as absorbâncias foram calculadas as concentrações de clorofilas *a* e *b* pelas equações A e B, sendo o conteúdo total normalizado pelo peso fresco da amostra.

$$A- \text{Clorofila } a = 5,21 * \text{Abs}_{665} - 2,07 * \text{Abs}_{645}$$

$$B- \text{Clorofila } b = 9,29 * \text{Abs}_{645} - 2,74 * \text{Abs}_{665}$$

2.6.3 Determinação de açúcares

Os teores de glicose, frutose e sacarose foram determinados na fração solúvel em etanol segundo Fernie *et al.* (2001). Para uma microplaca de 96 poços foi preparada uma mistura contendo tampão (HEPES/KOH 0,1 M, MgCl₂ 30 mM pH 7,0), ATP 3mM, NADP 1,4mM e 56 U de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) [5mg mL⁻¹]. Uma vez preparada a mistura, 160 µL da mesma foi adicionada a cada poço da microplaca, a qual foram acrescidos 25 µL do extrato etanólico e 25 µL de

etanol 80%. No mesmo leitor de microplacas descrito acima, foram feitas leituras de absorbâncias das respectivas amostras a 340 nm em intervalos de um minuto. Uma vez estabilizada a OD foram adicionadas sucessivamente 10 µL de hexocinase [1,5U/poço], 10 µL de fosfoglicose isomerase [1,5U/poço] e 10 µL de invertase [5U/poço]. O volume final de cada poço não pode exceder 240 µL, uma vez que a equação utilizada para a quantificação está baseada na Lei de Beer-Lambert. Os valores da equação foram estabelecidos conforme o volume final da solução na placa. Para calcular a concentração dos respectivos açúcares foi utilizada a equação abaixo:

$$\mu\text{mol NADPH} = \Delta\text{OD} / (2,85 * 6,22)$$

2.6.4 Determinação de aminoácidos totais

Para quantificação do conteúdo de aminoácidos totais foi utilizado o protocolo descrito por Gibon *et al.* (2004). Em uma microplaca foram adicionados em cada poço 50 µl de tampão citrato 1 M, pH 5,2 com ácido ascórbico 0,2% (p/v), 25 µL do extrato etanólico, 25 µL de etanol 70% (v/v) e 100 µL de solução de ninhidrina 1% (p/v em etanol 70%) totalizando um volume final, em cada poço, de 200 µL. Em seguida, a placa foi selada com uma fita de alumínio, resistente a alta temperatura (3M[®] Modelo 425 HD) e incubada por 20 min a 95 °C. Após a incubação, as placas foram centrifugadas por 10 segundos a 9600 x g e posteriormente, as amostras foram transferidas para uma nova microplaca e foram feitas leituras a 570 nm.

Para a determinação do conteúdo total de aminoácidos nas amostras, foi realizada uma curva padrão de Leucina nas seguintes concentrações: 0, 0,01, 0,025, 0,05, 0,1 e 0,25 mM. Uma vez estimadas as concentrações de aminoácidos em cada poço, os valores foram normalizados pelo peso fresco da amostra.

2.6.5 Determinação de nitrato

O conteúdo de nitrato foi realizado seguindo o protocolo descrito por Fritz *et al.* (2006). Em uma microplaca (P1) foram adicionados em cada poço 10 μ L de tampão, constituído de tampão fosfato 1M, pH 7,5 e 0,5 μ L de NADPH na concentração de 50 mM preparado em NaOH 5 mM, 10 μ L de nitrato redutase [0,005U/poço preparada em tampão fosfato 0,1M], 29,5 μ L de H₂O e 50 μ L do extrato etanólico para as análises em folhas e 10 μ L para as análises em tubérculos. Na presença da nitrato redutase (NR), o nitrato é reduzido a nitrito. De maneira a descontar o conteúdo de nitrito já presente nas amostras e quantificar apenas o conteúdo de nitrito oriundo da redução do nitrato, outra microplaca (P2) foi montada, na qual a enzima NR não foi adicionada sendo essa alíquota substituída por 10 μ L de H₂O. Uma vez montada as duas placas, estas foram incubadas no escuro por 30 minutos a 25 °C. Passado este tempo, foram adicionados a cada poço das respectivas placas 15 μ L de fenazinametossulfato 0,25mM, e em seguida, incubadas novamente por mais 20 min a 25 °C. Posteriormente, foram adicionados 60 μ L de sulfanilamida 1% (p/v em ácido fosfórico 3M) e 60 μ L de Dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina 0,02% (p/v). Por fim, ambas as placas foram incubadas por mais 10 min a 25 °C, e em seguida lidas em um leitor de microplacas a 540 nm. Para determinar apenas o conteúdo de nitrato presente nas amostras, o valor da

absorbância de cada amostra da microplaca P1 foi subtraído do valor da absorbância da microplaca P2.

Para a determinação do conteúdo total de nitrato nas amostras, foi realizada uma curva de calibração de nitrato utilizando KNO_3 nas seguintes concentrações: 0; 0,4; 0,8; e 1,6 μM , para amostras provenientes das folhas e 0; 0,4; 0,8; e 1,6 mM para os tubérculos. Uma vez calculado as concentrações de nitrato nos poços, os valores foram normalizados pelo peso fresco da amostra.

2.6.6 Determinação de malato e fumarato

Em uma microplaca, foram adicionados, em cada poço, 25 μL de tampão (Tricina/KOH 0,4M, pH 9), 10 μL de MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio 10 Mm), 5 μL de NAD^+ [60 mM], 2 μL de fenazinaetosulfato [20 mM], 10 μL de Triton X100 10% (v/v), 33 μL de H_2O e 10 μL do extrato etanólico. Em seguida, através de um leitor de Elisa (anteriormente mencionado) foram lidas as absorbâncias das respectivas amostras a 570 nm em intervalos de um minuto. Uma vez estabilizada a OD foram adicionadas sucessivamente 10 μL de malato desidrogenase [1000U mL^{-1} em tampão tricina 0,4M, pH 9] e 10 μL de fumarase [100U mL^{-1} em tampão tricina 0,4M, pH 9]. Para calcular a concentração de malato e fumarato nas amostras, uma curva, utilizando ácido málico e ácido fumárico, foi preparada com as seguintes concentrações: 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 2,0 mM, para as análises em folhas. Já para as análises em tubérculos preparou-se a curva padrão nas seguintes concentrações: 0; 150; 300; 450; 600; 800; 1000 μM . Uma vez calculado as concentrações de malato e fumarato nos poços, os valores foram normalizados pelo peso fresco da amostra.

2.6.7 Determinação de proteína

Para quantificação do conteúdo de proteína total foi utilizado o protocolo descrito por Gibon *et al.* (2004). Aos tubos contendo o precipitado, correspondente a fração insolúvel em etanol, foram adicionados 400 μL de NaOH 0,1M. Após ressuspender o precipitado, as amostras foram incubadas por 1 hora a 95 °C sob agitação de 808 x g. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 16200 x g por 5 minutos. Em seguida, retirou-se 2 μL do sobrenadante, o qual foi adicionado em uma microplaca contendo em cada poço 180 μL de reagente de Bradford 1/5. Em um leitor de microplacas as absorbâncias foram determinadas a um comprimento de onda de 595 nm. Quanto ao conteúdo de proteína de cada amostra, esta foi determinada através de uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) composta com as seguintes concentrações: 0; 0,08; 0,16; 0,24; 0,32; 0,40; 0,60; 0,80 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de proteína. O conteúdo de proteína foi normalizado pelo peso fresco das amostras.

2.6.8 Determinação de amido

Aos tubos contendo o precipitado suspenso em NaOH 0,1 M utilizado na determinação de proteína, foram adicionados 70 μL de ácido acético 1M para a neutralização do extrato. Os tubos foram então agitados com auxílio de um agitador de tubos e em seguida 40 μL da suspensão foram coletados e dispostos em cada poço da microplaca. Para degradação do amido foi preparado um mix contendo as enzimas amiloglicosidase e α -amilase ressuspendidas em acetato de sódio 0,5M pH 4,9 (na proporção de que para cada 25 mL de acetato de sódio 0,5M pH 4,9, utiliza-se 500 μL de amiloglicosidase e 5 μL de α -amilase). Desta solução, retirou-se 60 μL , o qual

foi adicionado aos 40 μL da suspensão previamente adicionados nos poços da microplaca. Em seguida, a placa foi selada com uma fita de alumínio resistente a alta temperatura e incubada por 1 hora a 55 $^{\circ}\text{C}$. Passada esta etapa, as placas foram centrifugadas por 10 segundos a 9600 x g e, em seguida 50 μL (para folhas) e 10 μL (para tubérculos) da suspensão foi transferido para uma nova placa onde foram adicionadas a cada poço 160 μL de tampão (HEPES/KOH 0,1 M, MgCl_2 30 mM pH 7,0), ATP 3mM, NADP 1,4mM e 80 μL de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) [0,7U μL^{-1}]. Por meio de um leitor de microplacas, mencionado anteriormente, foram lidas as absorvâncias das respectivas amostras a 340 nm em intervalos de um minuto. Uma vez estabilizada a OD foram adicionados 10 μL de hexoquinase [2U/poço]. Para calcular a concentração de glicose e, por sua vez o conteúdo de amido, foi utilizada a equação abaixo. Os valores foram normalizados pelo peso fresco dos discos das amostras.

$$\mu\text{mol NADPH} = \Delta\text{OD}/(2,85*6,22)$$

2.7 Incubação de discos de tubérculos com [^{14}C]-Glicose

2.7.1 Incubação com [1- ^{14}C]-Glicose e [3,4- ^{14}C]-Glicose

Seguindo o protocolo de Nunes-Nesi *et al.* (2005), com algumas modificações, tubérculos em desenvolvimento foram removidos das plantas com onze semanas de idade. Foi retirado um cilindro (8 mm de diâmetro), e cortado em discos de (1-2 mm de espessura). Estes discos foram lavados várias vezes em tampão (10 mM MES/KOH, pH 6,5). Em seguida, os discos (dez de cada genótipo) foram colocados em um Erlenmeyer de 125 mL contendo 10 mL de meio de incubação (10 mM MES/KOH, pH 6,5; 50 mM de glicose não marcada; e 0,074MBq/frasco de [1-

^{14}C]-Glc ou [3,4- ^{14}C]-Glc, estas duas em frascos distintos) e incubados por 6 h sob agitação de 80 rpm. Os frascos foram vedados com parafilme, e o $^{14}\text{CO}_2$ foi coletado em 0,5 mL de solução KOH 10% (p/v), sendo posteriormente quantificado por um contador de cintilação líquida. Após o término do experimento, os discos foram lavados, secos em papel toalha e a massa fresca foi determinada.

2.7.2 Incubação com [U- ^{14}C]-Glicose

Seguindo o protocolo de Nunes-Nesi *et al.*, (2005) com algumas alterações, adicionou-se ao meio de incubação 0,037MBq/frasco de [U- ^{14}C]Glc e 50 mM de glicose não marcada. As amostras ficaram incubadas por 5 h, sendo coletados dois discos por frasco em cinco tempos distintos: 30, 60, 120, 240; e 300 minutos. Os discos foram lavados com solução tampão, pesados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a $-80\text{ }^\circ\text{C}$. O $^{14}\text{CO}_2$ foi coletado em 0,5 mL de solução KOH 10% (p/v), sendo posteriormente quantificado por contador de cintilação líquida. A massa fresca foi determinada como indicado no item anterior.

2.8 Análises estatísticas

O experimento consistiu de quatro genótipos com seis repetições de cada. O delineamento foi inteiramente casualizado. A unidade experimental foi composta por uma planta por vaso. Testes *t* foram realizados utilizando o algoritmo incorporado no Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Seattle, WA, EUA). Variâncias desiguais foram assumidas e tomadas em consideração nos cálculos. Foram considerados significativos os valores com $P < 0,05$ com o teste *t*.

3 RESULTADOS

3.1 Análise da sequência do gene SFC1

A sequência de aminoácidos do transportador mitocondrial SFC1 de *A. thaliana* codificado pelo gene *At5g01340* (banco de dados TAIR) foi utilizada em uma busca por sequências de aminoácidos homólogos a este transportador para as espécies *S. tuberosum* e *S. lycopersicum*. Essa busca foi feita no banco de dados da família Solanaceae no website *Sol Genomics Network* (<http://solgenomics.net/tools/blast/index.pl>).

Os genes encontrados em tomate e em batata codificam uma proteína de 309 aminoácidos, semelhantemente à proteína encontrada em *A. thaliana*. Ressalte-se, também, que essas proteínas apresentam domínios conservados característicos de todos os membros pertencentes à família MCF. Além disso, o alinhamento realizado indicou uma elevada similaridade destas proteínas com o SFC1 de *A. thaliana* (79% para batata e 80% para tomate; Figura 2 e Tabela 4).

Utilizando a sequência de SFC1 de *A. thaliana* realizou-se uma busca de sequências similares em bancos de dados, utilizando a ferramenta BLAST na página do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e também na página do PHYTOZOME (<http://www.phytozome.org>). Essa análise permitiu a identificação de algumas proteínas putativas como sendo membros da família MCF. Estas sequências foram alinhadas e também revelaram alto grau de similaridade ao transportador SFC1 de *A. Thaliana* (Figura 2). Essas proteínas têm sido descritas como proteínas putativas ao passo que outras encontradas no Phytozome são descritas como transportadores de ácidos di-tricarboxílicos. As espécies e a similaridade com a sequência de SFC1 estão apresentadas na Tabela 4.

```

Levedura : -----MSQKKKASHFAINLMAGGTAAGLFEALICCHPLDTIKVEMQIYRVAGIEHVKPPCFIKTKRFTIYQKCEGFLALYKGLGAVVIG : 81
Arabidopsi : -----MATRTESRKKIIPPYNKAVSGLGGVVEACCLQPIDVIKTRQLQDRVCA-----YKGI AHCCSKVVRTEGVRALWKGLTPPFATH : 78
Batata : -----MAEENSRSRKKIIPPYNKAVISGLGGIVEASCLQPIDVIKTRQLQDRAGA-----YKGI VHCCSTIVNNEGVRALWKGLTPPFATH : 79
Tcmate : -----MAEENSRSRKKIIPPYNKAVISGLGGIVEASCLQPIDVIKTRQLQDRAGA-----YKGI AHCCSTIVNNEGVRALWKGLTPPFATH : 79
Álamo : -----MSQESSNDKRPKTIIPPYNKAVISGLGGAVEASCLQPIDVIKTRQLQDRSGN-----YKGI IHCCSTIVKTEGVRALWKGLTPPFATH : 80
Mamona : ----- : -----
Soja : -----MPFTTYCLEGEQIKSPSIMKQDVAQDNTNSYSKNSIIPPYNKAVISGLGGIMEASCLQPIDVIKTRQLQDRSGN-----YKGI IHCCATISRTGVRALWKGLTPPFATH : 103
Uva : -----MSESKKTIPPYVKALSGSIGGIVEASCLQPIDVIKTRQLQLTSGT-----YKGI IHCCATVYRTEGVRALWKGLTPPFATH : 76
Arroz : MAAAAAPSSSSPPPPMSPAPQAASPAEIR-----RGGRAPVPPYVKAAGSVGGVMEACCLQPIDVIKTRQLQDRSCA-----YRGI AHCCSTVVRSEGVRALWKGLTPPFATH : 104
Milho : -MASTSSSSPQPAAAAASPGAASSPELRRAGGGRGGPPPVPYVKAAGSVGGVMEACCLQPIDVVKTRQLQDRSCA-----YRGI AHCCATVARAEGVRALWKGLTPPFATH : 108

Levedura : T I P M A I R F S Y E F Y R L L V N K E S G I V S T G N T F V A G V G A G I T E A V I V V N F M E V V K I R L C A C H L T P S E P N A G P K Y N N A I H A A Y T I V E E G V S A L Y R G V S I T A A R Q A T N C G E N F T V Y : 196
Arabidopsi : L T L K Y A L R M G S N A M F C T A F K D S E T G K V S N R G R F L S G F G A G V I E A L I V T P P E V V K I R L C C Q K G L S P E T F R -----YKGI IHCARTIVREESILGLWSCRATVVMRNGTNCAAMFTAR : 190
Batata : L T L K Y A L R M G S N A V F C T A F K D S E T G K L S F C G R L N A G F G A G V I E A L I V T P P E V V K I R L C C Q R G L S P E L L R -----YKGI PVHCARMIVREEGVILGLWACASFTVMRNGTNCAAMFTAR : 191
Tcmate : L T L K Y A L R M G S N A V F C T A F K D S E T G K L S F C G R L N A G F G A G V I E A L I V T P P E V V K I R L C C Q R G L S P E L L R -----YKGI PVHCARMIVREEGVILGLWACASFTVMRNGTNCAAMFTAR : 191
Álamo : L T L K Y A L R M G S N A V F C S A F K D S E T G K L S N C G R L M S G F G A G V I E A L I V T P P E V V K I R L C C Q K G L S P E L L R -----YKGI IHCARTIIRREEGVILGLWACASFTVMRNGTNCAAMFTAR : 192
Mamona : -----M G S N A L F C S A F K D S E T G K I S N R G R V L S G F G A G V I E A L I V T P P E V V K I R L C C Q K G L S P D L L R -----YKGI PVHCARMIIREEGVILGLWACASFTVMRNGTNCAAMFTAR : 104
Soja : L T L K Y A L R M G S N A V L C S A F K D S E T G K L S C Y G R I L S G F G A G V I E A L I V T P P E V V K I R L C C Q R G L S P E L L R -----YKGI PVHCARMIIREEGVILGLWACASFTVMRNGTNCAAMFTAR : 215
Uva : L T L K Y A L R M G S N A L F C S A F K D S E T G C L S N T G R L L S G F G A G V I E A L I V T P P E V V K I R L C C Q R G L S P E L L R -----YKGI IHCARTIIRREEGVILGLWACASFTVMRNGTNCAAMFTAR : 188
Arroz : L T L K Y A L R L G S N A V L C S A F K D P C T G K V S A H G R L A S G F G A G V I E A L I V T P P E V V K I R L C C Q K G L S P D L L R -----YKGI IHCARTIVREEGVILGLWACASFTVMRNGTNCAAMFTAR : 216
Milho : L T L K Y A L R L G S N A V L C S A E K D P T T G K V S A H G R L A S G F G A G V I E A L I V T P P E V V K I R L C C Q K G L S P D L L R -----YKGI IHCARTIVREEGVILGLWSCRATVVMRNGTNCAAMFTAR : 220

Levedura : S K L K E T I C N Y H C M D - - V I P S W E T S C I G L I S G A I G F S N A F L T I K T R L Q K D K S I S L E K Q S G M K K I T I T I G A C L L K E E G F R A L Y K G I I P R V M R V A P G C A V T E T V Y E Y R K G A F C K I V V : 309
Arabidopsi : N A F I I L L W K K H E S D G K V I L E W Q S M I S G F L A G T A G P I C T G P F D V V K T R L M A C - S F D S E G G I R Y K G M V H A I R I Y A E E G L A L W K G L L P R L M R I P P G C A I N W A V A D Q V T G I Y E R R H I : 304
Batata : N A F I I L L W K K H E S D G K V I L E W Q S M I S G F L A G T A G P I C T G P F D V V K T R L M A C - S K T V G - E L K Y K G M V H A I R I Y A E E G L A L W K G L L P R L M R I P P G C A I N W A V A D Q I T G Y E R T Y L : 304
Tcmate : N A F I I L L W K K H E S D G K V I L E W Q S M I S G F L A G T A G P I C T G P F D V V K T R L M A C - S R S V G - E L K Y K G M V H A I R I Y A E E G L A L W K G L L P R L M R I P P G C A I N W A V A D Q I T G Y E R T Y L : 304
Álamo : N A F I V L L W K K H E S D G R V I L E W Q S M I S G F L A G T A G P V C T G P F D V V K T R L M A C - S R E G G - E L K Y K G M I H A I R I Y A E E G L A L W K G L L P R L M R I P P G C A I N W A V A D Q I I G Y E R R Y I : 305
Mamona : N A F I V L L W K K H E S D G K V I L E W Q S M I S G F L A G T A G P V C T G P F D V V K T R L M A C - S R E G G - N L K Y K G M I H A I R I Y A E E G L A L W K G L L P R L M R I P P G C A I N W A V A D Q I I G Y E R R Y I : 217
Soja : N A F I V L L W K K H E S D G R V I L E W Q S M I S G F L A G T A G P I C T G P F D V V K T R L M A C - T R E G G V L K Y K G M I H A I R I Y A E E G L A L W K G L L P R L M R I P P G C A I N W A V A D Q I I G Y E R R Y I : 329
Uva : N A F I G L L W K K H E S D G K V I L E W Q S M I S G F L A G T A G P V C T G P F D V V K T R L M A C - C R A G G - K L K Y K G M V H A I R I Y A E E G L A L W K G L L P R L M R I P P G C A I N W A V A D Q V T G Y E R R H I : 301
Arroz : N T E I I L L W K K H E S D G K V I L E W Q S M I S G F L A G T A G P I C T G P F D V V K T R L M A C - C R T G D - - I K Y K G M V H A I R I Y A E E G L A L W K G L L P R L M R I P P G C A I N W A V A D Q V M G Y E R S Y I L : 328
Milho : N T E I I L L W K K H E S D G K V I L E W Q S M V S G F L A G T A G P V C T G P F D V V K T R L M A C - C R T G D - - A K Y K G M V H A I R I Y A E E G L A L W K G L L P R L M R I P P G C A I N W A V A D Q V M G Y E R T H I : 332

Levedura : Y S R F M T H Q S Q S H : 321
Arabidopsi : R N A P I ----- : 309
Batata : T N A P I ----- : 309
Tcmate : T N A P I ----- : 309
Álamo : H I A P S ----- : 310
Mamona : H N A P I ----- : 222
Soja : H H S T I ----- : 334
Uva : H N A P I ----- : 306
Arroz : Q P A R M ----- : 333
Milho : Q P V E I ----- : 337

```

Figura 2: Alinhamento entre seqüências de aminoácidos de transportadores mitocondriais de algumas espécies homólogos ao SFC1 de *Arabidopsis thaliana*. Os resíduos similares ou idênticos entre os membros da família estão indicados pelo sombreado em preto, já os resíduos conservados estão indicados pelo sombreado em cinza. Os números indicam a posição dos aminoácidos. O número de acesso de cada proteína está listado na Tabela 1. As linhas contínuas foram colocadas abaixo do motivo conservado, o qual é característico da família MCF.

Tabela 4. Similaridades entre a sequência de aminoácidos do SFC1 de *Arabidopsis thaliana* com a de outras espécies.

Espécie	Similaridade (%)
<i>Solanum lycopersicum</i>	80
<i>Solanum tuberosum</i>	80
<i>Vitis vinífera</i>	80
<i>Populus trichocarpa</i>	82
<i>Ricinus communis</i>	84
<i>Oryza sativa</i>	79
<i>Glycine max</i>	78
<i>Zea mays</i>	76
<i>Sacharomyces cerevisae</i>	31

Para uma melhor caracterização da sequência de aminoácidos encontrada em batata, efetuou-se uma análise filogenética (Figura 3). Para tal, utilizou-se sequências de aminoácidos da proteína SFC1 de *A. thaliana* e de algumas leveduras, bem como outros transportadores mitocondriais de di-e tricarboxilatos e proteínas putativas de diferentes espécies vegetais obtidas com base na ferramenta BLASTP. Utilizou-se, ainda proteínas desacopladoras de *A. thaliana*, também classificadas como membros da família de transportadores mitocondriais (Picault *et al.*, 2004). Foi possível observar que os agrupamentos formados entre os diferentes transportadores mitocondriais estão relacionados com a proximidade taxonômica. Nesta análise, notou-se também que as proteínas desacopladoras (UCP1 e UCP2) formaram um grupo monofilético confirmando uma alta homologia entre estes transportadores.

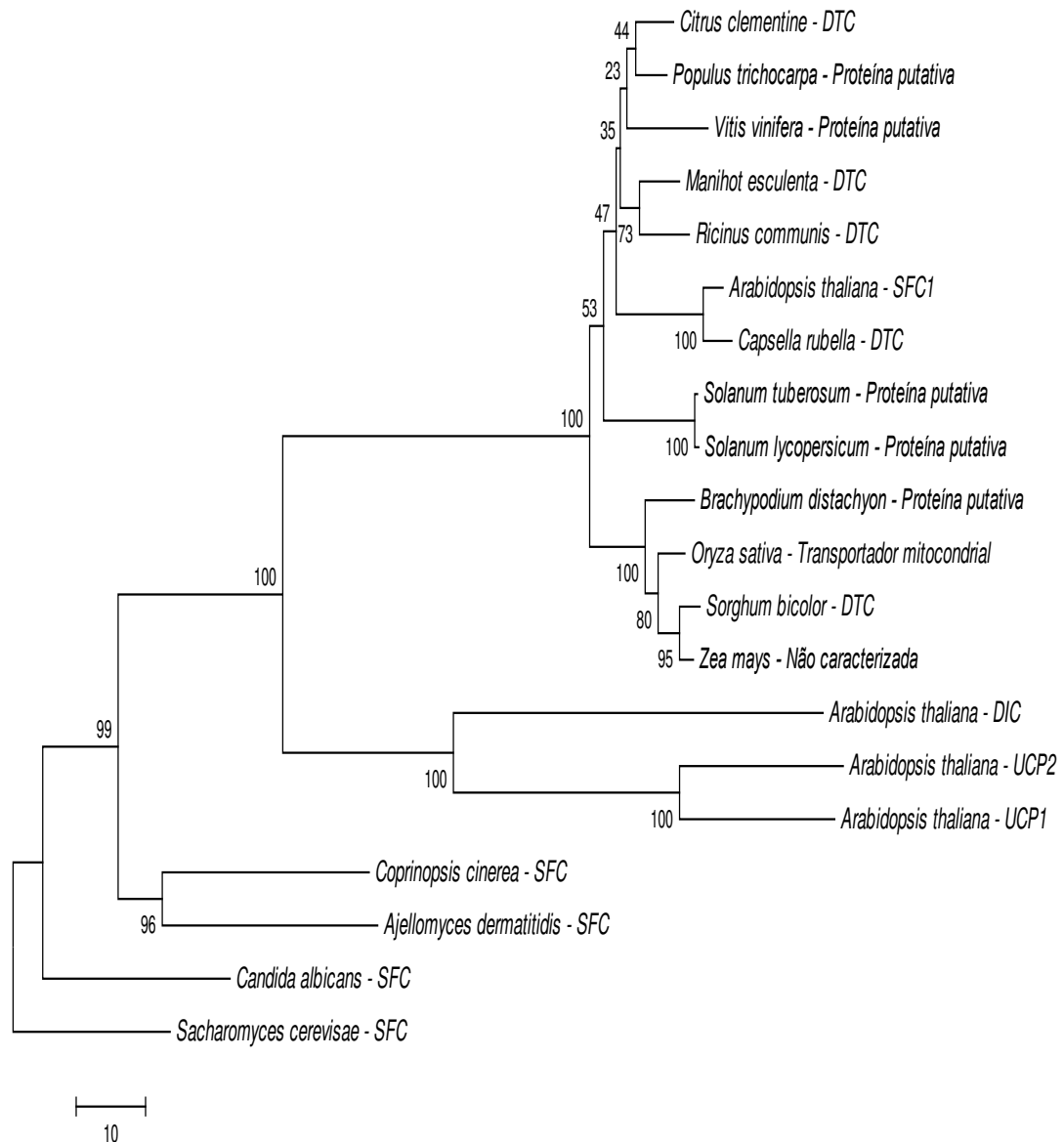


Figura 3: Análise filogenética a partir de um alinhamento múltiplo pelo ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw>) e GENEDOC (Nicholas e Nicholas, 1997) de seqüências de aminoácidos homólogos ao SFC1 de *Arabidopsis thaliana* e outros transportadores mitocondriais. A árvore, tendo como grupo externo o ACR1 (transportador de succinato-fumarato) de *Sacharomyces cerevisiae*, foi obtida pelo método de *Neighbor-joining* através do programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). Os números próximos aos ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* nas quais as ramificações foram observadas com base em 1000 replicatas. O número de acesso de cada espécie está listado na Tabela 1.

A proteína *AtmSFC1* se agrupou com o transportador de di-tricarboxilato (DTC) de *Capsella rubella* e próximo de outros DTCs de outras espécies, o que sugere que esta proteína, também possa transportar tricarboxilatos. Considerando a proximidade entre a proteína de *S. tuberosum* e o *AtmSFC1* de *A. thaliana*, é plausível assumir que essa proteína em batata seja, também o transportador de succinato-fumarato, bem como possa ter afinidade por di-tricarboxilatos.

3.2 Seleção das linhagens de *Solanum tuberosum*

Após a transformação 25 plantas foram obtidas. Estas foram cultivadas em (Meio MS + Kan). Das plântulas cultivadas em meio seletivo, apenas 56% desenvolveram raízes e destas coletou-se folhas para a confirmação do cassete contendo a sequência do gene de *A. thaliana* que codifica o transportador SFC1.

Essa confirmação foi realizada pela técnica de PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos para o *nptII* (Tabela 2). Através da amplificação feita a partir do DNA genômico, a transformação foi identificada apenas em seis linhas . Após esta triagem de transformantes por PCR, os transformantes identificados foram propagados *in vitro* e submetidos à análise de expressão gênica.

Para a análise de expressão gênica, seis plantas de cada linha, selecionada por PCR, foram levadas para casa de vegetação. Na quarta semana de cultivo, folhas de batatas foram coletadas para extração de RNA e posterior análise de expressão via qRT-PCR (Schmittgen e Livak, 2008). Por meio desta análise, verificou-se que as seis linhas pré-selecionadas por PCR apresentaram redução significativa na expressão do gene *StSFC1* (Figura 4). Para posterior caracterização fisiológica das linhas transgênicas, selecionou-se as linhas que apresentaram menor expressão do

gene *StSFC1*. Os genótipos L86, L81 e L71 foram selecionados apresentando reduções de 38, 45, e 50%, respectivamente, na expressão do gene *StSFC1*.

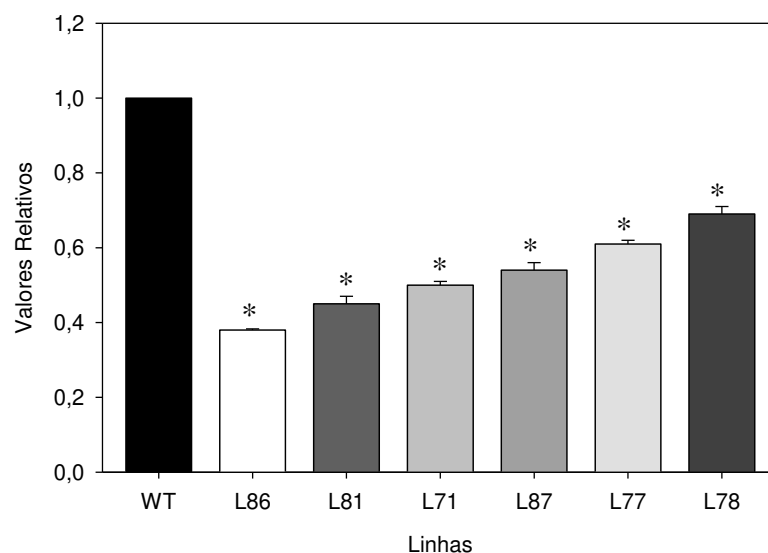


Figura 4: Análise da expressão do SFC1 em tecidos foliares de plantas transgênicas de *Solanum tuberosum*. Os níveis relativos de transcritos de SFC1 determinados pelo método comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) foram determinados por reação de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) utilizando oligonucleotídeos específicos, os quais estão descritos na Tabela 3. O fator de alongamento 1- α (EF1- α), gene constitutivo de *Solanum tuberosum*, foi utilizado para normalização. Os níveis de transcritos normalizados das linhas SFC1-RNAi são mostrados em relação ao nível de transcritos normalizados de SFC1 em plantas do tipo selvagem. O asterisco indica diferença significativa ($P < 0,05$), segundo o teste - t comparado com o controle WT. Valores representam médias \pm erro padrão de seis repetições independentes por linhagem.

3.3 Análises fisiológicas

3.3.1 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a

Uma vez confirmada a redução na expressão do gene de interesse nas linhas selecionadas, os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação com as três linhas de menor expressão e o selvagem, como controle.

Para se determinar a irradiância saturante a ser utilizada nas determinações de fotossíntese líquida de folhas de batata, avaliou-se as respostas fotossintéticas em diferentes intensidades luminosas. Foi utilizada uma sequência decrescente (1500, 1200, 1000, 800, 600, 400, 200, 100, 50, 25, 10, 0 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de irradiância (Anexo 1). Valores de irradiância superiores a 900 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ não se traduziram em incrementos nas taxas de fotossíntese. Partindo deste resultado, estabeleceu-se a irradiância de 1000 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, como valor saturante, mas não fotoinibitório, para as medições dos parâmetros de trocas gasosas.

Para a determinação do horário no qual as avaliações de trocas gasosas seriam realizadas, acompanhou-se também, a variação diurna da fotossíntese líquida, constatando-se um decréscimo da mesma ao longo do dia (Anexo 2). Com base neste experimento, estabeleceu-se que as leituras da fotossíntese e das variáveis associadas seriam realizadas entre as 7:00 e 11:00 horas da manhã.

De maneira geral, observou-se apenas, uma pequena redução nas taxas de assimilação líquida de CO_2 (Figura 5A) e de transporte de elétrons (Figura 5B). Apesar de uma clara tendência de redução nos parâmetros avaliados, a redução na expressão de *StSFC1* não afetou significativamente nenhum dos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* mensurados (Figuras 5C, D, E e F).

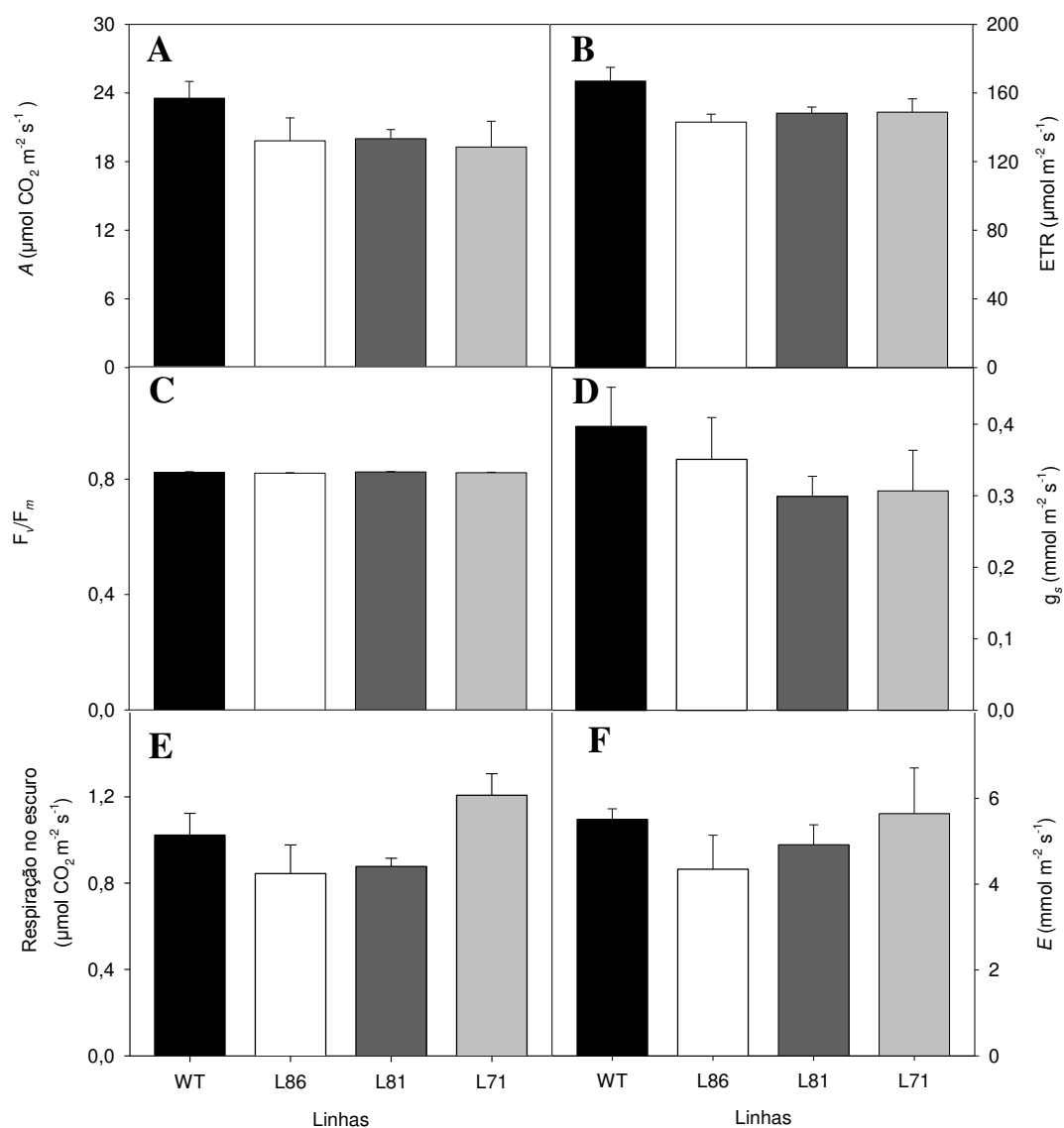


Figura 5: Parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* em plantas transgênicas de *Solanum tuberosum* com redução na expressão do gene *SfSFC1*. Análises foram efetuadas em plantas com quatro semanas de cultivo em casa de vegetação. (A) Assimilação líquida de carbono, (B) taxa de transporte de elétrons, (C) F_v/F_m , máxima eficiência fotoquímica do fotossistema II, (D) condutância estomática (g_s), (E) respiração no escuro, (F) transpiração. Valores representam médias \pm erro padrão de seis repetições independentes por linhagem.

3.3.2 Parâmetros de crescimento

De maneira geral, não foi observada alteração morfológica macroscópica dos órgãos vegetativos nas linhas transgênicas em relação ao controle (resultados não mostrados), fato este que provavelmente não esteja diretamente relacionado com a redução na expressão do gene *StSFC1*.

A massa seca total das linhas transgênicas L86 e L71 foi superior às plantas controle, sendo estes valores estatisticamente significativos (Figura 6A). Este aumento foi proporcional ao aumento na massa seca da folha (Figura 6B) e do caule (Figura 6C) nestas linhagens, cujos valores quando comparados ao controle, também foram estatisticamente diferentes. Em relação à proporção de massa seca alocada nas raízes, verificou-se que apesar das linhas transgênicas apresentarem valores superiores aos das plantas controle, apenas a L86 apresentou maior massa seca neste órgão (Figura 6D). Para a razão raiz/parte aérea, observou-se a mesma resposta, confirmando que houve maior alocação de massa seca para o sistema radicular da L86 em relação às plantas controle. Já as plantas transgênicas L81 e L71, apresentaram valores próximos às plantas controle (Figura 6E).

As linhas transgênicas não apresentaram diferença significativa comparadas com o controle no que diz respeito a altura final das plantas (Figura 6F).

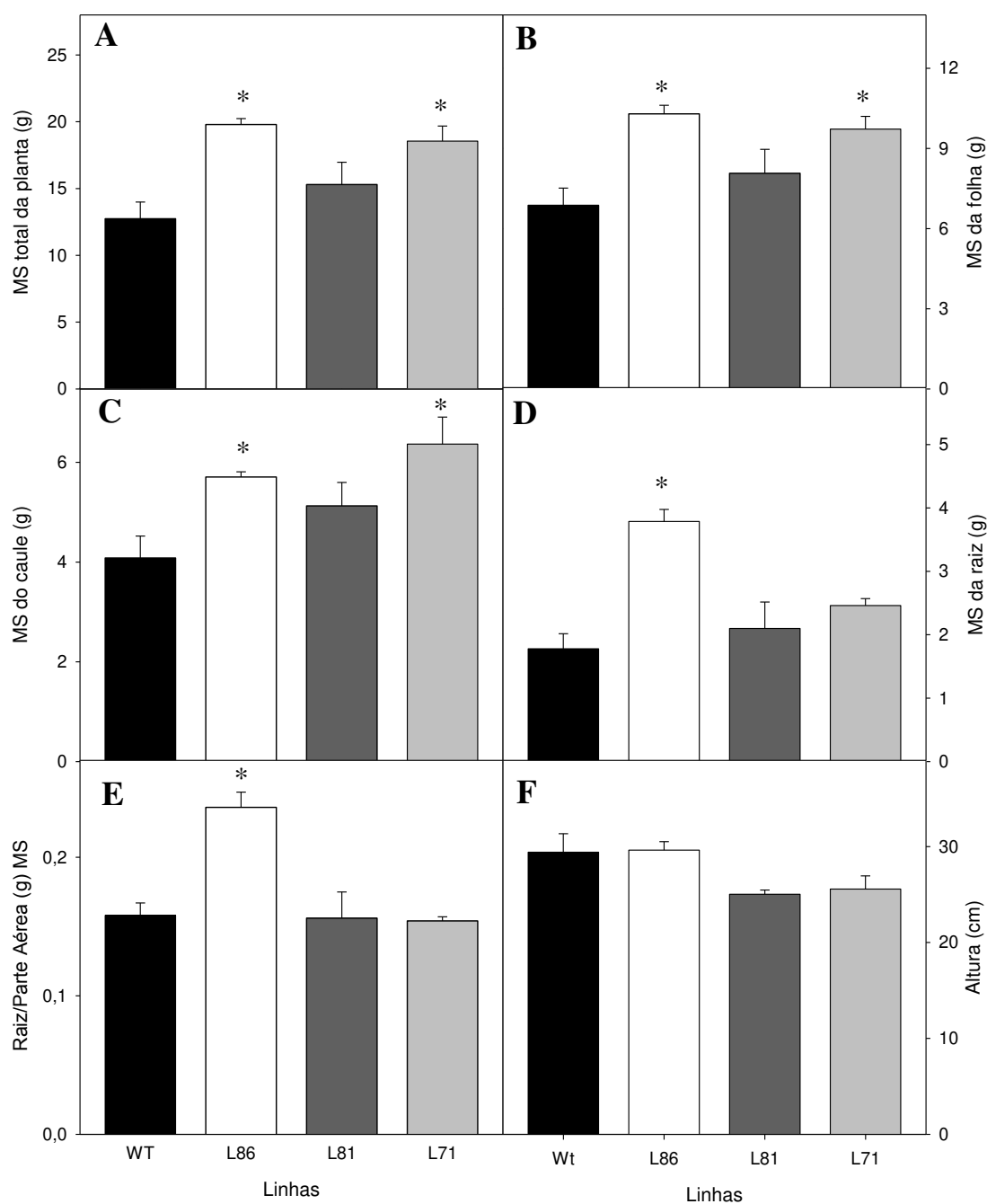


Figura 6: Crescimento de plantas transgênicas de *Solanum tuberosum* com redução na expressão do gene *SzSFC1*. Biomassa acumulada em plantas transgênicas e em plantas selvagens após cinco semanas de cultivo. (A) Massa seca total da planta; (B) Massa seca da folha; (C) Massa seca do caule; (D) Massa seca da raiz; (E) Razão raiz/parte aérea; (F) Altura. Valores representam médias \pm erro padrão de seis plantas independentes por linhagem. Asteriscos indicam diferença significativa ($P < 0,05$), segundo o teste - *t* comparado com o controle WT. MS= Massa seca.

3.4 Análises bioquímicas

Para uma caracterização mais detalhada do papel fisiológico da proteína *StSFC1* análises bioquímicas foram realizadas em folhas completamente expandidas. Para tanto, amostras foliares foram coletadas ao longo de um ciclo diurno (24h) em quatro horários distintos.

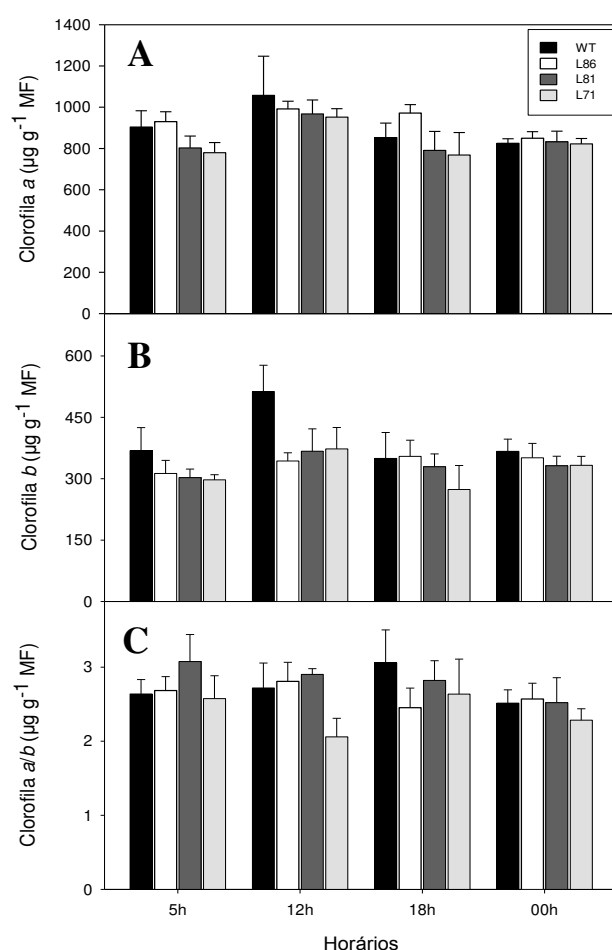


Figura 7: Alterações ao longo do dia nos conteúdos de pigmentos foliares de plantas transgênicas de *Solanum tuberosum* com redução na expressão do gene *StSFC1*. Análises foram efetuadas em plantas com cinco semanas de cultivo em casa de vegetação. (A) clorofila *a*, (B) clorofila *b*, (C) razão clorofila *a/b*. As coletas foram feitas em quatro horários distintos: 5h da manhã (antemanhã); 12h (meio-dia); 18h (final do dia); e 00h (noite). As linhagens estão representadas por barras, as quais foram agrupadas segundo o horário. Valores representam médias \pm erro padrão de seis plantas independentes por linhagem.

Observou-se que não houve diferença significativa nos horários analisados nos conteúdos de clorofila *a* e *b*, bem como na razão entre esses dois pigmentos das linhas transgênicas quando comparadas ao controle. (Figura 7A, B e C, respectivamente). Cumpre ressaltar, entretanto, que houve uma leve tendência de redução no conteúdo de clorofila *b* no horário de 12h nas linhas transgênicas em relação ao controle (Figura 7B).

Determinou-se também o conteúdo de metabólitos chaves do metabolismo do carbono e do nitrogênio (Figura 8). Verificou-se que os níveis foliares de açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose, Figura 8A, B e C, respectivamente) apresentaram, de forma geral, apenas incrementos marginais, o que não se refletiu em diferenças significativas estatisticamente. Com exceção a essa afirmativa, a L81 apresentou maiores valores de frutose no meio do período luminoso em relação ao controle. O conteúdo de sacarose para esta mesma linha, no horário de 00h (meia-noite) apresentou-se inferior ao do controle (Figura 8C).

Os níveis de amido, malato e fumarato (Figura 8D, E e F, respectivamente) não foram significativamente alterados em nenhum dos horários avaliados, com exceção da L81, no horário de 00h, que apresentou uma leve redução nos níveis de amido sendo significativo em relação ao controle.

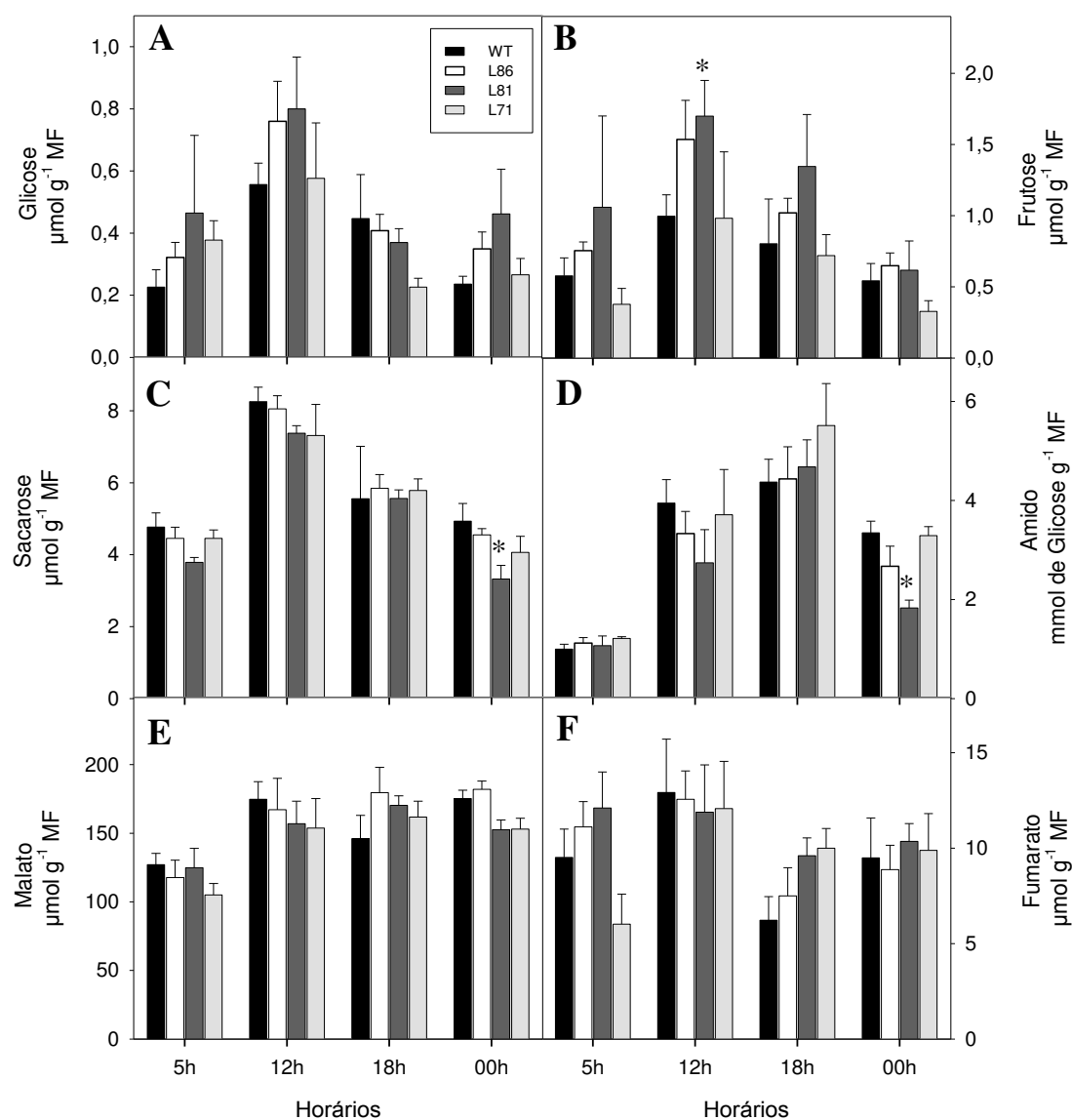


Figura 8: Alterações ao longo do dia nos conteúdos de metabólitos chaves do metabolismo do carbono e do nitrogênio em folhas de plantas transgênicas de *Solanum tuberosum* com redução na expressão do gene *StSFC1*. Análises foram efetuadas em plantas com cinco semanas de cultivo em casa de vegetação. As linhagens estão representadas por barras, as quais foram agrupadas segundo o horário. (A) glicose, (B) frutose, (C) sacarose, (D) amido, (E) malato, e (F) fumarato. As quantificações foram feitas em quatro horários distintos: 5h da manhã (antemanhã); 12h (meio-dia); 18h (final do dia), e 00h (noite). Valores representam médias \pm erro padrão de seis plantas independentes. Asteriscos indicam diferença significativa ($P < 0,05$), segundo o teste - *t* comparado com o controle WT. MF= Massa fresca.

Em relação aos níveis de aminoácidos totais, observou-se que no período da antemã (5h) houve uma tendência de maior concentração deste metabólito nas plantas transgênicas em relação ao controle (Figura 9A).

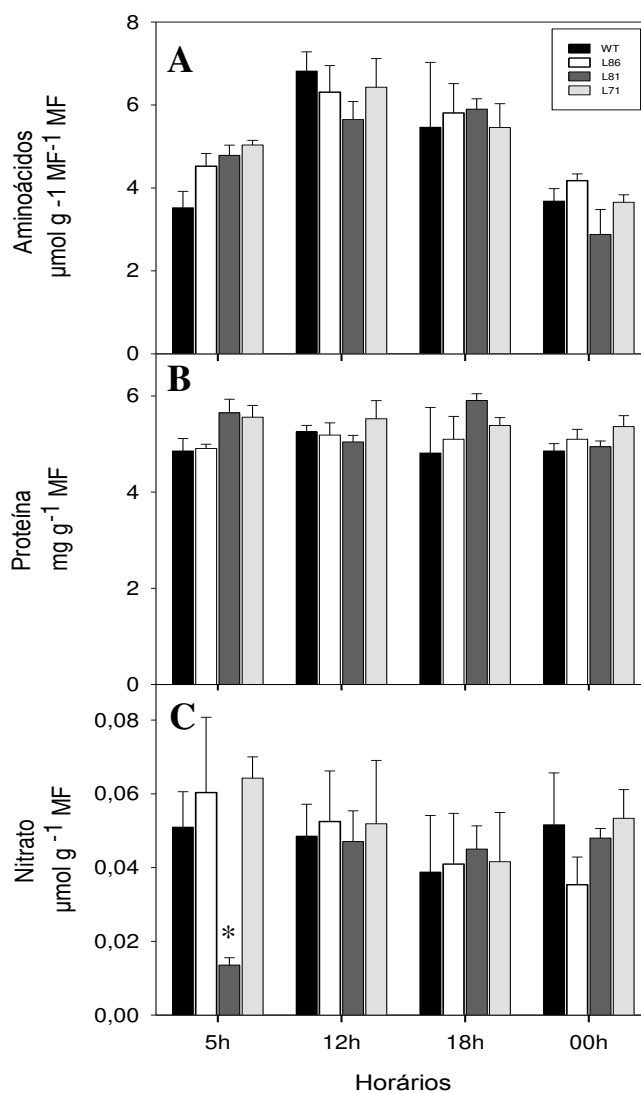


Figura 9: Alterações ao longo do dia nos conteúdos de metabólitos chaves em folhas de plantas transgênicas de *Solanum tuberosum* com redução na expressão do gene *StSFC1*. Análises foram efetuadas em plantas com cinco semanas de cultivo em casa de vegetação. As linhagens estão representadas por barras, as quais foram agrupadas segundo o horário. (A) aminoácidos totais, (B) proteína total, e (C) nitrato. Valores representam médias \pm erro padrão de seis plantas independentes. Asteriscos indicam diferença significativa ($P < 0,05$), segundo o teste - *t* comparado com o controle WT. MF= Massa fresca.

As concentrações foliares de proteína mantiveram-se praticamente constantes ao longo do dia (Figura 9B), enquanto para as de nitrato observou-se, no horário de 5h, um decréscimo significativo ($P \leq 0,05$), apenas para L81 em relação às plantas controle (Figura 9C).

3.5 Análises bioquímicas em tubérculos

Apesar das alterações observadas para a biomassa em órgãos da parte aérea, os efeitos da baixa expressão de *StSFC1* em folhas foram relativamente minoritários. Assim, de posse dos resultados obtidos, é plausível sugerir que aparentemente a baixa expressão de *StSFC1* não teria uma implicação fisiológica e bioquímica relevantes em órgão autotróficos, como em folhas completamente expandidas. Todavia, mais estudos são necessários para comprovar essa afirmação, visto que (i) outros transportadores podem ser importantes na ausência de SFC1 ou (ii) pode haver uma redundância entre os transportadores, como observado nas análise filogenéticas, e ainda (iii) reajustes metabólicos podem ter ocorrido de forma garantir o transporte de outros ácidos orgânicos e assim suportar a falta de SFC1.

Em função da importância do metabolismo dos ácidos orgânicos em órgãos heterotróficos, como tubérculos e frutos (Geigenberger *et al.*, 2000; Centeno *et al.*, 2010), um outro experimento foi realizado com o objetivo de investigar alterações metabólicas nos tubérculos de plantas com redução na expressão de *StSFC1*. Para tais análises discos de tubérculos foram coletados de plantas com onze semanas de idade e os níveis de metabólitos chave foram determinados por meio de ensaios enzimáticos.

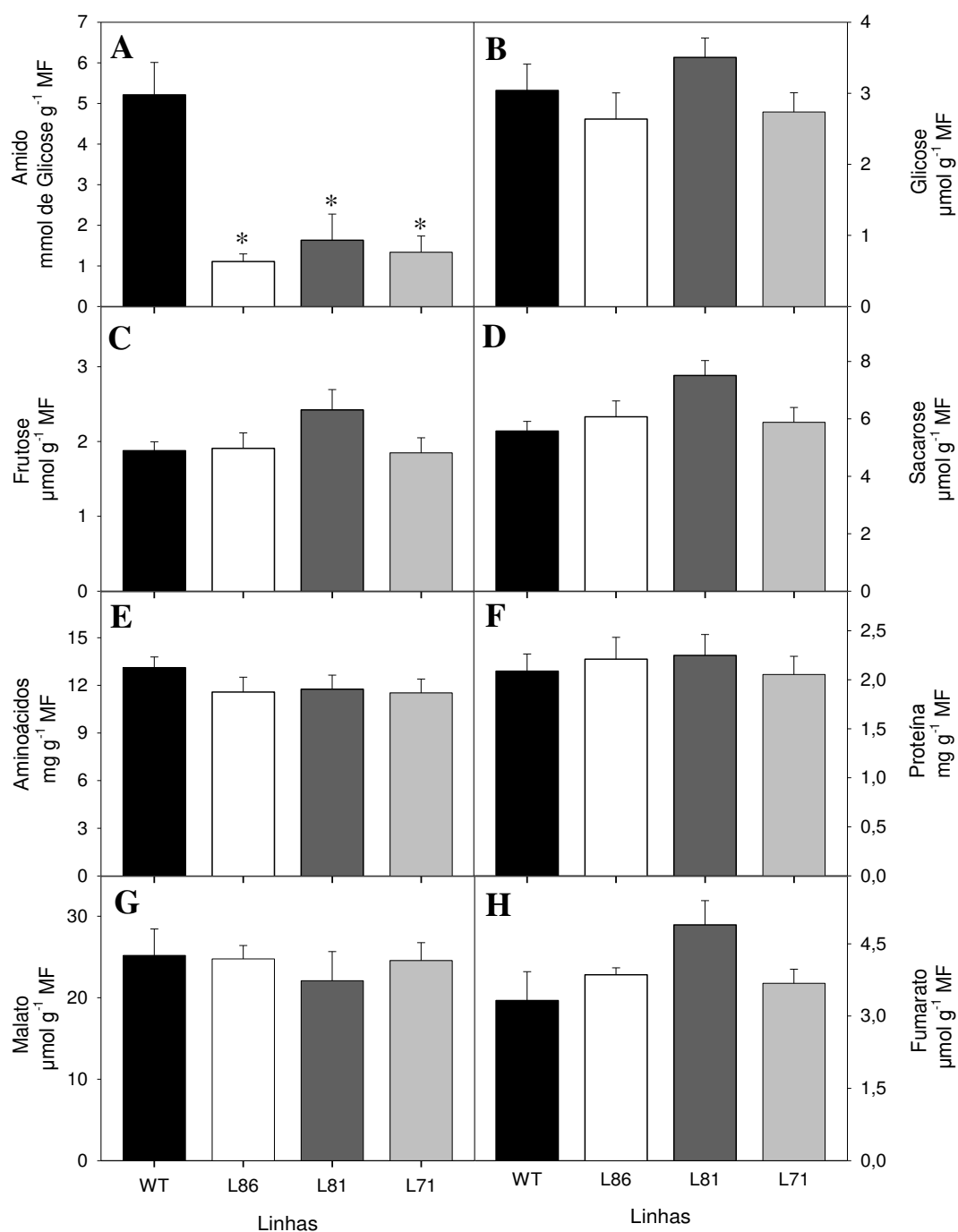


Figura 10: Conteúdo de metabólitos em tubérculos de plantas transgênicas de *Solanum tuberosum* com redução na expressão do gene *StSFC1*. (A) amido, (B) glicose, (C) frutose, (D) sacarose, (E) aminoácidos totais, (F) proteína, (G) malato, e (H) fumarato. As quantificações foram determinadas em tubérculos coletados de plantas com onze semanas de idade. Valores representam médias \pm erro padrão de seis plantas independentes. Asteriscos indicam diferença significativa ($P < 0,05$), segundo o teste - *t* comparado com o controle WT. MF= Massa fresca.

Estas análises revelaram um decréscimo acentuado ($P \leq 0,05$) nos níveis de amido nos tubérculos dos três genótipos transgênicos avaliados (Figura 10A). Os níveis de amido nos tubérculos das plantas com expressão reduzida de *StSFC1* foram 70% menores que os valores observados em plantas controle. De forma até certo ponto surpreendente, apesar da queda drástica nos níveis de amido, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de açúcares solúveis em todas as linhas transgênicas avaliadas (Figura 10B, C e D).

Em relação aos níveis de aminoácidos totais, verificou-se que houve uma tendência de redução nas plantas transgênicas (Figura 10E) ao passo que a concentração de proteína manteve-se praticamente constante (Figura 10F). Resposta similar também foi observada na concentração de malato (Figura 10G). Entretanto, observou-se uma tendência não significativa de aumento nos níveis de fumarato em todas as linhas transgênicas, sendo em média 24% maior que o controle (Figura 10H).

3.6 Incubação de discos de tubérculos com [¹⁴C]-Glicose

3.6.1 Incubação com [1-¹⁴C]-Glicose e [3,4-¹⁴C]-Glicose

Para avaliar o efeito da redução na expressão de *StSFC1* sobre a atividade respiratória em tubérculos, discos foram incubados em solução suplementada com ¹⁴C-glicose marcada em diferentes carbonos e posteriormente o ¹⁴CO₂ liberado ao longo de 6 horas de incubação foi coletado. Para a interpretação dos resultados levou-se em consideração que o ¹⁴CO₂ liberado a partir do carbono 1 da glicose é produzido apenas pela ação de enzimas não associadas a respiração mitocondrial, ao contrário do que ocorre com CO₂ liberado a partir das posições 3 e 4 da glicose, que

são produzidos apenas pelas reações mitocondriais (ap Rees e Beevers, 1960; Nunes-Nesi *et al.*, 2005). Assim, a razão $C_{3:4}/C_1$ fornece uma indicação relativa da atividade do ciclo de Krebs em relação a outros processos de oxidação de carboidratos não relacionados com a respiração mitocondrial.

Desse modo, discos de tubérculos em desenvolvimento, coletados em plantas com onze semanas de idade, foram incubados por 6 horas em meio suplementado com $[1-^{14}\text{C}]$ - ou $[3,4-^{14}\text{C}]$ -Glicose. Durante este tempo, o $^{14}\text{CO}_2$ liberado foi capturado em tubos contendo KOH a 10% em intervalos de uma hora.

A taxa de evolução de $^{14}\text{CO}_2$ tanto no tipo selvagem quanto nas linhas transgênicas quando incubadas em $[1-^{14}\text{C}]$ -Glicose, aumentou ao longo do tempo, sendo esta taxa maior para as linhas L81 e L71 (Figura 11A). Em contrapartida, a taxa de $^{14}\text{CO}_2$ produzida pelos discos das linhas transgênicas e do tipo selvagem, quando incubados em $[3,4-^{14}\text{C}]$ -Glicose, foi menor em relação às incubadas em $[1-^{14}\text{C}]$ -Glicose (Figura 11B).

Em adição a quantificação da produção de $^{14}\text{CO}_2$, estimou-se a atividade relativa do ciclo de Krebs por meio da razão $C_{3:4}/C_1$ (Figura 11C). Após 6h de incubação a razão $C_{3:4}/C_1$ não variou significativamente entre os genótipos (WT, $0,61 \pm 0,06$; L86, $0,61 \pm 0,05$; L81, $0,43 \pm 0,06$; e L71, $0,50 \pm 0,01$). Assim, tomados em conjunto, os resultados obtidos permitem inferir que existe apenas uma tendência de menor oxidação de carboidratos pelo ciclo de Krebs em plantas com reduzida expressão do gene *StSFC1*.

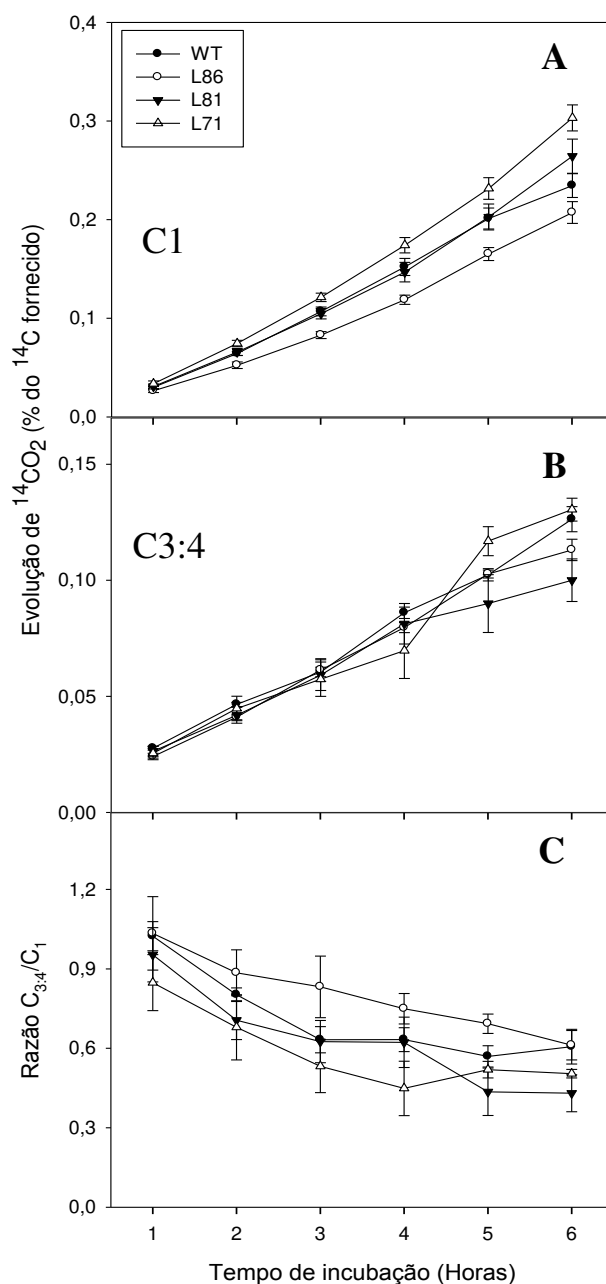


Figura 11: Evolução de $^{14}\text{CO}_2$ com $[1-^{14}\text{C}]$ -; $[3,4-^{14}\text{C}]$ -Glicose em discos de tubérculos de plantas transgênicas de *Solanum tuberosum* com redução na expressão do gene *StSFC1*. Os discos foram coletados de plantas com onze semanas de idade e foram incubados em 10 mM MES/KOH, pH 6,5, suplementado com $[1-^{14}\text{C}]$ -; $[3,4-^{14}\text{C}]$ -Glicose. (A) Evolução de $^{14}\text{CO}_2$ com $[1-^{14}\text{C}]$ -Glicose, (B) Evolução de $^{14}\text{CO}_2$ com $[3,4-^{14}\text{C}]$ -Glicose, e (C) Razão $[3,4-^{14}\text{C}]/[1-^{14}\text{C}]$ - Glicose. O $^{14}\text{CO}_2$ liberado foi capturado em KOH 10%, sendo coletados em intervalos de uma hora até completar 6 horas de incubação, sendo posteriormente quantificado num contador de cintilação líquida. Valores representam médias \pm erro padrão de quatro plantas independentes.

4.6.2 Incubação com [U-¹⁴C]-Glicose

Para verificar a contribuição total das enzimas que produzem CO₂ durante a respiração em tubérculos em desenvolvimento, discos foram coletados a partir de plantas com onze semanas de cultivo e foram incubados em presença de [U-¹⁴C]-Glicose. Por meio desta análise, verificou-se que não houve diferença significativa na taxa de evolução de ¹⁴CO₂ total entre as diferentes linhas com baixa expressão de *StSFC1* (Figura 12).

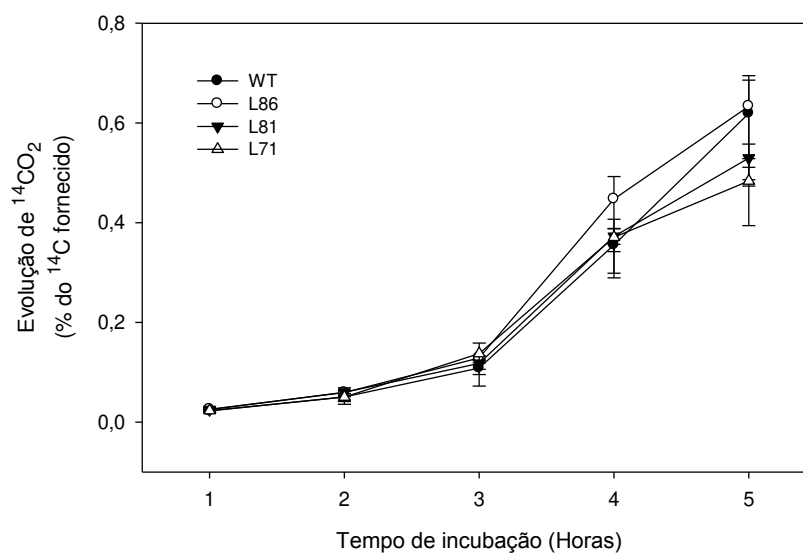


Figura 12: Evolução de ¹⁴CO₂ com [U-¹⁴C]-Glicose em discos de tubérculos de plantas transgênicas de *Solanum tuberosum* com redução na expressão do gene *StSFC1*. Os discos foram coletados com onze semanas de idade e foram incubados em 10 mM MES/KOH, pH 6,5, suplementado. O ¹⁴CO₂ liberado foi capturado em KOH 10%, sendo coletados em intervalos de uma hora até completar 5 horas de incubação, sendo posteriormente quantificado num contador de cintilação líquida. Valores representam médias ± erro padrão de quatro plantas independentes.

3.7 Taxa de respiração em tubérculos

Adicionalmente, quantificou-se a taxa de consumo de oxigênio em discos de tubérculos em desenvolvimento de plantas do tipo selvagem e das linhas

transgênicas. Este experimento revelou ausência de alterações significativas na taxa de respiração dos tubérculos transgênicos quando comparados ao controle (Figura 13).

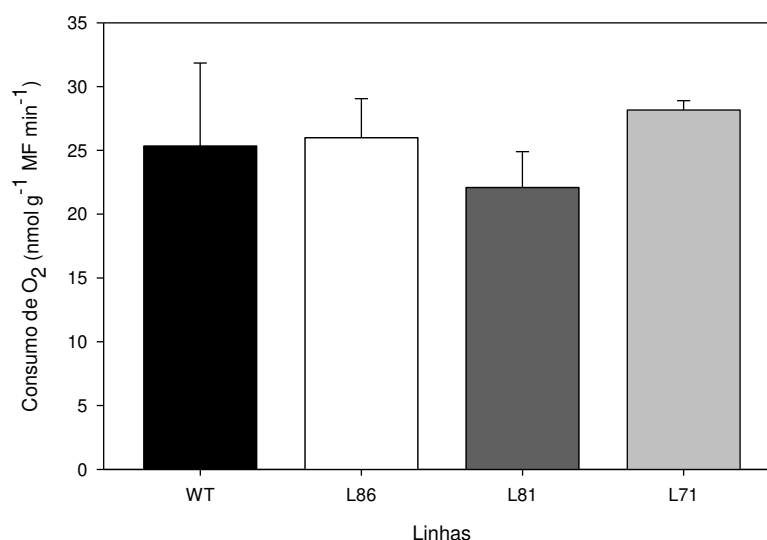


Figura 13: Respiração de discos obtidos de tubérculos em desenvolvimento destacados de plantas transgênicas de *Solanum tuberosum* com redução na expressão do gene *StSFC1*. Cada barra representa a taxa de consumo de oxigênio por grama de massa fresca (MF) no tipo selvagem e linhas transgênicas de batata. O experimento foi realizado, conforme detalhado em material e métodos. Valores representam médias \pm erro padrão de quatro medições de dois discos de tubérculos por cada linhagem por medição.

3.8 Parâmetros relacionados à produção de tubérculos

Parâmetros biométricos foram analisados em dois cultivos independentes, sendo que os dois experimentos apresentavam uma diferença de três semanas de cultivo em casa de vegetação (oito semanas e o segundo com onze semanas). Em ambos, observou-se que a redução na expressão de *StSFC1* não levou a nenhuma alteração morfológica visível nos tubérculos das plantas transgênicas. Além disso, verificou-se que os tubérculos apresentaram desenvolvimento semelhante ao apresentado pelo genótipo selvagem. Entretanto, no segundo cultivo observou-se

uma redução significativa no número de tubérculos das linhas transgênicas L86 e L71 (Tabela 5). Apesar dessa alteração, não houve uma redução drástica no rendimento e no peso médio dos tubérculos das linhas transgênicas com baixa expressão de *StSFC1*.

Tabela 5: Rendimento, número e peso médio de tubérculos em plantas transgênicas de *Solanum tuberosum* com redução na expressão do gene *StSFC1*. Estes parâmetros foram determinados em tubérculos coletados com onze semanas de idade. Valores representam médias \pm erro padrão de quatro plantas independentes, com exceção das linhagens L86 e L81, que somente cinco plantas foram avaliadas.

Parâmetros	WT	L86	L81	L71
Número de tubérculos	7,4 \pm 0,9	2,8 \pm 0,4*	5,3 \pm 1,2	3,0 \pm 0,8*
Peso médio de tubérculos (g)	16,05 \pm 1,8	33,75 \pm 7,8	15,42 \pm 3,8	41,37 \pm 15,3
Rendimento de tubérculos (g MF)	116,1 \pm 14,9	83,43 \pm 11,5	73,59 \pm 5,9	92,31 \pm 10,6

(*) Asteriscos indicam diferença significativa ($P < 0,05$), segundo o teste - *t* comparado com o controle WT. **MF**= Massa fresca.

4 DISCUSSÃO

Acredita-se que, em tecidos heterotróficos de *Arabidopsis thaliana* o gene *AtmSFC1* codifica uma proteína transportadora, localizada na membrana mitocondrial interna, que seria responsável pela importação de succinato para a matriz mitocondrial em troca de fumarato produzido pelo ciclo de Krebs (Eastmond *et al.*, 2000; Catoni *et al.*, 2003). Registre-se, todavia, que este succinato pode ser produzido no peroxissomo pelo ciclo do glioxilato, o qual atuaria como rota anaplerótica suplementando o ciclo de Krebs com ácido succínico. Por outro lado, o fumarato uma vez no citosol pode ser catalisado pela reação de uma fumarase citosólica, sendo convertido a malato e então a oxaloacetato, servindo, portanto, como substrato para a gliconeogênese (Pracharoenwattana *et al.*, 2010; Eastmond *et al.*, 2000).

Apesar da aparente importância metabólica desta proteína, a caracterização do transportador SFC1 em *Arabidopsis* foi realizada apenas ao nível de expressão gênica em diferentes tecidos e complementação de mutantes de levedura (Catoni *et al.*, 2003). Assim, até o presente momento nenhuma função fisiológica deste transportador em plantas foi identificada. Em adição, apesar da descoberta de um homólogo de SFC1 de levedura em plantas há alguns anos, ainda não foi realizada uma caracterização bioquímica detalhada desta proteína, restando, ainda, dúvidas quanto à cinética e à especificidade por substratos do transportador codificado por esse gene. Em função disto e devido à inexistência de proteínas caracterizadas que desempenhem o papel desse transporte de succinato e fumarato, o presente trabalho objetivou identificar funções fisiológicas deste transportador, o qual parece ser essencial em processos relacionados com a gliconeogênese e a respiração (Catoni *et al.*, 2003; Picault *et al.*, 2004).

Análises *in silico* revelam que a proteína codificada por *StSFC1* apresenta domínios conservados característicos da família MCF, com estrutura tripartida e três assinaturas motivo (Picault *et al.*, 2004; Palmieri *et al.*, 2011) (Figura 2). Em adição, a análise filogenética sugere que esta proteína em batata seja homóloga a um suposto transportador mitocondrial de succinato-fumarato em *Arabidopsis*. Esta relação foi confirmada no presente estudo pela similaridade da sequência de aminoácidos e pelo agrupamento da proteína, que está em um ramo próximo ao *AtmSFC1* (Figura 3, Tabela 4).

De forma interessante, um amplo espectro de substratos transportados parece ser característico para todos os transportadores da família MCF (Picault *et al.*, 2004). Um exemplo desta alta variabilidade de substratos é observado para o transportador de levedura *ScACR1*, que tem alta afinidade por succinato e fumarato, transportando também, oxoglutarato, malato, oxaloacetato, fosfoenolpiruvato, citrato e isocitrato (Picault *et al.*, 2002; Catoni *et al.*, 2003). Assim, como mencionado anteriormente, considerando que a caracterização bioquímica da proteína SFC1 não foi ainda totalmente concluída e em função da alta similaridade com outros transportadores (Tabela 4), não é possível afirmar conclusivamente que o transportador em questão esteja envolvido unicamente no transporte de succinato-fumarato e tão pouco afirmar sobre a afinidade por outros substratos. Desse modo, análises adicionais como, isolamento de mitocôndrias e verificação do fluxo de ácidos orgânicos marcados nestas organelas seriam essenciais para verificar a cinética e especificidade deste transportador.

A caracterização fisiológica e metabólica realizada em folhas de plantas com reduzida expressão de *StSFC1* sugere que o transportador SFC1 de batata teria papel regulatório limitado em relação aos parâmetros de trocas gasosas, fluorescência

da clorofila *a* e dos níveis de metabólitos chave do metabolismo primário em folhas. Tais resultados corroboram com os obtidos anteriormente, que demonstraram que apesar da expressão constitutiva em *Arabidopsis*, *AtmSFC1* é pouco expresso em tecidos foliares, como em folhas fonte (Catoni *et al.*, 2003).

Análises de massa seca revelaram que as linhas transgênicas apresentaram uma maior biomassa na parte aérea (Figura 6). Este fenótipo poderia ser explicado, ao menos parcialmente, não por uma função direta do transportador SFC1 em folhas, mas sim por alterações metabólicas nos tubérculos, uma vez que por meio das avaliações biométricas realizadas nestes órgãos, verificou-se que os transformantes apresentaram menor número de tubérculos em relação ao tipo selvagem. Esta redução, aliada ao menor teor de amido, sugere uma diminuição na força-dreno, que poderia explicar a maior massa seca na parte aérea das plantas transgênicas.

Ressalte-se ainda, que os níveis de açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose) quantificados tanto na parte aérea quanto em tubérculos não foram alterados significativamente (Figuras 8 e 10, respectivamente). Apesar de não haver diferenças significativas nestes compostos, observou-se um decréscimo drástico na quantidade de amido em tubérculos nas linhas com expressão reduzida de *StSFC1* (Figura 10A). Esta alteração não pode ser explicada por maiores taxas de respiração no tubérculo (Figura 13). Tomados em conjunto, esses resultados corroboram com o mecanismo previamente relatado de regulação fonte-dreno, no qual a utilização de assimilados pelos órgãos drenos influenciaria fortemente o metabolismo primário em órgãos fonte (Krapp e Stitt, 1995), já que o acúmulo de açúcares em folhas fonte pode causar uma inibição da fotossíntese (Paul e Foyer, 2001; Rolland *et al.* 2006). Evidências de uma parcial limitação da fotossíntese foram observadas nas plantas transgênicas antes do início da tuberização (Figura 5A). Entretanto, para elucidar

completamente este mecanismo, faz-se necessário a quantificação da fotossíntese em plantas em plena tuberização.

Considerando que as alterações na fotossíntese foram mínimas e os níveis de sacarose em folhas e tubérculos não variaram com a redução na expressão de *StSFC1*, não se pode afirmar que os transformantes estejam comprometidos quanto ao fornecimento de sacarose para o tubérculo. Alternativamente, a redução no acúmulo de amido poderia ser explicada por uma limitação enzimática na biossíntese do amido. Nesse contexto, recentes evidências tem demonstrado que alterações no metabolismo de ácidos orgânicos em mitocôndrias podem levar a alterações no estado redox dos plastídeos (Michalska, *et al.*, 2009; Centeno *et al.*, 2011).

Em plantas de tomate com expressão reduzida da isoforma mitocondrial da desidrogenase do malato em frutos foi demonstrado que alterações no metabolismo de malato em mitocôndrias influenciam a biossíntese de amido nos amiloplastos (Centeno *et al.*, 2011). Esta alteração no metabolismo de ácidos orgânicos na mitocôndria foi relacionada com modificações no estado redox do cloroplasto, as quais alterariam o estado de ativação da AGPase. No presente trabalho, embora não se tenha observado alterações no conteúdo de malato dos tubérculos, uma tendência de aumento foi observada para os conteúdos de fumarato (Figura 10G e H, respectivamente). Entretanto, fumarato parece não estar envolvido diretamente na ativação da AGPase (Centeno *et al.*, 2011), e sim na regulação alostérica da enzima málica (NADME). Tem-se demonstrado que uma redução na atividade desta enzima levaria a um aumento no conteúdo de amido. Entretanto, a baixa atividade da NADME está associada a aumentos no conteúdo de 3PGA, um potente regulador da atividade da AGPase (Jenner *et al.*, 2001). Assim, para verificar se a expressão reduzida do transportador *StSFC1* na mitocôndria alterou o estado de ativação da

AGPase nos amiloplastos por uma suposta alteração nos teores de ácidos orgânicos na mitocôndria e nos amiloplastos são requeridos. Uma possibilidade seria a realização de um fracionamento não aquoso das organelas e a seguinte quantificação de ácidos orgânicos em cada compartimento como descrito por Farré e colaboradores (2001).

Em síntese, os resultados obtidos indicam que o baixo conteúdo de amido encontrado nos tubérculos das plantas transgênicas possa estar relacionado com a regulação da AGPase. Concomitantemente esses resultados sugerem que a alteração no transporte dos metabólitos pelo transportador *StSFC1* esteja diretamente relacionada com a modulação do *status* redox nos amiloplastos. Registre-se, todavia, que além da caracterização bioquímica detalhada da proteína SFC1 de plantas e determinação da especificidade por substratos, análises posteriores serão necessárias para verificar as hipóteses geradas neste trabalho. Dentre essas análises destacam-se: i) verificação dos fluxos metabólicos em tubérculos em desenvolvimento, objetivando comprovar a redução na síntese e não aumentos na degradação do amido; ii) determinação da atividade de enzimas relacionadas com a síntese do amido em tubérculos; iii) determinação dos teores de ácidos orgânicos nas diferentes organelas pelo fracionamento não aquoso.

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, pode-se afirmar que a baixa expressão do gene *StSFC1* em batata tem impacto regulatório limitado em tecidos autotróficos como folhas completamente expandidas. Entretanto, em tecidos heterotróficos, como tubérculos em desenvolvimento, a ausência do transportador leva a alterações metabólicas que podem limitar o acúmulo e/ou a síntese de amido nos amiloplastos. Estudos adicionais são requeridos para a completa elucidação do papel fisiológico de *StSFC1*.

6 REFERÊNCIAS

Barrell PJ, Yongjin S, Cooper PA, Conner AJ (2002) Alternative selectable markers for potato transformation using minimal T-DNA vectors. *Plant Cell* **70**: 61-68

Bouvier F, Linka N, Isner JC, Mutterer J, Weber AP, Camara B (2006) *Arabidopsis* SAMT1 defines a plastid transporter regulating plastid biogenesis and plant development. *Plant Cell* **18**:3088-3105

Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, Breeze E, Lim PO, Nam HG, Lin JF, Wu SH, Swidzinski J, Ishizaki K, Leaver CJ (2005) Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant J* **42**:567-585

Catoni E, Schwab R, Hipert M, Desimone M, Schwacke R, Ulfo-Ingo F, Schumacher K, Frommer WB (2003) Identification of an *Arabidopsis* mitochondrial succinate-fumarate translocator. *FEBS Lett* **534**:87-92

Centeno DC, Osorio S, Nunes-Nesi A, Bertolo AL, Carneiro RT, Araújo WL, Steinhauser MC, Michalska J, Rohrmann J, Geigenberger P, Oliver SN, Stitt M, Carrari F, Rose JK, Fernie AR (2011) Malate plays a crucial role in starch metabolism, ripening, and soluble solid content of tomato fruit and affects postharvest softening. *Plant Cell* **23**:162-184

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* **19**:11-15

Eastmond PJ, Germain V, Lange PR, Bryce JH, Smith SM, Graham IA (2000) Postgerminative growth and lipid catabolism in oilseeds lacking the glyoxylate cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:5669-5674

Eastmond PJ, Graham IA (2001) Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. *Trends Plant Sci* **6**:72-77

Farré EM, Tiessen A, Roessner U, Geigenberger P, Trethewey RN, Willmitzer L (2001) Analysis of the compartmentation of glycolytic intermediates, nucleotides, sugars, organic acids, amino acids, and sugar alcohols in potato tubers using a nonaqueous fractionation method. *Plant Physiol* **127**:685-700

Fernie AR, Carrari F, Sweetlove LJ (2004) Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Curr Opin Plant Biol* **7**:254-261

Fernie AR, Roessner U, Geigenberger P (2001) The sucrose analog palatinose leads to a stimulation of sucrose degradation and starch synthesis when supplied to discs of growing potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Plant Physiol* **125**:1967-1977

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

Geigenberger P (2003) Regulation of sucrose to starch conversion in growing potato tubers. *J Exp Bot* **54**:457-465

Geigenberger P, Fernie AR (2006) Starch synthesis in the potato tuber. In YH Hui, W-K Nip, LML Nollet, and G Paliyath, eds, *Food Biochemistry and Food Processing*. Blackwell Publishing, Ames, IA, pp 253-270.

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

Graham IA (2008) Seed storage oil mobilization. *Annu Rev Plant Biol* **59**:115-42

Haferkampe I, Schmitz-Esser S (2012) The plant mitochondrial carrier family: functional and evolutionary aspects. *Plant Sci* **3**:1-19

Indiveri C, Iacobazzi V, Giangregorio, Palmieri F (1997) The mitochondrial carnitine carrier protein: cDNA cloning, primary structure, and comparison with other mitochondrial transport proteins. *Biochem J* **321**:713-719

Jenner HL, Winning BM, Millar AH, Tomlinsom KL, Leaver CJ, Hill SA (2001) NAD malic enzyme and the control of carbohydrate metabolism in potato tubers. *Plant Physiol* **126**:1139-1149

Klingenberg M (2008) The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochim Biophys Acta* **1778**:1978-2021

Krapp A, Stitt M (1995) An evaluation of direct and indirect mechanisms for the “sink-regulation” of photosynthesis in spinach: changes in gas exchange, carbohydrates, metabolites, enzyme activities and steady-state transcript levels after cold-girdling source leaves. *Planta* **195**:313-323

Kunze M, Pracharoenwattana I, Smith SM, Hartig A (2006) A central role for the peroxisomal membrane in glyoxylate cycle function. *Biochim Biophys Acta* **1763**:1441-1452

Laloi M (1999) Plant mitochondrial carriers: an overview. *Cell Mol Life Sci* **56**:918-944

Libiakova G, Jorgensen B, Palmgren G, Ulvskov P, Johansen E (2001) Efficacy of an intron-containing kanamycin resistance gene as a selectable marker in plant transformation. *Plant Cell* **20**:610-615

Lima AL, Damatta FM, Pinheiro HA, Totola MR, Loureiro ME (2002) Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environ Exp Bot* **47**:239-247

Linka N, Theodoulou FL, Haslam RP, Linka M, Napier JA, Neuhaus HE, Weber AP (2008) Peroxisomal ATP import is essential for seedling development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **20**:3241-3257

Linka N, Weber APM (2010) Intracellular metabolite transporters in plants. *Mol Plant* **3**:21-53

Lunn JE (2007) Compartmentation in plant metabolism. *J Exp Bot* **58**:35-47

Lytovchenko A, Hajirezaei M, Eickmeier I, Mittendorf V, Sonnewald U, Willmitzer L, Fernie AR (2005) Expression of an *Escherichia coli* phosphoglucomutase in potato (*Solanum tuberosum* L.) results in minor changes in tuber metabolism and a considerable delay in tuber sprouting. *Planta* **221**:915-927

Michalska J, Zauber H, Buchanan BB, Cejudo FJ, Geigenberger P (2009) NTRC links built-in thioredoxin to light and sucrose in regulating starch synthesis in chloroplasts and amyloplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **24**: 9908-9913

Millar AH, Heazlewood JL (2003) Genomic and proteomic analysis of mitochondrial carrier proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **131**:443-453

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473-497

Nicholas KB, Nicholas HBJr (1997) Genedoc : a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. *EMBNET NEWS* **4**:14

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

Nunes-Nesi A, Carrari F, Lytovchenko A, Smith AM, Loureiro ME, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR (2005) Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. *Plant Physiol* **137**:611-622

Palmieri F, Rieder B, Ventrella A, Blanco E, Do PT, Nunes-Nesi A, Trauth AU, Fiermonte G, Tjaden J, Agrimi G, Kirchberger S, Paradies E, Fernie AR, Neuhaus HE (2009) Molecular identification and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* mitochondrial and chloroplastic NAD⁺ carrier proteins. *J Biol Chem* **284**:31249-31259

Palmieri F, Pierri CL (2010) Structure and function of mitochondrial carriers – Role of the transmembrane helix P and G residues in the gating and transport mechanism. *FEBS Lett* **584**:1931-1939

Palmieri L, Lasorsa FM, De Palma A, Palmieri F, Runswick MJ, Walker JE (1997) Identification of the yeast ACR1 gene product as a succinate-fumarate transporter essential for growth on ethanol or acetate. *FEBS Lett* **417**:114-118

Palmieri L, Santoro A, Carrari F, Blanco E, Nunes-Nesi A, Arrigoni R, Genchi F, Fernie AR, Palmieri F (2008a) Identification and characterization of ADNT1, a novel mitochondrial adenine nucleotide transporter from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **148**:1797-1808

Palmieri L, Picault N, Arrigoni R, Besin E, Palmieri F, Hodges M (2008b) Molecular identification of three *Arabidopsis thaliana* mitochondrial dicarboxylate carrier isoforms: organ distribution, bacterial expression, reconstitution into liposomes and functional characterization. *Biochem J* **410**:621-629

Palmieri F, Pierri CL, De Grassi A, Nunes-Nesi A, Fernie AR (2011) Evolution, structure and function of mitochondrial carriers: a review with new insights. *Plant J* **66**:161-181

Paul MJ, Foyer CH (2001) Sink regulation of photosynthesis. *J Exp Bot* **52**:1383-1400

Picault N, Palmieri L, Pisano I, Hodges M, Palmieri F (2002) Identification of a novel transporter for dicarboxylates and tricarboxylates in plant mitochondria: bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution. *J Biol Chem* **277**:24204-24211

Picault N, Hodges M, Palmieri L, Palmieri F (2004) The growing family of mitochondrial carriers in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* **9**:138-146

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

Pracharoenwattana I, Zhou W, Keech O, Francisco PB, Udomchalothorn T, Tschoep H, Stitt M, Gibon Y, Smith SM (2010) *Arabidopsis* has a cytosolic fumarase required for the massive allocation of photosynthate into fumaric acid and for rapid plant growth on high nitrogen. *Plant J* **62**:785-795

Rees TA, Beevers H (1960) Pathways of glucose dissimilation in carrot slices. *Plant Physiol* **35**:830-838

Riewe D, Grosman L, Zauber H, Wucke C, Fernie AR, Geigenberger P (2008) Metabolic and developmental adaptations of growing potato tubers in response to specific manipulations of the adenylate energy status. *Plant Physiol* **146**:1579-1598

Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* **57**:675-709

Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nat Protoc* **6**:1101-1108

Sweetlove LJ, Fait A, Nunes-Nesi A, Williams T, Fernie AR (2007) The mitochondrion: an integration point of cellular metabolism and signaling. *Crit Rev Plant Sci* **26**:17-43

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods molecular biology and evolution. *Mol Bio Evol* **28**:2731-2739

Taylor L, Nunes-Nesi A, Parsley K, Leiss A, Leach G, Coates S, Wingler A, Fernie AR, Hibberd JM (2010) Cytosolic pyruvate, orthophosphate dikinase functions in nitrogen remobilization during leaf senescence and limits individual seed growth and nitrogen content. *Plant J* **62**:641-652

Weber H, Heim U, Golombek S, Borisjuk L, Manteuffel R, Wobus U (1998) Expression of a yeast derived invertase in developing cotyledons of *Vicia narbonensis* alters the carbohydrate state and affects storage functions. *Plant J* **16**: 163-172

7 ANEXOS

7.1 ANEXO 1

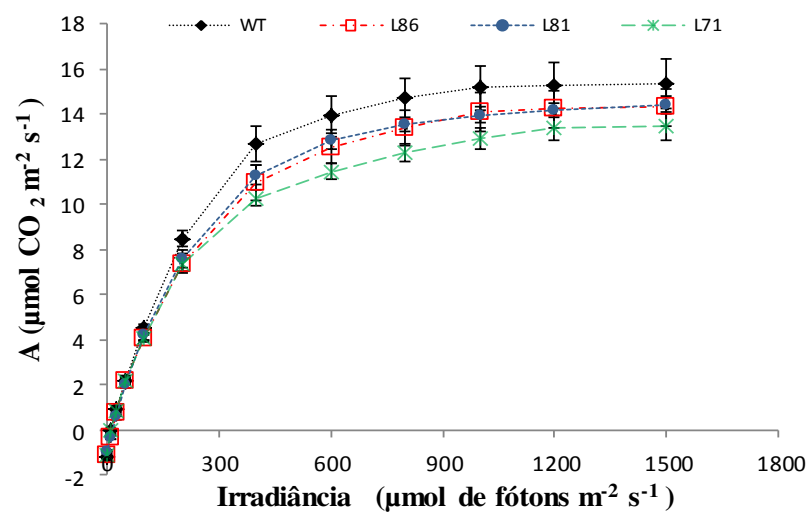


Figura 14: Curva de assimilação líquida de CO_2 em função da intensidade de irradiância de plantas transgênicas de *Solanum tuberosum* redução na expressão do gene *StSFC1*.

7.2 ANEXO 2

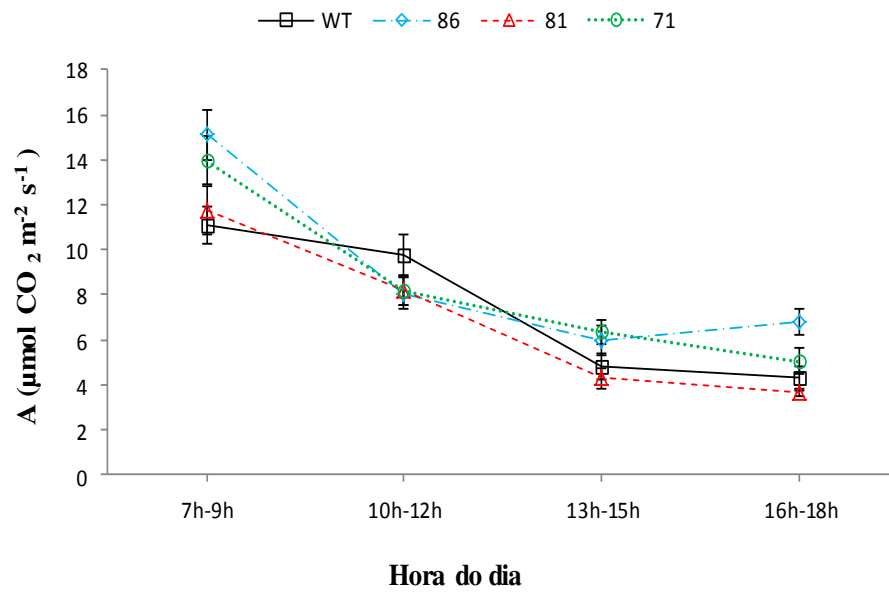


Figura 15: Curso diário da assimilação líquida de CO_2 de plantas transgênicas de *Solanum tuberosum* com redução na expressão do gene *StSFC1*.

