Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Transformação genética cloroplastidial visando aumento da eficiência fotossintética em tabaco (*Nicotiana tabacum*)

André Luiz Barboza

Tese apresentada para obtenção de título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2016

André Luiz Barboza
Biólogo

Transformação genética cloroplastidial visando aumento da eficiência fotossintética em tabaco (*Nicotiana tabacum*)

Orientadora
Profa. Dra. **HELAINE CARRER**

Tese apresentada para obtenção de título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2016

A **Deus**, por sempre iluminar meu caminho...

Dedico aos meus pais,
Izaías Barboza do Carmo e **Dinalva Moreira Barboza**,
aos meus irmãos,
Maurício Moreira Barboza, **Alberto Moreira Barboza** e **Izaías Moreira Barboza**,
às minhas lindas **Érika Bonora Moreira Barboza** e **Cleonice Aparecida Ferreira Moreira Barboza**,
pelo amor, carinho, força e especialmente por sempre acreditarem em mim
Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra. **Helaine Carrer**, pelas oportunidades, pela confiança depositada desde meu mestrado e também pelo apoio nos momentos difíceis.

À Msc **Valentina de Fátima De Martin**, dedicada gerente do laboratório, pelo incentivo e ensinamentos e dedicação dispensado a mim, por todos esses anos.

Ao Dr. **Enio Tiago** pelo apoio, incentivo dispensado a mim nesses anos.

Ao Msc. **Antônio Amaral** pelo apoio e incentivo dispensado a mim nesses anos.

Ao Prof. Dr. **Luiz Antônio Gallo** e ao Prof. Dr. **Daniel S. Moura** pelo apoio, incentivo e ensinamentos.

À **Solizete M. G. Silva** pelo apoio, incentivo e ensinamentos.

Ao Dr. **Esteban Galeano**, à Dra. **Aline Borges** pelo apoio e incentivo, aos alunos de doutorado **Tânia Batista**, **Ana Paula Preczenhak**, **Keini Dressano**, **Paulo Ceciliato**, **Tá bata Bergonci**, **Akemi**, **Cida** e aos alunos de iniciação científica **Nuno** e **Aline**, todos os professores e alunos contemporâneos, do **Programa de Fisiologia e Bioquímica de Plantas**, que em momento oportuno, dispensaram a devida atenção, pelos ensinamentos e pelo incentivo.

ESALQ, pela minha formação na pós-graduação.

CAPES, pela bolsa de doutorado concedida.

A TODOS o meu muito obrigado!

Pensar é fácil.
Agir é difícil.
Agir conforme o que pensamos,
isso ainda o é mais.

(Johann Wolfgang von Goethe)

SUMÁRIO

RESUMO 11
ABSTRACT 13
1 INTRODUÇÃO 115
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 19
2.1 Fotossíntese 19
2.2 RuBisCO 26
2.3 Fotorrespiração 28
2.4 Transformação genética de cloroplastos 30
3 MATERIAL E MÉTODOS 37
3.1 Plantas de tabaco *in vitro* 37
3.2 Vetores de transformação de cloroplastos 37
3.3 Transformação genética de cloroplastos de tabaco 40
3.4. Obtenção de Plantas transplastômicas Homoplásmicas 41
3.5 Identificação das linhagens transgênicas por PCR 42
3.6 Identificação do gene *rbc*L nas linhagens transgênicas 43
3.7 Sequênciamento do gene *rbc*L em plantas Transplastômicas 46
3.8 Cultivo das linhagens transplastômicas em casa de vegetação 47
3.9 Análise de homoplasmia pelo teste de germinação de sementes 47
3.10 Análises fisiológicas da taxa fotossintética, condutância estomática e transpiração das plantas transplastômicas 48
3.11 Análise estatística 50
4 RESULTADOS 51
4.1 Transformação Genética de Cloroplastos de Tabaco 51
4.2 Identificação do gene marcador seletivo *aad*A 52
4.3 Análise de homoplasmia das plantas Transgênicas por PCR 53
4.4 Substituição do gene *rbc*Lno genoma do cloroplasto 55
4.5 Análise da presença do sítio de restrição *Acc*I nas linhagens transplastômicas 56
4.6 Análise da presença do sítio de restrição *Nde*I nas linhagens transplastômicas 59
4.7 Clivagem de sítios de restrição inseridos na sequência *atp*B::*rbc*L:::*aad*A::*acc*D 60
4.8 Alinhamento das linhagens transplastômicas 64
4.9 Germinação de sementes 65
4.10 Análise fisiológica das taxas fotossintética, de condutância estomática e transpiração .. 66

5. DISCUSSÃO 71
5.1 Inserção do transgene *rbc*L-sintético por recombinação homóloga 71
5.2 Análise fisiológica da taxa fotossintética 73
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 77
REFERÊNCIAS 79

RESUMO

Transformação genética cloroplastidial visando aumento da eficiência fotossintética em tabaco (*Nicotiana tabacum*)

Ribulose-1,5-Bifsfosfato (RuBP) carboxilase/oxigenase (RuBisCO) é a enzima chave para a fixação do carbono atmosférico e para a produtividade das plantas. Não há, até o momento, uma metodologia estabelecida para otimizar o processo de fixação do CO_2 nas diferentes espé cies de plantas. Entretanto, a disponibilidade de um protocolo de transformação genética do genoma cloroplastidial de tabaco, como modelo, permite tentativas de manipulação da enzima RuBisCO visando aumento da eficiência fotossintética. Nas plantas, esta proteína é formada por 8 subunidades menores codificadas pelo gene *rbc*S localizado no genoma nuclear e por 8 subunidades maiores codificadas pelo gene *rbc*L localizado no genoma de cloroplastos. Neste trabalho, dois genes *rbc*L-sintéticos, um sem e outro com a substituição da alanina (A) 378 por uma valina (V) (A378V) presentes nos vetores pTT629, pTT630, pTT632 e pTT633, usados para transformar o cloroplasto de folhas de tabaco, pelo método de biolística. Um total de 35 plantas transplastômicas se desenvolveram sob seleção dos antibióticos espectinomicina (500 mg/L) e estreptomicina (500 mg/L) e a análise molecular dos sítios de restrição *Acc*I, *EcoR*I, *Nde*I e *Nsi*I, de fragmentos amplificados da sequência codante *atp*B::*rbc*L::*aad*A::*acc*D demonstrou a integração dos genes *rbc*L-sintéticos em 11 linhagens transplastômicas. Sementes T_0 destas plantas demonstraram ser homoplásmicas pela germinaç ão na presença do antibiótico espectinomicina (500 mg/L). Análises fisiológicas das taxas de fotossíntese (*A*), condutância estomática (*gs*) e de transpiração (*E*) das plantas transplastô micas (A378V) mantidas em casa-de-vegetação produziram valores maiores e significativos, quando comparados com as plantas sem a mutação e controle não transgênicos. A taxa de CO_2 disponível no sítio catalítico da enzima RuBisCO influencia o produto final da fotossí ntese e do ciclo de calvin, devido à resposta da atividade carboxilase desta enzima. A análises fisiológicas das plantas transplastômicas mostrou aumento da taxa de fotossíntese quando comparadas com as plantas controle de tabaco não transformadas, indicando uma maior fixaçã o de CO_2 sem afetar a especificidade CO_2/O_2 da atividade catalítica da RuBisCO. A compreensão da interação fotossintética com a atividade fotorrespiratória poderá permitir explorar e estender possíveis benefícios, como o aumento da produtividade em cultivares de interesse agronômico.

Palavras-chave: Fotossíntese; RubisCO; *rbc*L; Transformação de cloroplastos; Fotorrespiraçã o.

ABSTRACT

The genetic transformation of chloroplast seeking to increase the photosynthesis efficiency in tobacco (*Nicotiana tabacum*)

Ribulose-1,5-Bifsfosfato (RuBP) carboxylase/ oxygenase (RuBisCO) is the key enzyme for the fixation of atmospheric carbon and productivity of plants. At moment, no single solution to optimize the CO_2 fixing process by the different species of plants. The availability of a few efficient chloroplast transformation protocols for all cultivars also directs attempts to manipulate the larger and small subunit of RuBisCO. In plants, this protein consists of coding form eight smaller subunits encoding the *rbc*S gene and 8 larger subunits of the *rbc*L gene respectively located in the nucleus and chloroplasts. Using two *rbc*L-synthetic genes, with an alanine (Ala) 378 substituting a valine (Val) (A378V) and another one without the replacement were used in the construction of pTT629, pTT630, pTT632 and pTT633 vectors, which were used in the method of biolistic to driving these transgenes into the chloroplast genome of tobacco. A total of 35 transplastomic plants were grown under selection of antibiotics spectinomycin (500mg/ L) and streptomycin (500mg/ L) and the molecular analysis using restriction sites *Acc*I, *EcoR*I, *Nde*I and *Nsi*I from the amplified fragments of *atp*B::*rbc*L::*aad*A::*acc*D sequence displayed the *rbc*L-synthetic genes integrated into the plastome of the 11 transplastomic lines. The T_0 seeds of these plants were shown to be homoplasmic from germinating in the presence of the antibiotic spectinomycin (500mg / L). The physiology analyzes of photosynthesis (*A*), stomatal conductance (*gs*) and transpiration (E) rates of these transplastomic lines (A378V) plants kept in green-house produced the highest and significant values when when compared to the control plants without the mutation and non-transgenic control. The CO_2 level available in the catalytic site of the enzyme RuBisCO influences the final product of photosynthesis and the Calvin cycle due to the answer of the carboxylase activity of this enzyme. The physiological analyzes of transplastomic plants showed increased rate of photosynthesis when compared to tobacco control plants, indicating an increase of fixation of the CO_2 without affecting the specificity CO2/O2 of the catalytic activity of Rubisco. The understanding of the photosynthetic interaction with photorespiration activity may allow explore more the potential benefits, such as increased productivity in crops of agronomic interest.

Keywords: Photosynthesis; RuBisCO; *rbc*L; Genetic transformation of chloroplasts; Photorespiration

1 INTRODUÇÃO

Avanços importantes têm sido obtidos nos últimos anos, em vários aspectos sobre a biologia que envolve a enzima Ribulose-1,5-bisfosfato-carboxilase/oxigenase (RuBisCO) (PORTIS; PARRY, 2007; WHITNEY; ANDREWS, 2001a). Apreciações sobre a complexa atividade catalítica dessa enzima e a identificação de características e possíveis variações ciné ticas que possam ser encontradas, em diferentes homólogos da RuBisCO, é um dos impulsos para caracterizar as variáveis relacionadas à captura de CO_2 e para produzir variantes melhoradas de cultivares agronômicas que possam apresentar alta produtividade em condiçõ es de campo (PARRY et al., 2007; RAINES, 2011; 2006; TCHERKEZ et al., 2006; ANDREWS; WHITNEY, 2003).

A enzima RuBisCO é a proteína mais abundante na biosfera terrestre (RAVEN, 2013; ELLIS, 1979). A atenção dada à RuBisCO deve-se ao papel que esta enzima desempenha na manutenção e perpetuação de praticamente todas as espécies. A capacidade de fixar o gás carbônico atmosférico (CO_2) na reação da fotossíntese habilita essa enzima como uma estrutura molecular chave para as diversas reações fisiológicas e a adaptação das diversas espé cies em diferentes biomas (SPREITZER; SALVUCCI 2002).

A RuBisCO tem uma massa molecular de aproximadamente 560 000 Daltons, com oito cópias de dois tipos de subunidades, maior (“L”) e menor (“S”) que fazem parte da estrutura desta holoenzima (TABITA et al., 2007; KNIGHT et al., 1990). Esta enzima é codificada pelo gene *rbc*LS, sendo que o gene *rbc*L codifica os 56 000 Daltons das subunidades “L”, cada qual com a forma αβ-cilindros. Em conjunto, está a subunidade “S” com 15 000 Daltons codificados pela família do gene nuclear *rbc*S. A subunidade “S” é processada por precursores durante a entrada no interior do cloroplasto, para então ser acoplado à estrutura da subunidade “L”, através de rotas que envolvem a ação molecular de chaperonas (DEAN et al., 1989).

No interior do cloroplasto, a enzima RuBisCO catalisa a reação carboxilase, entre o CO_2 e a molécula ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) para formar duas moléculas de 3 carbonos, o fosfoglicerato (3PG). Entretanto, o O_2 compete com o CO_2 pelo mesmo sítio ativo desta enzima (LAING et al., 1974). A atividade oxigenase que promove a reação do O_2 com a RuBP resulta na produção de apenas uma molécula de 3PG (CEGELSKI; SCHAEFER,

2006). Neste processo os dois carbonos da RuBP restantes formam o fosfoglicolato que é o reagente inicial da fotorrespiração, um processo que leva à perda de 30% de CO_2 que poderia ser usado em um potencial processo de fixação na fotossíntese (PETERHÄNSEL et al., 2011; SOMERVILLE). Esta perda gerou diversos questionamentos e relatos, se a produtividade das plantas poderia ser melhorada pela redução da atividade oxigenase ou pelo aumento da atividade carboxilase.

Muitos progressos têm sido obtidos pela elucidação dos mecanismos catalíticos e da estrutura cristal em raios-x da RuBisCO (ANDERSSON, 1996). Alternativas natural e sinté tica de alterar o processo de fixação do carbono tem sido limitada (BAR-EVEN et al., 2010). A tentativa de melhorar ou aperfeiçoar a RuBisCO pode implicar em melhorar a produtividade de cultivares de interesse agronômico e o uso eficiente dos recursos envolvidos (PARRY et al., 2007; WHITNEY et al., 2011a).

A alteração no clima em escala global e a elevação da temperatura muda a disponibilidade de água que impacta na produtividade das cultivares agronômicas e na assimilação do carbono pelas plantas, juntamente com o aumento populacional tem gerado esforços para o aumento da produção de biomassa, pelo uso de tecnologias que possam dirigir a expressão da RuBisCO para gerar uma planta melhorada, pela alteração da atividade catalí tica da RuBisCO que otimize o processo da fotossíntese e que produza o aumento de biomassa da planta transformada geneticamente (WHITNEY et al., 2011b; RAINES 2003). Por estas razões, o foco, na engenharia da RuBisCO nos cloroplastos de plantas superiores tem sido dirigido para identificar qual o nível de controle da expressão desta enzima, pela predição, assim como o exame da influência de sequências regulatórias e do códon degenerado. Outras questões, tais como as diferentes classes de RuBisCO exógenas poderiam ser usadas para construir uma nova estrutura dessa enzima, alterando sua atividade catalítica que pudesse ser inserida no plastoma e se manter estável. Além de como usar uma sequência da subunidade “L” de outras espécies de plantas que funcione adequadamente na estruturação com a subunidade “S” nativa da enzima, sem detrimento da atividade catalítica (SHARWOOD et al., 2008). As tecnologias do DNA recombinante aliado à tecnologia de transformação genética por biolística, dentre a mais usada, na transformação do cloroplasto sã o importantes para a produção de novas cultivares que possam apresentar uma maior assimilação do carbono atmosférico e consequentemente um aumento na produtividade das plantas. Assim, a inserção do gene *rbc*L-sintético que contem a alteração em um único códon,

no genoma do cloroplasto, é uma possibilidade de substituição do gene nativo pelo gene mutante por recombinação homóloga, visando alterar a eficiência da capacidade fotossintética das linhagens transplastômicas de tabaco, usada como planta modelo em diversos trabalhos de transformação genética do cloroplasto.

O uso do tabaco como planta modelo tem a vantagem de apresentar tamanho relativamente pequeno, o cultivo fácil, o ciclo de vida curto, um genoma pequeno e/ou sequenciado e a o uso de um protocolo de transformação genética simples pre estabelecido e a produção de sementes férteis (BENT, 2000). O uso de plantas modelo, como o tabaco, no processo de transformação genética permite conhecer a resposta fisiológica que pode ser dirigida pelo gene exógeno inserido no genoma da planta. As plantas modelos são usadas na obtenção de novos cultivares através de transformação gené -

empregadas para se conseguir ão de um transgene em promover melhorias de interesse agronômico nos tra

(BENT, 2000; HANSEN; WRIGHT 1999).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fotossíntese

A fotossíntese é um importante processo biológico que captura o dióxido de carbono da atmosfera pela enzima RuBisCO, em uma série de reações químicas. Esse anabolismo ocorre nas plantas, algas e cianobactérias, os organismos autotróficos. A concentração de CO_2 na atmosfera é em torno de 394 $\mu mol.mol^{-1}$. O CO_2 se difunde através da abertura dos estô matos que conectam o interior do cloroplasto com o meio externo, para o interior do mesofilo para até o sítio de carboxilação da enzima RuBisCO, no interior do cloroplasto, para a produç ão de carboidratos. A difusão do CO_2 através do estômato é um processo físico e passivo, sem gasto de energia e sua trajetória no mesofilo depende da capacidade de difusão do gás, da temperatura, da viscosidade do meio, barreiras físiscas e da distância em que ocorre a difusão. A rota de difusão pelo mesofilo possui diversas barreiras físicas, como ar, paredes celulares, membranas de lipídios, citoplasma e estroma, que podem diferir entre as folhas da mesma planta (FLEXAS et al., 2012; SINGH et al., 2012). O carboidrato e o oxigênio como produtos da fotossíntese são essenciais para a manutenção da fisiologia e da sobrevivência das demais formas de vida, os organismos heterotróficos (PIMENTEL, 1998).

A organela celular onde ocorre as reações da fotossíntese é o cloroplasto, que tem a sua morfologia estruturada por vesículas denominadas grana que é formada pelo conjunto de bicamadas de membranas, os tilacóides, onde estão localizadas as estruturas de membrana formadas por quatro complexos supramoleculares: fotossistema I (PSI), fotossistema II (PSII), citocromo *b6/f* e ATP sintetase. As reações da fotossíntese ocorrem em duas fases com várias reações químicas, a primeira denominada fase luminosa ou fotoquímica e a fase escura ou quí mica para produzir uma molécula rica em enrgia, o carboidrato e oxigênio (LONG et al., 2006).

Em diferentes espécies de plantas, as reações luminosas ou fotoquímica da fotossíntese ocorrem através das estruturas que formam os complexos supramoleculares que estão arranjados assimetricamente na membrana dos tilacóides. A energia de fótons de luz é inicialmente absorvida pelos pigmentos, como a clorofila *a* e *b*, os carotenoides e as xantofilas (STINGACIU et al., 2016; KROLL et al., 2001; JANSSON et al., 1992). A maioria desses pigmentos funcionam como um complexo antena (*light-harvesting complex*, LHCII e LHCI),

capturando os fótons de luz, transferindo-os na forma de energia dos centros reações para os fotossistemas PSII e PSI (SIMPSON et al., 1986; KÜHLBRANDT et al., 1994; KO et al., 1992). Na maioria das plantas, a clorofila *a*(*Chl a*) é o pigmento primário da fotossíntese, com a presença um átomo de magnésio no centro da molécula, localizando-se adjacente ao PSII, enquanto que na clorofila feofitina, no centro da molécula, o átomo de magnésio é substituído por dois átomos de hidrogênio (BERNARDO; ORGANO, 2014; NELSON et al., 2005) e tem a função de aceptor primário no PSII (ACHARYA et al., 2012; ALLAKHVERDIEVA et al., 2010), transferindo elétrons para plastoquinonas, formando plasto-hidroquinonas (TAIZ; ZEIGER, 2009). Em condições ideais de luminosidade, a absorção dos fótons pelo PSII, aprisionados por um centro de reação, pode ultrapassar a eficiência de 80%, enquanto sob intensa luminosidade o PSII dissipa o excesso de luz absorvida de modo preventivo ao aquecimento pela via não fotoquímica do *quenching* (-) (AMARNATH et al., 2015). Contudo, condições ambientais podem impor limitações à fotossí ntese, o que limita significativamente a taxa de transporte de elétrons, com um incremento significativo na dissipação não-fotoquímica. A extinção ou decaimento (*quenching*) em componentes fotoquímicos e não fotoquímicos afeta a eficiência fotoquímica do PSII que é proporcional ao coeficiente de extinção fotoquímica da fluorescência da clorofila e à eficiê ncia fotoquímica dos centros de reação. No ambiente, a diminuição da eficiência fotoquímica do PSII não se deve apenas a uma diminuição do coeficiente de extinção fotoquímica da fluorescência da clorofila, mas também a um decréscimo da eficiência fotoquímica dos centros de reação, devido em parte a processos não fotoquímicos. A dissipação do excesso de excitação absorvida, que corresponde ao principal componente de extinção não fotoquímica, é um processo indispensável para que as plantas evitem a fotoinibição e fotodestruição em condições de stresse luminoso (GOVINDJEE et al., 2010).

A vantagem dessa transferência de elétrons é a capacidade das reações de óxido-reduç ão de conter parte dessa energia nestes complexos (MELKOZERNOV et al., 2006). Essa contenção favorece a manutenção do processo de transferência de elétrons ativo, por um perí odo de tempo prolongado, o que não seria possível se cada pigmento possuísse seu próprio centro de reação (TOKUTSU et al., 2012; OLSON et al., 2014). As reações desse sistema de transferência de elétrons são governadas pela geometria relativa e pelas reações de óxido-redução, o que faz com que a energia luminosa se integre às membranas fotossintéticas e seja direcionada para os centros de reações, onde são armazenados por determinado período na forma de energia química (ALLAKHVERDIEV et al., 2010). Esses complexos

supramoleculares funcionam em série para a redução do $NADP^+$ a NADPH. Os complexos antena LHCII são estruturas proteico-clorofila que absorvem a energia dos fótons e separam suas cargas para serem transferidas para o PSII que está localizado majoritariamente na face interna das membranas sobrepostas dos tilacóides e em menor quantidade nas membranas não empilhadas do estroma. (BASSI et al., 1997; CHITNIS; THORNBER, 1988). O PSII é a estrutura proteica responsável por muitos dos mecanismos de adaptação e de proteção do aparato fotossintético, em resposta às variações das condições ambientais que envolvem o rearranjo adaptativo das membranas dos tilacóides (ANDERSON & STYRING, 1991). No PSII a molécula de água é oxidada pela energia luminosa que pelo processo denominado fotó lise da água libera prótons, elétrons além de oxigênio que é essencial para a respiração dos seres vivos e contribui com o ciclo do carbono na biosfera (AMERONGEN; CROCE, 2013; MAURINO; WEBER, 2013; HANKAMER; BARBER, 1997).

Após a energia produzida a partir dos fótons de luz percorrerem a estrutura do PSII, ela é transferida para o complexo citocromo *b6/f* que está localizado tanto nas membranas empilhadas do grana quanto nas membranas das lamelas e estroma dos cloroplastos (UEDA et al., 2012; ANDERSON; STYRING, 1991; WILLEY; GRAY, 1988). Em seguida, essa energia é transferida para o PSI, localizado na membrana dos tilacóides e no estroma, onde catalisa a transferência destes elétrons para o complexo ferredoxina-NADP, no sistema sistema ferredoxina/tiorredoxina (AMERONGEN; CROCE, 2013; MEDINA, 2009). Na fotofosforilação oxidativa, a luz tem um importante papel, o de gerar uma cascata redutora. Os elétrons via plastocianina ou citocromo c_6 são transferidos para o PSI de onde são transportados através da ferredoxina e ferredoxina *reductase*, pela tiorredoxina para enzimas alvo que reduz as ligações bissulfídicas nessas proteínas que alteram a atividade catalítica do fotossistema. O PSI é outra estrutura proteica, em grande parte nas regiões não empilhadas da membrana dos tilacóides. Este complexo proteico também catalisa a dissociação de cargas induzidas pela luz, em processo semelhante ao PSII, em que a a luz é absorvida no complexo antena e a energia é transferida para uma molécula de clorofila que está localizada no centro de reação. A clorofila oxidada desse centro de reação pode receber outros elétrons até alcanç ar o complexo do *citocromo b6/f* (HANKAMER; BARBER, 1997). O fluxo linear de prótons a partir do PSII até o PSI via complexo do *citocromo b6/f* reduz o $NADP^+$ a $NADPH_2$ que promove uma alteração de pH e confere ao lúmen, interior dos tilacóides, um caráter mais á cido do que o estroma que favorece o funcionamento da enzima ATP*sintase* (ROTT et al., 2011).

Através da membrana dos tilacóides o gradiente de prótons é direcionado à proteína integral ATP*sintase* que é responsável pela síntese de ATP (adenosina trifosfato) a partir do ADP (adenosina difosfato) e fosfato inorgânico, formado durante a fixação do carbono no estroma dos cloroplastos. A ATP*sintase* é um fator de acoplamento estruturado em dois componentes distintos, o complexo hidrofílico denominado CF1 e o complexo hidrofóbico denominado CF0. Os cloroplastos podem também produzir ATP, molécula rica em energia, de forma independente ao transporte de elétrons, utilizando-se apenas da ATP*sintase* e da diferença de potencial químico como fonte de energia, como demonstrado em experimento com inibidores de transporte de elétrons (AMERONGEN et al., 2013; VOET; VOET, 2008). Assim, os produtos primários das reações luminosas são o oxigênio, como subproduto da dissociação da molécula da água, o ATP e o $NADPH_2$ produzindo energia celular para a fixaç ão do CO_2. A fase bioquímica da fotossíntese é uma etapa que utiliza os produtos da fase fotoquímica, o NADPH e o ATP produzidos, para promover a catalisação da fixação e reduçã o do CO_2, no Calvin–Benson–Bassham (CBB) que faz parte das "reações do carbono", com o subsequente ciclo da fotorrespiração, do amido, da síntese de sacarose, pela glicólise e pela respiração mitocondrial, como típicos de uma célula fotossintética (TABITA et al., 2007).

Na bioquímica da fotossíntese, o CO_2 atmosférico entra no metabolismo fotossinté

oxigenase/carboxilase (RuBisCO), molécula aceptora de cinco carbonos e a mais abundante proteína da biosfera com cerca de 50% de todas as proteínas solúveis das folhas e possui baixa atividade específica (3,6 $mol.min^{-1}.mg^{-1}$. proteína) (ANDREWS; LORIMER,1987; LIN et al., 2014). No estroma dos cloroplastos os produtos da reação luminosa são utilizados nas reações de fixação do carbono inorgânico pela RuBisCO na na primeira etapa de reações do CBB, que catalisa numa sequência de reações a redução do CO_2, que produzem carboidratos usados no aumento de biomassa e produção de energia, durante o crescimento e desenvolvimento da planta., faz a fixação do carbono para catalisar a redução de CO_2 que é considerado o processo fornecedor de todo carbono orgânico utilizado pelos organismos (STITT, 2012; EVANS JR, 1986; MAKINO, et al., 1998 CITADO POR SUZUKI; MAKINO, 2013).

A RuBisCO é a proteína mais abundante nas folhas e a responsável pela fixação do carbono inorgânico da biosfera e catalisa a maioria das reações químicas, que comumente

ocorrem nas plantas fotossintetizantes (STITT, 2012; SPREITZER; SALVUCCI, 2002; EVANS JR, 1986). A RuBisCO catalisa tanto a carboxilação quanto a oxigenação da RuBP, com CO_2 ou oxigênio. A reação carboxilase da RuBisCO é feita com três moléculas de CO_2 atmosférico que se combinam com três moléculas aceptoras da 1,5-RuBP. Essa reação forma seis moléculas de 3-fosfoglicerato (3PGA), uma molécula de 3 carbonos que é o primeiro intermediário estável desse ciclo que é reduzido à gliceraldeído-3-fosfato (MUELLER-CAJAR et al., 2011; ANDRESON; BACKLUND, 2008; SPREITZER; SALVUCCI, 2002; 2008). O carbono orgânico fixado é rearranjado na forma de cinco moléculas de 3PGA e percorre através das etapas iniciais do CBB desvios para outras três diferentes rotas, a i) regeneração de três moléculas 1,5-RuBP, mantendo contínua a fixação do carbono reduzido, para formar compostos orgânicos, a ii) fosforilação de açúcares de 6 carbonos, frutose 6-fosfato (F6P) para a síntese de amido e o desvio pela iii) fosforilação de açúcares de 3 carbonos, as trioses fosfato (TrP) exportada para o citoplasma. Os carboidratos exportados para o citoplasma são usados geralmente para a síntese de sacarose, ou reoxidação na glicólise e nas reações da respiração mitocondrial (MUELLER-CAJAR et al., 2011).

A RuBisCO é ativada pela Rubisco *ativase* e ambas as moléculas contem numerosas cisteínas que podem ser reguladas por algum efeito redutor. Alguns fatores adicionais como a relação ADP/ATP podem modular a regulação redox da Rubisco *ativase* que possui duas isoformas que têm papel de ativação da RuBisCO, mas apenas a isoforma maior (46 kDa) da Rubisco *ativase* é modulada pela luz. A isoforma maior parece ser suficiente para alterar ambas as isoformas, em resposta às alterações redox. Em tabaco não há a isoforma maior, apenas a menor (43 kDa) da Rubisco *ativase*, e a regulação da atividade da RuBisCO é feita pelo inibidor 2-carboxyarabinitol 1-phosphate (ZHANG; PORTIS, JR., 1999). Todas as proteí nas da RuBisCO podem formar o complexo carbamato-Mg^{2+} pelo CO_2 primário que é o gatilho da reação com o grupo ε-NH_2 do resíduo de lisina do sítio ativo, que formará o complexo carbamato-Mg^{2+}. A RuBisCO não catalisa apenas reações de carboxilação, também catalisa reações de oxigenação da RuBP no início da fotorrespiração, com formação de CO_2, o qual é liberado, mesmo em folhas onde ainda está ocorrendo fotossíntese. Esforços em melhorar o desempenho da atividade carboxilase da RuBisCO e devido ao importante papel desta enzima na biosfera, tenta-se no sentido de "engenheirar" geneticamente cultivares que contenham uma RuBisCO com maior afinidade pelo CO_2, em diferentes tipos de ambientes para aumentar a disponibilidade de carboidratos, obter ganho de biomassa e aumentar a produção agrícola (MUELLER-CAJAR et al., 2011; KAPRALOV; FILATOV, 2007).

Algumas espécies de monocotiledôneas e crassuláceas desenvolveram respectivamente um mecanismo chamado de metabolismo C_4 e metabolismo das crassuláceas (CAM) que diferem do metabolismo das plantas do tipo C_3. Entre as plantas superiores, as espécies do metabolismo C_3 correspondem a 85%, espécies C_4 a 5% e as espécies CAM a 10%, estas se desenvolveram basicamente em regiões áridas (SAGE, 2004). A enzima anidrase carbônica catalisa a hidratação reversível do CO_2 a HCO_3^- na fase aquosa, suprindo a RuBisCO de CO_2 que é rapidamente desidratado, devido à prejudicial concentração que a anidrase carbônica pode causar às células das plantas (GOWIK; WESTHOFF, 2011). No metabolismo C_4 e CAM o mecanismo de fixação do CO_2 folha o armazenamento do produto primário da molécula de quatro carbonos, antes mesmo que o CO_2 seja fixado pela RuBisCO. Nas espécies C_3 o CO_2 se difunde entre os espaços intercelulares para chegar ao cloroplasto. Nas espécies do tipo C_4 a fotossíntese tem um mecanismo bioquímico que aumenta a do CO_2 de 10 a 100 vezes no sítio catalítico da RuBisCO, nas células da bainha quando com parado ao meio externo atmosférico (FURBANK; HATCH, 1987 citado por UBIERNA et al., 2011). Nas espécies C_4, o CO_2 é convertido em HCO_3^- pela anidrase carbô nica, para em seguida ser formado o oxaloacetato (OOA) com os substratos da fosfoenolpiruvato (PEP) pela enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), localizada no citoplasma. A PEP é produzida a partir do piruvato e do ATP, catalisado pela piruvato fosfato dikinase (PPDK) localizada no cloroplasto. O carbono na forma da molécula de OOA é reduzido a malato, por uma transaminação com alanina. O malato ou aspartato é transportado para as células da bainha vascular onde é descarboxilado, produzindo piruvato e CO_2 que se acumula nestas células que é fixado pela RuBisCO nos cloroplastos das células da bainha para iniciar o CBB como nas plantas de metabolismo C_3. Enquanto a pressão parcial de CO_2 μbar, na bainha vascular essa taxa chega a ser dez vezes maior (1500 μbar). O acúmulo do CO_2 ocorre no mesmo compartimento celular que a RuBisCO, o que reduz a competição com do oxigênio, reduzindo o processo da fotorrespiração (MALLMANN et al., 2014).

O processo da fotossíntese nas espécies com metabolismo CAM também tem o mecanismo bioquímico de concentração do CO_2 e possui uma separação temporal, diferindo do mecanismo C_3 e C_4 onde a concentração do carbono atmosférico ocorre num mesmo ambiente celular. O metabolismo CAM está divido em 4 fases distintas: a diurna (fase 1) a fixação do CO_2 é mediada pela PEPC, com a síntese de malato pela malato desidrogenase

NAD(P)-malato desidrogenase que é acumulado no vacúolo do tecido do mesofilo. Na fase 2 o estômato se mantém aberto para o CO_2 até o amanhecer. Na fase 3 ocorre a descarboxilação do ácido málico e a regeneração do CO_2 que é acumulado e fixado pela RuBisCO, após o fechamento dos estômatos, para evitar a desidratação pela elevação da temperatura do ambiente. Na fase 4, outra fase de transição quando os estômatos voltam a se abrir, ao anoitecer, para a entrada de CO_2 para o interior do mesofilo e recomeçar o mecanismo CAM (TING, 1985). A abertura dos estômatos e a incorporação do CO_2 à noite quando as taxas de evaporação e transpiração são reduzidas, as espécies CAM podem alcançar alta eficiência de á gua que são de três a seis vezes maiores do que a observada em espécies com metabolismo C_3 e C_4, respectivamente (NOBEL, 1996). O metabolismo C_4 e CAM são resultados evolutivos que apresentam uma relação de morfologia funcional que evoluiu no sentido de aumentar a especificidade da reação carboxilase da RuBisCO quando comparado com a atividade oxigenase (GALMÉS et al., 2014). A alteração da Rubisco pela engenharia genética, tornando-a totalmente específica em catalisar a carboxilação pelo CO_2 atmosférico fixado, pode teoricamente aumentar a eficiência da fotossíntese e como consequência aumentar a demanda de energia necessária à planta C_3 para o metabolismo do carboidrato, um aspecto que difere nas plantas de metabolismo C_4 (LONG et al., 2006).

2.2 RuBisCO

A RuBisCO (EC 4.1.1.39) é uma enzima chave, com atividade carboxilase ou oxigenase de alto impacto biológico. Esta enzima possui massa de 560 kDa, com 16 subunidades, forma I, que é hexadecamérica e consiste de dois tipos de subunidades proteicas, oito maiores, 'L', RbcL de 55 kDa, e oito menores, 'S', RbcS de 15 kDa (L_8S_8) (KAPRALOV; FILATOV, 2007; SASCHENBRECKER et al., 2007; LEE; READ; TABITA, 1991). As subunidades maiores são codificadas pelo gene *rbcL*, no cloroplasto e as subunidades menores são codificadas pelo gene *rbcS*, no núcleo (DEAN et al., 1989, citado por SUZUKI; MAKINO, 2013; RODERMEL et al., 1998; HUDSON et al., 1992). As molé culas da RuBisCO presentes na natureza possuem 30% de semelhança entre si, e podem ser separadas em quatro grupos ou formas I, II, III e IV, sendo que, dentro de cada grupo, a identidade da sequência de nucleotídeos é compartilhada a uma taxa que pode variar entre 37% e 85% aproximadamente (SATAGOPAN et al., 2009), mas frequentemente mostra atividades catalíticas e cinética distintas entre as espécies (TABITA, 1999). Mesmo com as diferenças entre as moléculas da RuBisCO dos diferentes organismos, todas podem catalisar as reações de carboxilação e de oxigenação (TAIZ; ZEIGER, 2009). Análises filogenéticas demonstram haver três formas distintas, I, II e III e seis clados da forma IV, oriundas do ancestral archea da proteína RuBisCO. Estas estruturas das diferentes formas de RuBisCO são constituídas de dímeros da subunidade maior (L), com sítios catalíticos. A forma I da RuBisCO é encontrada em cianobactéria, proteobactéria (*green* e *red*), clorófitas, algas, plantas superiores, algas heterokont e haptofitas (*red*) e é estruturada por quatro dímeros com pequenas subunidades no topo e na base do núcleo octomérico (L8) da estrutura que forma a subunidade maior. Apenas a forma I possui subunidades menores e a forma II é encontrada em Proteobactéria, archea e algas dinoflagelados e constituída de dois a oito dímeros da subunidade L (L_{2-8}), dependendo da espécie fotossintetizante. A forma III é encontrada apenas em alguns tipos de archea com um arranjo estrutural formado de L_2 ou $(L_2)_5$ dímeros. A forma IV (forma da proteína RuBisCO-*like* ou RLP) é encontrada em bactéria (não e fotossintetizante), em archea e até o momento foi identificada a forma L_2. As diferentes formas da RuBisCO possuem dímeros como unidade funcional e estruturalmente bem conservada. A forma IV da RuBisCO tem várias características consideradas desfavoráveis, como baixa taxa de *turnover*, baixa afinidade e fixação ao CO_2, devido à atividade

carboxilase, comparado às demais formas dessa enzima (LI et al., 2005; TABITA et al., 2007; TABITA et al., 2008).

Na tentativa de obter mutantes com maior atividade carboxilase da RuBisCO, influenciadas por mutações, linhagens de bactérias foram identificadas pelo uso de mutagê nese direcionada e bioseleção. Relatos mostraram que colônias de cianobactéria *Rhodobacter capsulatus* cresceram em condições autotróficas fotossintéticas e não-fotossintéticas e por isso possibilitou estudos sobre os efeitos das alterações na função catalítica e o reflexo expresso nas propriedades da molécula da RuBisCO (TABITA, 1999). Desde que se tornou viável obter a forma I recombinante, totalmente ativada da RuBisCO de *Synechococcus sp*. (FALCONE e TABITA, 1991), muito similar à de plantas é usada como modelo de estudo sobre a função catalítica desta enzima, por alterações induzidas na sequência do gene *rbc*L. Uma deleção foi projetada no gene de uma RuBisCO-mutante numa linhagem de a *R. capsulatus*, SBI-II$^-$, uma cianobactéria fotossintizante que mostrou melhora no Km da RuBisCO, o que permitiu seu crescimento foto autotrófico com 5% de CO_2 ambiente, mas nã o com 1,5% de CO_2 na ambiente e não houve crescimento sob condições aeróbias quimioautotróficas (SATAGOPAN et al., 2009; SMITH; TABITA, 2003). Após a complementação de *R. capsulatus* SBI-II$^-$ com genes heterólogos da RuBisCO sob condições foto heterotrófica, foto autotrófica, quimiotrófica aeróbica foram escolhidas as condições de seleção e a enzima alvo (SMITH; TABITA, 2003). A linhagem *Synechococcus* mutante com uma deleção no gene *rbcL* das cianobactérias *R. sphaeroides* ou *R. capsulatus* fotossintética (linhagem SB I/II$^-$) serviu como hospedeiro substituto (SMITH; TABITA, 2004).

Alterações naturais na atividade catalítica das subunidades L8S8 RuBisCO indicaram que a enzima evoluiu em resposta às diferentes variações ambientais (TCHERKEZ et al., 2006). A biogênese da RuBisCO tem alta expressão e seu complexo catalítico tem taxas limitadas que beneficiam alterações que podem ser selecionadas e alteradas experimentalmente (WHITNEY et al., 2011a). Essa limitação pode explicar a aparente morosidade da adaptação catalítica da RuBisCO à alteração dos níveis de CO_2 e O_2 atmosfé ricos. Muitas espécies têm respondido à pressão de seleção, adotando alterações bioquímicas e anatômicas que concentra o CO_2 ao redor da enzima. Nas plantas do tipo C_4 devido a uma compartimentalização do CO_2 nas células da bainha tem levado a seleção de sequências codantes que aumentam as taxas de fixação do CO_2 pela RuBisCO. Em transformação de

cloroplasto em tabaco a substituição do homólogo da espécie *Flaveria* da subunidade maior L8 Met309Ile mostrou ser um gatilho para alterar a atividade catalítica da RuBisCO (WHITNEY et al., 2011b).

Algumas isoformas da RuBisCO de algas da linhagem 'vermelha' L8S8 desenvolveram a capacidade catalítica maior do que a observada na linhagem 'verde' L8S8 em plantas vasculares. Em comparação com cultivares do tipo C_3, a RuBisCO de algumas algas vermelhas desenvolveu duas vezes na especificidade CO_2/O_2, com adequadas taxas de carboxilação (vCO_2) e afinidade do CO_2 ao sítio catalítico. A especificidade da formação da estrutura da RuBisCO de algas vermelhas pode usadas na transformação de cloroplasto de plantas superiores (WHITNEY et al., 2001), o que permite identificar aminoácidos responsá veis pelas propriedades catalíticas da RuBisCO que possam ser usadas em alterações dessa enzima nas espécies do tipo C_3 e C_4. A bioengenharia da RuBisCO é dependente de altos ní veis de expressão das subunidades maior e menor o que pode restringir ou gerar incompatibilidades de se usar as isoformas L8S8 da RuBisCO de cianobactérias que podem apresentam níveis catalíticos incompatíveis com o esperado pelas isoformas de plantas superiores (WHITNEY et al., 2011b).

A alteração da RuBisCO em algas unicelulares é facilitada pela disponibilidade de uma deficiência da subunidade menor mutante, que permite o estudo de alterações catalíticas das subunidades L8S8 (WOSTRIKOFF; STERN, 2009). A transformação de plastomas da cianobactéria *C. reinhardtii* mostrou que a substituição de da subunidade maior aumentou a atividade catalítica que pode ser transferido para a RuBisCO de tabaco (ZHU et al., 2010).

Na tentativa de obter uma mutação que prejudicasse a capacidade da RuBisCO para distinguir entre CO_2 e O_2 o que poderia levar a uma alteração no ponto de CO_2 da folha, de modo que não comprometesse a taxa de carboxilação saturado de CO_2, plantas de tabaco foram transformadas pelo método de biolística com uma sequência do gene *rbcL* que apresenta uma mutação no códon para codificar valina ao invés de leucina, com a propriedade de interferir na capacidade da RuBisCO em "diferenciar" o CO_2 do O_2 foliar. Os resultados demonstraram que as plantas não cresceram sem uma atmosfera enriquecida com CO_2, que as plantas de tabaco mutantes apresentaram redução nos valores do *Km* do O_2, a carbamilação foi duas vezes maior e a quantidade de RuBisCO foi similar quando comparado com as plantas não mutantes (WHITNEY et al., 1999).

2.3 Fotorrespiração

Fotorrespiração é um processo metabólico que tem início com a assimilação de O_2, que resulta da reação oxigenase catalisada pela RuBisCO, com papel de recuperar carbono. 2-fosfoglicolato, que corresponde a uma perda de ¼ de carbono, pela fotorrespiração (STITT, 1991). As reações enzimáticas deste processo envolvem três organelas celulares: o cloroplasto, o peroxissomo e a mitocôndria. O O_2 possui maior afinidade ao sítio ativo oxigenase do que o CO_2 ao sítio carboxilase da Rubisco, quando há disponibilidade de luz solar. No cloroplasto, o O_2 se liga ao 2,3-enediol da RuBisCO e formam um composto tóxico, o 2-fosfoglicolato (2PG) que é desfosforilado para produzir glicolato que será metabolizado nos peroxissomo, para ser reciclado a 3-fosfoglicerato (3PGA) (MAURINO; PETERHANSEL, 2010).

Várias etapas enzimáticas envolvem o ciclo C1 da fotorrespiração. A molécula de carbono é recuperada de duas moléculas de 2PG, e um de quatro átomos de carbono é perdido como CO_2 da fotorrespiração. O 2-fosfoglicolato produzido no cloroplasto é hidrolisado a glicolato e se dirige ao peroxissomo com o auxílio de uma proteína transportadora, onde é oxidado a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é tóxico para a planta, e glioxilato. O H_2O_2 é degradado levando à liberação de O_2, enquanto o segundo é transformado em glicina e um amino através de um processo de transaminação. A glicina é transportada à mitocôndria e lá duas dessa molécula serão transformadas em uma molécula de serina, amônio (NH_4^+), CO_2 e formará um NADPH. A serina é transportada de volta ao peroxissomo, onde é convertida, por uma via dependente de NADPH em glicerato, que retorna ao cloroplasto, onde é fosforilado a 3PGA. Já o NH_4^+ é difundido da mitocôndria para o cloroplasto, onde é inserido de forma dependente de ATP a um glutamato, formando glutamina para, em seguida, reagir com 2-oxoglutarato, produzindo duas moléculas de glutamato. No processo metabólico da fotorrespiração parte do ATP e NADPH produzidos são consumidos nas reações dos tilacó ides. (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Relatos sugerem que no início da evolução, quando a proporção CO_2/O_2 era maior, a fotorrespiração não era tão significativa (TAIZ; ZEIGER, 2009). No entanto, com o tempo, a fotossíntese levou à inversão desta proporção, por aumentar a produção de O_2 atmosférico. Assim, no decorrer de bilhões de anos, o processo de fotorrespiração, foi sendo aperfeiçoado (FERNIE et al., 2012). Alguns fatores favoreceram esse processo, como o aumento da

temperatura, que diminui a afinidade da RuBisCO pelo CO_2. Felizmente, existem processos que auxiliam na fixação do carbono, tal como a maior facilidade de dissolução do dióxido de carbono no citoplasma e no estroma de cloroplastos do que a de oxigênio (PETERHÄNSEL; MAURINO, 2011). Embora não se saiba ao certo a função da fotorrespiração, existem algumas teorias, tais como a proteção do sistema fotossintético contra radicais livres de oxigê nio em condições de grande luminosidade (TAIZ; ZEIGER, 2009). Outro estudo mostrou que a assimilação do nitrato pode estar relacionada à fotorrespiração, por um mecanismo ainda sob investigação (Rachmilevirtch et al., 2004, citado por Taiz e Zeiger, 2009).O metabolismo das plantas associado aos resultados de vários experimentos indicam que a fotorrespiração está relacionada a várias outras vias (PETERHÄNSEL et al., 2010; BAUWE et al., 2012, citado por FERNIE et al., 2012), com a interação com o CBB, a respiração, o metabolismo do C1 e do nitrogênio são as mais importantes. Um exemplo dessas interações é a glicina e a serina produzidas pela fotorrespiração serem utilizadas para síntese de proteínas, nas mitocô ndrias ou em outras regiões da célula (FERNIE et al., 2012).

Uma das variáveis estômato déficit de pressão de vapor (DPV). A resposta da condutância estomática em relação importante fator em relação água utilizada pelo eucalipto (LEUNING et al., 1991; MIELKE et al., 1999). H declínio relevante na condutância e, portanto, na fotossí ntese líquida sob altos valores de DPV. Embora o fechamento estomático seja uma resposta comum ao estresse hídrico e a altos valores de déficit de pressão de vapor (DPV), diferentes espécies podem exibir distintos níveis de sensibilidade e taxas de resposta (MEDIAVILLA; ESCUDERO, 2004). A magnitude da redução de gs com o DPV reflete a sensibilidade de resposta das espécies (OREN et al., 1999). Dois clones de eucalipto alcançaram distintos valores de condutância estomática, e ambos tiveram suas condutâncias reduzidas na época seca, demonstrando que o eucalipto exerce controle estomático eficiente em condições de limitado suprimento hídrico no solo. Esse declínio da condutância estomática com a diminuiç ão da quantidade de água disponível no solo também
Lima et al. (2003) para *Eucalyptus phaeotrica* A espécie *E. cloeziana*
ao fecharam seus estômatos ao meio-dia, demostrou sua capacidade em controlar efetivamente a perda de água quando a deman

Embora reduções nos valores de condutância estomática em relação ao aumento do DPV tenham sido demonstradas para diversas espécies, não

Mesmo durante períodos de altos valores de déficit de pressão de vapor (>3 kPa), *E. argophloia* manteve uma alta condutância estomática também outros trabalhos que não demonstram relação entre condutância e DPV (RAWSON et al., 1977; INOUE et al., 1989), os quais devem estar a

2.4 Transformação genética de cloroplastos

O uso de ferramentas biotecnológicas permite através da engenharia genética, pela tecnologia do DNA recombinante, a introdução de genes exógenos em plantas (PERANI et al., 1986 citado por CARRER et al., 2010) (Tabela 1). Assim, através de modificações gené ticas, foi possível a expressão de características desejáveis em plantas, tais como resistência a stress hídrico e aumento de produtividade. Plantas transgênicas podem ser produzidas de duas formas: transformação direta, por meio de processos químicos e físicos, e por transformação indireta, por meio de bactéria do gênero *Agrobacterium*. Na transformação direta, as membranas e paredes celulares sofrem ruptura, ou alterações de forma a facilitar a entrada do gene de interesse no genoma da planta receptora. Dentre os métodos diretos, o bombardeamento de micropartículas (biolística), criado por Klein et al. (1987) é um dos mais eficientes e o mais utilizado. Nesse método, o plasmídeo contendo o gene de interesse recobre micropartículas de ouro ou tungstênio, que é bombardeado no tecido da planta que se deseja transformar. O genoma nuclear é o mais utilizado no processo de transformação genética, e o genoma dos cloroplastos, apresenta a biolística, como a ferramenta mais utilizada no processo de transformação (CARRER et al., 2010) capaz de romper de romper a dupla membrana desta organela (BOCK, 2001; RUF et al., 2001). Além disso, a capacidade de interação entre o genoma nuclear e plastidial permite a formação de complexos relacionados ao sistema fotossintético. Os trabalhos de transformação de mitocôndrias ainda não geraram uma tecnologia eficiente de transformação de seu genoma (CARRER, 1998).

A transformação do cloroplasto é feita principalmente pelo método da biolística em tecido foliar, usando-se vetores de transformação (SVAB; MALIGA, 1993) ou em menor regularidade, pelo método polietilenoglicol (GOLDS et al., 1993). A transformação do cloroplasto depende da compreensão do processo pelo qual o plastoma alvo esteja totalmente suplantado pelo transplastoma que é gerado pela recombinação homóloga do vetor

transformação que contém o gene exógeno com o plastoma alvo, resultando na integração do gene de interesse e marcadores seletivos, em sítios de restrição específicos (MALIGA 2004). Subsequente à inserção do DNA transformante no genoma do cloroplasto, inicia-se com uma única ou de poucas moléculas exógenas no transplastoma vários eventos de divisões do cloroplasto e da célula, do tecido vegetal transformado, que após sucessivos cultivos em meio de seleção e regeneração de plantas sob ação do gene marcador seletivo permitirá a obtenção da homoplasmia e a produção de plantas transplastômicas estáveis. O gene marcador seletivo mais usado tem sido o gene *aad*A que codifica para aminoglicosidase adeniltransferase e confere resistência aos antibióticos espectinomicina e estreptomicina (DAY; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, 2011; MALIGA 2004). Essa estabilidade é obtida quando a planta transplastômica está em estado de homoplasmia que corresponde à substituição de todas as cópias dos plastoma pelo transplastoma. (BOCK, 2001; BOCK; KHAN, 2004; MALIGA, 2004).

Os cloroplastos são as organelas responsáveis pela fotossíntese nas células, que estão presentes em algas e plantas terrestres. Atualmente, várias espécies de plantas apresentam sequenciado o genoma desse plastídio. Esse sequenciamento é imprescindível para conhecer os genes envolvidos no metabolismo e a comunicação com os genes do núcleo, que são expressos nos cloroplastos (Svab et al., 1990; Carrer, 1998). Vantagens da transformação genética do cloroplasto podem ser destacadas pelo uso de genes marcadores seletivos que podem ser eliminados do plastoma pelo uso do método de recombinação do sítio específico *cre-lox* pois há a preocupação de eliminação a resistência ao antibiótico pelas gerações subsequentes de plantas transplastômicas, devido ao fluxo gênico. O número de genes marcadores seletivos para transformação do genoma do cloroplasto é restrito (CARRER et al., 1993), assim tem-se feito uso do sítio específico *integrase* phiC31 de bacteriófago (fago) e o uso de sequências repetidas para excisão de um gene pela recombinação homóloga. A vantagem da transformação do cloroplasto, deve-se à quantidade de transcritos, devido à ploidia e o menor risco ecológico, já que o pólen não carrega plastídeos, devido à ausência de cloroplasto em níveis considerados significativos no pólen na maioria das espécies cultivadas (ROGALSKI; CARRER, 2011). Técnicas estão em desenvolvimento para obter plastídios transformantes sem marcadores que não teriam utilidade fisiológica nas plantas transplastô micas (HANSON et al., 2012; MALIGA; BOCK, 2011).

Os vetores de transformação usados na transformação do cloroplasto são derivativos de *E. coli*, que possuem sequências de DNA plastidial (ptDNA) clonadas, que flanqueiam o sí tio de clonagem e o marcador seletivo em ambos os lados. O ptDNA serve para a integração direta no genoma plastidial, funcionando como região alvo. (MALIGA, 2004). Vetores de transformação podem ser construídos no sentido de inserir um gene de interesse, para deleção ou mutação que possa alterar qualquer parte do plastoma, através do processo natural da recombinação homóloga que ocorre no cloroplasto. O acúmulo de proteína não nativa se mostrou possível, e estudos visam controlar os níveis de expressão para obter máxima expressão. A região "Downstream Box", que consiste nos 10-15 códons, logo após o códon de iniciação, que foi primeiramente identificada em *E. coli* demonstrou afetar de forma considerável a expressão de proteínas codificadas pelo transgene nesta bactéria e ter efeito em cloroplastos de tabaco. Em geral, a transcrição do transgene é comandada por um promotor adjacente à região codante do gene, já incluso, no próprio vetor de transformação (Hanson; Gray; Ahner, 2012).

Diversos sistemas de transcrição híbridos estão sendo desenvolvidos, com capacidade de tornar tecido-específica a expressão dos genes de interesse, sendo de grande importância para a engenharia de fotossíntese para regular, de forma adequada, os genes introduzidos ou induzidos. Por outro lado, também podem ser incorporados ao transgene uma 5' UTR (região não traduzida 5') para possibilitar controle da expressão de proteínas, que teriam o papel de aumentar a atividade da fotossíntese. Diversos estudos e experimentos foram realizados utilizando-se o cloroplasto de tabaco. O aumento dos níveis de enzimas importantes tem sido o objetivo de muitos dos esforços recentes na tecnologia de transformação de cloroplastos, tanto para a indústria ou para produtos farmacêuticos. No entanto, a baixa expressão do gene introduzido pode ser necessária, para não interferir no metabolismo ou atrapalhar o processo da fotossíntese. Dois caminhos podem ser utilizados para aprimorar a fotossíntese, expressar enzimas com potencial de atuação direta na fotossíntese, o outro seria reduzir a perda de energia na fotossíntese pelo uso enzimas (Hanson; Gray; Ahner, 2012).

Presume-se que a transformação do cloroplasto produza um alto número de cópias do plastoma (centenas por célula), comparado ao genoma nuclear que produz menos de 10 cópias por célula e a ausência de silenciamento no plastoma, que possibilita a expressão de um alto número de genes exógenos no genoma do cloroplasto das plantas superiores. Muitos trabalhos relatam a produção de proteínas a partir de genes inseridos no plastoma correspondendo de 5

a 15% (MALIGA; BOCK, 2011) e situações em que são produzidas mais de 30% das proteí nas solúveis totais Estas características da transformação do cloroplasto devem-se à vantagem da ausência de efeitos epigenéticos e silenciamento o que contrasta com o núcleo de um transformante, onde o acúmulo de proteínas é variável, independe da planta transformada e raramente o o o plastoma do é transmitido via pólen para outra planta, evitando a transferê ncia transversal de genes (RUF et al., 2001; SVAB; MALIGA, 2007). Atualmente para efeito de segurança para se evitar a essa transferência, como a resistência a antibióticos, novas té cnicas têm sido desenvolvidas para produção de transformantes livres de marcadores (DAY; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, 2011; SINAGAWA-GARCÍA et al., 2009).

Muito esforço tem sido feito para otimizar a característica das regiões gênicas regulató rias ou regiões codantes para alcançar o potencial máximo da expressão do gene de interesse inserido em cloroplastos. Algumas das características importantes de um gene são o promotor, a região não-traduzida (UTR) 5' (5' UTR), as sequências do resíduo ou aminoácido N-terminal, os códons frequentes (*codon usage*) e a 3' UTR. O desenho de transgenes para alto nível de expressão no plastoma é relevante na engenharia que se deseja alterar o processo da fotossíntese através da transformação do cloroplasto. Relatos de transformação do cloroplasto usam diversos promotores como os sítios *nuclear-encoded polymerase* (NEP) e α2ββ' *plastid-encoded polymerase* (PEP), os promotores 16S rRNA (P*rrn*16) ou *psbA* (P*psbA*) (SINAGAWA-GARCÍA et al., 2009), os promotores sintéticos alterando o promotor P*rrn* nativo do cloroplasto para incluir um *operon lac* de *E. coli*, os promotores para dirigir a expressão do gene *gfp*, do fator sigma e do gene T7 RNA *polymerase* (McBRIDE et al., 1995). A escolha adequada do sítio de inserção no genoma do cloroplasto pode produzir altos níveis de mRNA e consequentemente pode tonar alta a produção proteica do transgene, como demonstrado pela inserção do promotor ribossomal heterólogo no mesmo sítio que foi inserido o gene *uid*A à direita da sequência codante do gene *aad*A que produziram respectivamente altos níveis do mRNA monocistrônico *uid*A e da proteína β-glucuronidase de conformação quaternária (STAUB; MALIGA, 1995) e a inserção do promotor *psb*A que dirigiu alta produção proteica em transplastomas (GRAY et al., 2009, 2011).

A regulação de genes em nível pos-transcricional, como a incorporação da região 5' UTR como do o gene *psb*A e *rbc*L de cloroplasto (YANG et al., 2012; SINAGAWA-GARCÍ A et al., 2009) e o o gene T7 de um fago (bacteriófago) (KURODA; MALIGA, 2001a; OEY et al., 2009a, 2009b) podem promover altos níveis de expressão nos cloroplastos

transformantes. A região denominada *downstream box* (DB) à direita do códon de iniciação por 10–15 códons, identificada em *E. coli* em sinergia com a Sequência Shine-Dalgarno à esquerda do códon iniciador funcionaram bem em cloroplastos acumulando proteínas de genes exógenos (GRAY et al., 2009, 2011; KURODA and MALIGA, 2001a,b; YE et al., 2001). A maturação do RNA e a prevenção contra deleção por ribonucleases pode ser promovida pela estrutura do *hairpin-loop* das sequências *rps*16, *rbc*L, *psb*A and *rpl*32 3'UTR à direita do códon de parada nos cloroplastos, pode regular com eficiência a expressão de genes exógenos em cloroplastos transformantes (STERN et al., 2010; MONDE et al., 2000a, 2000b; EIBL et al., 1999).

Usando a estratégia da recombinação homóloga que ocorre nos cloroplastos, determinadas sequências de leitura aberta com potencial de codificar uma proteína, as ORFs podem ser essenciais para o estratégias de alteração do processo da fotossíntese e que têm sido identificadas no genoma do cloroplasto (BOCK; KHAN, 2004) para alterar por via deleç ões ou mutações, como o nocaute (*knockout*) produzido no genoma do cloroplasto que mostraram o papel do PSI na operação, desenvolvimento e estabilidade da fotossíntese e pelo método da mutação da NADH desidrogenase implicada no fluxo de elétrons ao redor do PSI. Outras alterações realizadas via engenharia genética, pelo processo de mutação das subunidades da RuBisCO (WHITNEY et al., 2011a; BOCK; KHAN, 2004; ANDREWS; WHITNEY, 2003) que podem possibilitar maior eficiência na fixação do carbono em plantas vasculares (LONG et al., 2006), especialmente em plantas do tipo C_3 que não apresenta a mesma vantagem morfológica de concentrar o carbono como observado nas espécies do tipo C_4. Algumas estratégias que já desenvolvidas para aumentar a capacidade catalítica da RuBisCO aumentando a taxa fotossintética ou reduzindo a taxa da fotorrespiração a partir da reação da RuBP (KAJALA et al., 2011; PETERHÄNSEL, 2011; WHITNEY et al., 2011a; ZHU et al., 2010)

A alteração da função nativa da RuBisCO é um esforço feito pelo usando o método da transformação genética que tem produzido interessantes fenótipos nos transformantes. A substituição do gene *rbc*L pelo gene *aad*A no plastoma de clones de tabaco gerou plantas com fenótipo verde claro ou brancas, capazes de sobreviverem em meio de cultura com sacarose. Essas plantas transplastômicas, após terem o gene *rbc*L substituído foram retransformadas com um transgene nuclear integrado à região codante do gene *rbc*L com uma sequência do cloroplasto que expressa um peptídeo de trânsito o que fez a RuBisCO mostrar 3% de

atividade funcional e essas plantas transplastômicas passaram a exibir o fenótipo verde (KANEVSKI; Maliga, 1994). Este experimento mostrou que a atividade funcional da RuBisCO pode ser obtida quando a sequência codante da subunidade maior inserida no nú cleo é capaz de sintetizar no citoplasma e ser transportada para o cloroplasto. Em outro experimento foi feita a inserção do marcador 6xHis (histidina) na porção C-terminal do gene *rbc*L de tabaco sem a inserção de um gene marcador, mas com a sequência 16S rRNA que confere resistência a espectinomicina.

Tabela 1 - Transformação do cloroplasto com alteração no fenótipo de algumas espécies transplastômicas

Alteração na Rubisco	Resultado	Referência
Troca do *rbc*L de tabaco pelo *rbc*L de tomate	Verde Claro	ZHANG et al., 2011
Troca *rbcL* tabaco por *rbcL* de *Flaveria* C_3	VC; dependente de alta $[CO_2]^*$	WHITNEY et al., 2011b
Inserção gene *gfp*	Expressão GFP	VERHOUNIG et al., 2010
Troca do *rbcL* de tabaco com gene que codifica as subunidades menor e maior da RuBisCO de e *Synechococcus*	Plantas juvenis; dependência de alta $[CO_2]$	WHITNEY et al., 2009
Troca *rbcL* tabaco por RuBisCO de *Methanococcoides burtonii*	Dependente de alta taxa de $[CO_2]$	ALONSO et al., 2009
Inserção do sistema T7 RNA polimerase	Verde claro em plântulas	MAGEE et al., 2007
Adição de 6xHis no *rbc*L do plastoma de tabaco	Acúmulo de zinco	RUMEAU et al., 2004
Inserção do do sistema T7 RNA polimerase e do gene ácido polihidroxibutírico (PHB) no cloroplasto	Produzir PHB	SSL et al., 2005
Inserção do gene ácido polihidroxibutírico (PHB) no cloroplasto	Produzir PHB; gerou plantas estéreis e com baixo crescimento	LÖSSL et al., 2003
Troca do *rbc*L de tabaco pelo *rbc*L de couve-flor	Clorose; dependente de alta $[CO_2]^*$	ANDREWS; WHITNEY, 2003; KANEVSKI et al., 1999
Adição de genes da RuBisCO de diatomácea e rodófita no plastoma de tabaco	Proteína insolúvel	WHITNEY et al., 2001
Adição de 6xHis no *RbcS* do plastoma de tabaco	Baixa expressão	WHITNEY; ANDREWS, 2001a
Troca do *rbcL* de tabaco por *rbcM* de *Rhodospirillum rubrum*	Dependente de alta taxa de $[CO_2]$	WHITNEY; ANDREWS, 2001b
Troca do *rbc*L de tabaco pelo *rbc*L de *Synechococcus*	Plantas amarelas; dependente de sacarose	KANEVSKI et al., 1999
Inserção em plantas transplastômicas do gene T7 RNA polimerase		MCBRIDE et al., 1995
Deleção do *rbc*L do plastoma de tabaco pelo gene marcador *aad*A e inserção nuclear do gene *rbc*L de tabaco	Verde Claro e recuperação da atividade da RuBisCO	KANEVSKI and MALIGA, 1994

*VC = verde claro; **$[CO_2]$ = concentração de CO_2; *rbc*L: gene da subunidade maior da RuBisCO; rbcS: gene da subunidade menor RuBisCO.

3 MATERIAL E MÉTODOS.

3.1 Plantas de tabaco *in vitro*

Os experimentos desta tese foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Agrí cola, Otto Jesu Crocomo do Departamento de Ciências Biológicas, da Escola Superiror de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. As plantas de tabaco utilizadas neste trabalho foram obtidas a partir da germinação de sementes da cultivar *Petit havana* foram desinfestadas em solução de solução de etanol 70% por 5 segundos, em seguida adicionadas em solução comercial de hipoclorito de sódio 20% por 15 minutos e lavadas três vezes em água autoclavada. Após desinfestação as sementes foram colocadas em frascos contendo meio RM composto por sais MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962) e 30 g/L de sacarose. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento a 27 ± 2°C, em fotoperíodo de 16 horas. As plantas obtidas foram micropropagadas pela brotação das gemas laterais para obtenção de plantas suficientes para prover as folhas para os experimentos de transformação genética de cloroplastos.

3.2 Vetores de transformação de cloroplastos

Os vetores utilizados neste trabalho de tese foram preparados no Laboratório do Prof. Dr. Pal Maliga, Waksman Institute na Rutgers University, EUA de acordo com as especificaç ões obtidas da mutagênese direcionada no gene *rbc*L de *Synechococcus* selvagem desenvolvidos pelo grupo do Dr. Robert Tabita, da The Ohio State University, EUA que também colaborou para o desenvolvimento deste trabalho de tese.

De acordo com Satagopan et al. (2009), o gene *rbc*L da cianobactéria *Synechococcus* foi submetido à mutagênese de sítio-direcionado, pela técnica de *error-prone* pela PCR, uma té cnica em que as mutações possam ser inseridas em DNA de qualquer espécie. As interações de resíduos de aminoácidos conservados da subunidade maior da RuBisCO em diferentes espécies de cianobactérias influenciaram a cinética enzimática das colônias *Synechococcus* mutante. O sequenciamento de DNA do gene *rbc*L confirmou que a mutação supressora foi devido a alteração de um nucleotídeo no códon GCT (Alanina-A) para GTT (Valina-V) na posição 375 da proteína. Esta alteração na sequência do gene *rbc*L mostrou a habilidade da

enzima em manter o crescimento foto autotrófico, sob condições limitantes de concentração de CO_2, assim revelou uma mudança positiva causada pela mutação, quando comparada à enzima nativa da cianobactéria controle. Os resultados da atividade catalítica da RuBisCO com a mutação A375V mostraram que houve redução da sensibilidade da enzima-mutante ao oxigênio, mas não a perda da especificidade por CO_2/O_2 (SATAGOPAN et al., 2009).

Com o objetivo analisar se esta mutação interfere no processo fotossintético de plantas superiores, utilizando plantas de tabaco como modelo, foram construídos vetores de transformação cloroplastidial para o gene *rbc*L com a mutação homóloga A375V pelo grupo do Prof. Pal Maliga. Os vetores pTT629 e pTT632 possuem a sequência do gene *rbc*L original e os vetores pTT630 e pTT633 apresentam a alteração A378V (Figura 1A e B). Todos possuem o cassete de expressão para o gene marcador seletivo *aad*A, que codifica a adeniltransferase de aminoglicosídeos e confere resistência ao antibiótico espectinomicina e estreptomicina usualmente utilizado como agente de seleção de plantas transgênicas cloroplastidiais (transplastômicas). Este gene de seleção está sob controle do promotor e terminador do gene *psb*A. Os vetores possuem a região flanqueadora dos genes da região de inserção do gene *rbc*L e *acc*D. O vetor de transformação pTT629 é derivativo do vetor pKMS37, obtido a partir do plasmídeo pSS23 e o vetor pTT630 é derivativo do vetor pKMS38, obtido do plasmídeo pSS21. Estas construções (pSS23 e pSS21) fazem parte da nova geração de vetores sintéticos *rbc*L::*aad*A::*acc*D para transformação de cloroplastos de plantas (SINAGAWA-GARCIA et al., 2009). Os vetores pTT632 e pTT633 são derivativos do pSS23. Os vetores pTT629 e pTT630 possuem sítios de restrição que foram excluídos nos vetores pTT632 e pTT633 (Figura. 1). Nos quatro vetores, foi inserido o sítio de restrição *Acc*I à esquerda do códon da alanina nos vetores pTT629 e pTT632 e no códon da valina nos vetores pTT630 e pTT633 (Tabela. 2). A sequência do gene *rbc*L nativo possui uma sequê ncia de reconhecimento da enzima *Acc*1 na posição 5' do gene 321 pb de distância do sítio *Acc*I introduzido nos vetores (Figura3).

Os plasmídeos pTT629, pTT630, pTT632 e pTT633 foram retransformados em cepas de células competentes de DH5α de *Escherichia coli* pela técnica “heat shock” (INOUE et al., 1990) para manutenção e armazenamento estável dos vetores em *E. coli*.

O DNA plasmidial de cada vetor foi preparado pelo kit *Qiagen Maxi Kit* (QIAGEN Inc., Valencia, CA), segundo recomendações do fabricante para purificação e obtenção da

quantidade de DNA suficiente para os experimentos de transformação genética. Obteve-se em torno de 500 µL na concentração de 1µg/µL. O DNA isolado foi quantificado visualmente por eletroforese em gel agarose 1% e por *nanodrop 2000c* (Thermo Scientific). A confirmação da presença do gene *rbc*L foi feita pela clivagem dos sítios de restrição *Nde*I e *Blp*I pelas correspondentes enzimas, em bloco seco a 37°C durante 1 hora.

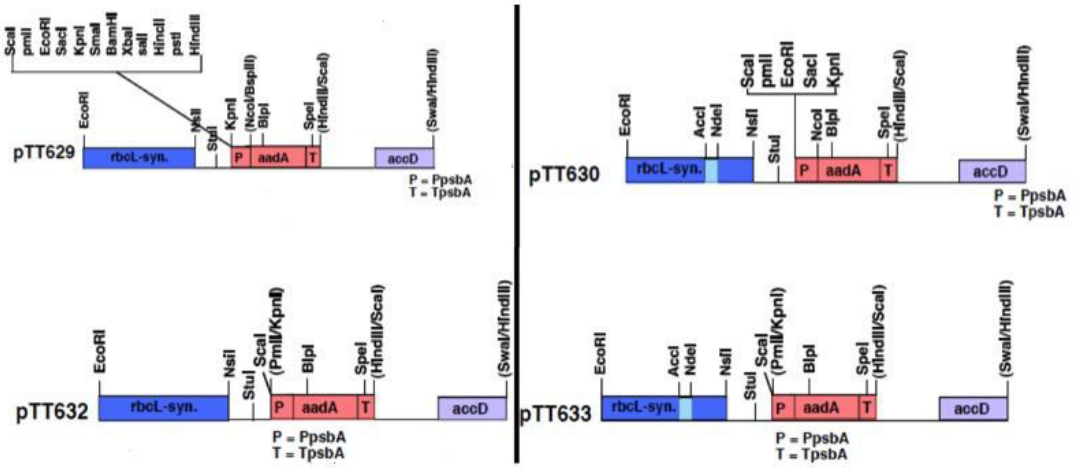


Figura 1 - Mapas das sequências lineares dos plasmídeos vetores pTT629, pTT632 que não apresentam a mutaçã o e pTT630, pTT633 que possuiem a mutação A378V flanqueada pelos sítios de restrição *Acc*I e *Nde*I

Tabela 2 - Alinhamento da sequência do gene *rbc*L entre os nucleotídeos 58704 a 58763 do gene nativo e dos vetores. A Sequência do gene *rbc*L nativo (NCBI) e dos vetores pTT629 e pTT632 apresentam a sequência GCT (correspondente ao aminoácido alanina, em amarelo, sublinhado) e os vetores pTT630 e pTT633 apresentam presença do códon GTT correspondente ao aminoácido valina (em azul e sublinhado). Em cinza está demonstrado a Sequência do sítio de restrição *Acc*1(CTCTAC) presente somente nos vetores e *Nde*I (CATATG) utilizados para identificação das plantas transgênicas

Identificação	*Acc*I	A378V	*Nde*I
*rbc*L_*N.tabacum*_NCBi 58704	TCTCTTTACCAGGTGTTCTACCCGTGGCTTCAGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCT 5		
pTT629_*rbc*L_não_mutante	TCAGTCTACCAGGTGTTCTACCCGTGGCTTCAGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCT		
pTT630_*rbc*L_mutante	TCAGTCTACCAGGTGTTCTACCCGTGGTTTCAGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCT		
pTT632_*rbc*L_não_mutante	TCAGTCTACCAGGTGTTCTACCCGTGGCTTCAGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCT		
pTT633_*rbc*L_mutante	TCAGTCTACCAGGTGTTCTACCCGTGGTTTCAGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCT		
	.....*******	**********	

3.3 Transformação genética de cloroplastos de tabaco

Os experimentos de transformação genética de cloroplastos foram realizados por biolí stica utilizando o acelerador de partículas PDS 1000/He (Biolistic® Particle Delivery System) Bio-Rad™ (SANDFORD, 2000). Folhas jovens de tabaco foram bombardeamentos com cada um dos plasmídeos pTT629, pTT630, pTT632 e pTT633.

No processo de transformação genética foi usado 2 mg de micropartículas de ouro de 1 micrômetro para cada preparo. As partículas foram lavadas com 1 mL de etanol 100%, precipitadas por centrifugação a 5000 xg por 1 segundo, removeu-se o sobrenadante (etanol), e adicionou-se 1 mL de água deionizada destilada (H_2O_{dd}), para retirar qualquer resquício de etanol. Após centrifugação de 5000 xg por 1 segundo, uma nova alíquota de 1 mL de H_2O_{dd} foi adicionada ao precipitado de ouro que foi suspendido para em seguida serem feitas alí quotas de 145 µL da solução ouro-H_2O_{dd} em novos tubos de 1,5 mL esterilizados por autoclavagem. Adicionou-se em cada tubo 25 µg de DNA plasmidial, 50 µL de $CaCl_2$ (2,5 M) e 20 µL de espermidina (1 M), que foram agitados em vortex durante 10 minutos para separar as micropartículas e evitar aglomerados. A solução foi centrifugada a 5000 xg por 1 segundo, retirado o sobrenadante e em seguida foi adicionado 500 µL de etanol 100%, o material foi suspendido, centrifugado a 5000 xg por 1 segundo e descartado o sobrenadante, com o cuidado que não ficasse nenhum resquício de H_2O_{dd}. Em seguida foi adicionada, em cada tubo, uma nova alíquota de 60 µL de etanol 100%, homogeneizado para em seguida serem igualmente distribuídas sobre 10 membranas carreadoras usadas no processo de transferência do DNA para o interior das células foliares de tabaco por biolística.

Folhas jovens de tabaco foram transferidas para placas de Petri contendo meio RMOP, o qual consiste de sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g/L de sacarose, 1 mg/L de N6-benziladenina (BAP), 0,1 mg/L de ácido naftaleno acético (ANA), 0,1 mg/L de tiamina, 100 mg/L de inositol e 7 g/L de ágar. Um total de duas a três folhas de tabaco com o lado abaxial voltado para cima foram colocadas sobre o meio de cultura e foram bombardeadas com as micropartículas de ouro recobertas com o DNA de cada vetor individualmente. No total foram realizados 6 bombardeamentos com cada um dos vetores pTT629 e pTT630 e 4 bombardeamentos com cada um dos vetores pTT632 e pTT633.

Após o bombardeamento, o material vegetal foi mantido em repouso durante 24 horas, para recuperação do estresse físico causado pelo bombardeamento. Em seguida as folhas foram segmentadas em pequenos pedaços de 0,5 cm^2 e transferidas para o meio seletivo, RMOP com o antibiótico espectinomicina (500 mg/L), onde permaneceu por até seis semanas sob condições de luz.

Também, foram preparadas duas placas com folhas de tabaco não transformado em meio RMOP como controle positivo para o demonstrar que meio de cultura foi preparado adequadamente e outras duas placas de Petri com meio RMOP adicionado do antibiótico espectinomicina (500 mg/L) como controle negativo para demonstrar o efeito do antibiótico como agente seletivo.

Aproximadamente 3 a 4 semanas após cada um dos experimentos de transformação genética, os primeiros brotos emergiram das folhas seccionadas. Plântulas com 0,5 cm de altura resistentes a espectinomicina foram transferidas para meio fresco RM adicionado de 500 mg/L espectinomicina, para o crescimento e desenvolvimento de novas folhas e raízes, que foram consideradas geração T_0.

3.4 Obtenção de Plantas transplastômicas Homoplásmicas

Para se obter plantas transplastômicas homoplásmicas, quando todas as cópias do genoma cloroplastidial recebeu o transgene, é necessário a obtenção de novas gerações de plantas regeneradas a partir de folhas. Assim, foi realizado a introdução de segmentos de folhas de plantas T_0 em meio de regeneração RMOP com 500 mg/L de espectinomicina e sucessivamente novas gerações foram obtidas. As novas plantas obtidas deram origem as gerações clonais T_1 até T_7.

Segmentos de folhas de plantas dos ciclos de regeneração em meio seletivo T_2 ou T_4 também foram subcultivados em meio fresco RMOP com dois agentes seletivos espectinomicina (500 mg/L) e estreptomicina (500 mg/L), para eliminar a possibilidade de ter ocorrido a presença de mutantes espontâneos que pudessem conter o gene *rrn* (ribossomal 16rDNA) que confere resistência à espectinomicina (SVAB; MALIGA, 1993). Desde que o

gene *aadA* confere resistência aos antibióticos espectinomicina e estreptomicina, somente as plantas com integração do gene *aad*A poderiam continuar a ter o desenvolvimento em meio RMOP com estreptomicina. A seleção dos transformantes primários não é realizada inicialmente em meio de cultura com estreptomicina por apresentar toxicidade e interferir na regeneração de plantas. As plantas transformadas foram subcultivadas entre da geração T_0 a T_7 e mantidas em meio de crescimento RM com 500 mg/L de espectinomicina para manutenç ão das linhagens transgênicas até serem transferidos para casa de vegetação.

3.5 Identificação das linhagens transgênicas por PCR

As plantas geradas após a transformação com os vetores pTT629, pTT630, pTT632, pTT633 e plantas de tabaco selvagem (WT) cultivados *in vitro* tiveram o DNA total isolado a partir de 200 mg de folhas maceradas em nitrogênio líquido pelo método CTAB (DOYLE E DOYLE, 1987).

A amplificação da sequência do gene marcador seletivo *aad*A foi realizada para identificar as plantas transgênicas utilizando os oligonucleotídeos *aad*A-F e *aad*A-R (Tabela 3) obtendo um fragmento esperado de 650 pb. Para a amplificação do gene *rbc*L, diferentes pares de oligonucleotídeos foram utilizados para identificar as construções *rbc*L::*aad*A::*acc*D e *atp*B::*rbc*L::*aad*A::*acc*D. Os oligonucleotídeos utilizados estão descritos na tabela 3.

Tabela 3 - Sequência dos oligonucleotídeos usados para amplificação por PCR do gene *aad*A e fragmentos específicos na sequência *atp*B::*rbc*L::*aad*A::*acc*D

Gene de interesse	Direto	Direto 5' → 3'	Reverso	Reverso 5' → 3'
*rbc*L	*rbc*L-F	TGGACAACTGTATGGACCGA	*rbc*L-R	CTAGAGCAGGAAGTAATGCTCG
*aad*A	*aad*A-F	GCAGTGGATGGCGGCCTGAAG	*aadA*-R	GGTGATCTCGGCTTTCACGTAG
rbcL::*aadA*	*rbc*L-F2	CCACAAACAGAGACTAAAGCAA	*aadA*-R2	AGCCGAAGTTTCCAAAAGGT
*atp*B::*rbc*L::*aad*A	*atp*B-F1	CACGGAATTCGTGTCGAGTAGACC	*aadA*-R2	AGCCGAAGTTTCCAAAAGGT
*rbc*L::*aadA*::*acc*D	*rbc*L-F2	CCACAAACAGAGACTAAAGC	*acc*D-R2	TCATAGTTGGAGGAATCGTGA
*atp*B::*rbc*L::*aad*A::*acc*D	*atp*B-F1	CACGGAATTCGTGTCGAGTAGACC	*acc*D-R1	GACCAAGACTGCCCATTGAT

O ciclo de amplificação foi diferente devido a otimização de amplificação feita para cada par de oligonucleotídeos, direto e reverso. Os ciclos utilizados estão descritos na tabela 4.

Tabela 4 - Ciclo de amplificação para amplificação dos segmentos de DNA cloroplastidial para os pares de oligonucleotídeos

Segmento de interesse	Ciclo de amplificação
*rbc*L	94°C – 2 min, 30 ciclos: 94°C – 45 seg; 58°C – 30 seg; 72°C – 1 min, extensão: 75°C – 5 min
*aad*A	94°C – 2 min, 30 ciclos: 94°C – 45 seg; 60°C – 45 seg; 72°C – 1 min, extensão: 75°C – 5 min
*rbc*L::*aad*A	94°C – 2 min, 45 ciclos: 94°C – 45 seg; 58°C – 45 seg; 72°C – 1min 20 seg, extensão: 75°C – 5 min
*atp*B::*aad*A	94°C – 2 min, 45 ciclos: 94°C – 45 seg; 58°C – 45 seg; 72°C – 3 min, extensão: 75°C – 10 min
*atp*B::*acc*D	94°C – 2 min, 45 ciclos: 94°C – 45 seg; 58°C – 45 seg; 72°C – 3 min, extensão: 75°C – 10 min

3.6 Identificação do gene *rbc*L nas linhagens transgênicas

Os vetores de transformação pTT629, pTT630, pTT632 e pTT633 possuem as regiões codante dos genes *rbc*L-sintético de 1,4 Kb, do gene *aad*A com 0,8 Kb e do gene *acc*D com 1,5 Kb. O códon GCT (GenBank acesso nº Z00044) refere-se ao aminoácido alanina de nú mero 378 no gene *rbc*L das plantas controle e nos vetores pTT629 e pTT632. Este códon foi alterado para GTT que codifica do aminoácido valina e está presente no gene *rbc*L sintético dos vetores pTT630 e pTT633 entre o sítio de restrição *Acc*I e *Nde*I. (Tabela 2).

O DNA isolado de plantas de tabaco não transgênica designadas de controle e das 35 plantas transplastômicas que confirmaram a presença do gene *aad*A por PCR foram amplificados por PCR com os oligonucleotídeos *atp*B-F1 e *acc*D-R1 (Tabela 3). O fragmento obtido nas plantas controle foi de 2,2 kb e nas plantas transgênicas de 3,4 kb que confirma a presença dos genes *rbc*L e *aad*A integrados entre *atp*B e *acc*D (Figura.2). Ainda, a

amplificação com os oligonucleotídeos *rbc*L-F2 e *aadA*-R2 (Tabela 3) com 2,2 kb confirmou a presença das plantas transplastômicas (Figura 2).

Após a confirmação da inserção do cassete *rbc*L*::aad*A*::acc*D os segmentos amplificados foram purificados com o kit QIAEX II Gel *Extraction Kit* (Quiagen) e clivados com enzimas de restrição *Acc*1 e *Nde*1 para confirmar se houve a correta substituição da sequências do gene *rbc*L original (controle) pelo sintético dos vetores nas plantas transplastô micas.

A metodologia de clivagem utilizada teve como base a reação com até 1 µg de DNA total, volume de H_2O dd (para completar volume final da reação de 20uL), de 2 µL de tampão (10x) correspondente à enzima usada e 1 µL de enzima de restrição (10 unidades/µL), a temperatura de 37ºC, por 2 horas. O resultado da clivagem foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 2%.

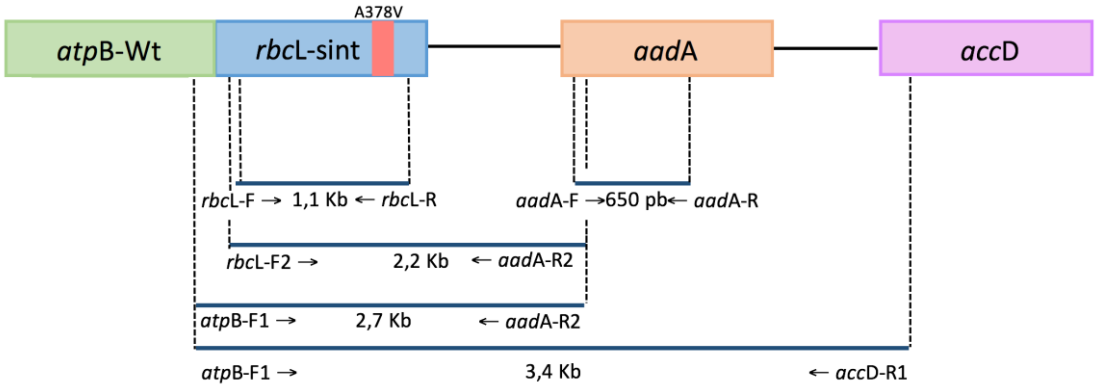


Figura 2 - Esquema dos fragmentos esperados em reações de amplificação por PCR utilizando diferentes oligonucleotídeos na sequência *atp*B::*rbc*L::*aad*A::*acc*D presente nos vetores de transformação pTT629, pTT630, pTT632 e pTT630

Os fragmentos de 2,2 Kb das amostras transplastômicas (*rbc*L-F2::*aad*A-R2) e o fragmento de 1,1 Kb da amostra controle (*rbc*L-F::*rbc*L-R) da planta controle foram clivados com as enzimas de restrição *Acc*I e *Nde*I separadamente para identificar as plantas que apresentaram a Sequência dos genes *rbc*L sintéticos (vinda dos vetores pTT629, pTT630, pTT632 e pTT633) (Figura 3).

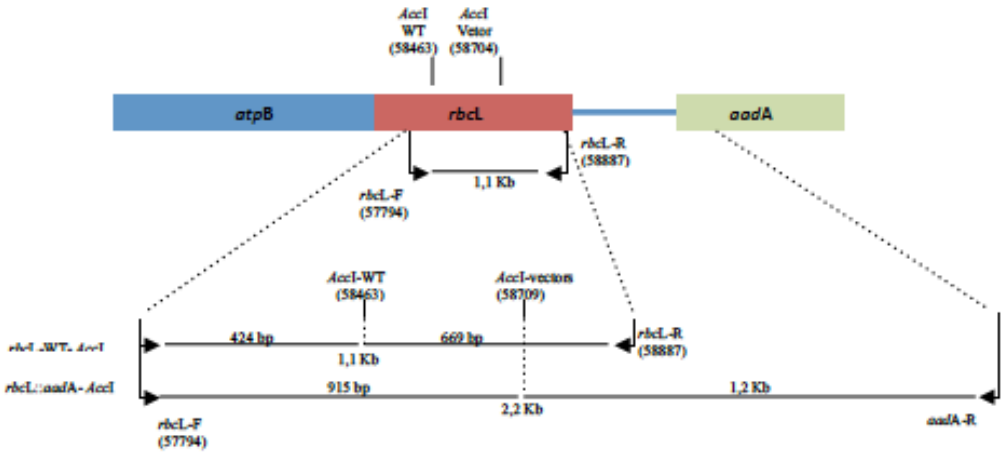


Figura 3 - Amplificação por PCR dos segmentos *rbc*L::*aad*A em plantas transgênicas e *rbc*L-F::*rbc*L-R em plantas transgênicas e controle com os tamanhos de fragmentos referentes às clivagens pela enzima de restrição *Acc*I

Outro experimento mais abrangente foi realizado para confirmar a substituição do gene *rbc*L nativo pelos genes *rbc*L sintéticos com a mutação (A378V) e sem a mutação. Fez-se a amplificação do fragmento *atp*B::*rbc*L::*aad*A::*acc*D de 3,4 Kb das plantas transplastô micas (Figura 4A) e de 2,4 Kb da planta controle (*atp*B::*acc*D) (Figura. 4B). Estes fragmentos foram purificados com o kit QIAEX II Gel *Extraction Kit* (Quiagen) e clivados pelas enzimas de restrição *Acc*I, *EcoR*I, *NdeI*, *Nsi*I (Figura 4), em reações independentes que ermitiram obter os fragmentos de DNA, cujos tamanhos esperados atestam a presença dos sítios de restrição inseridos ao longo da sequência dos vetores.

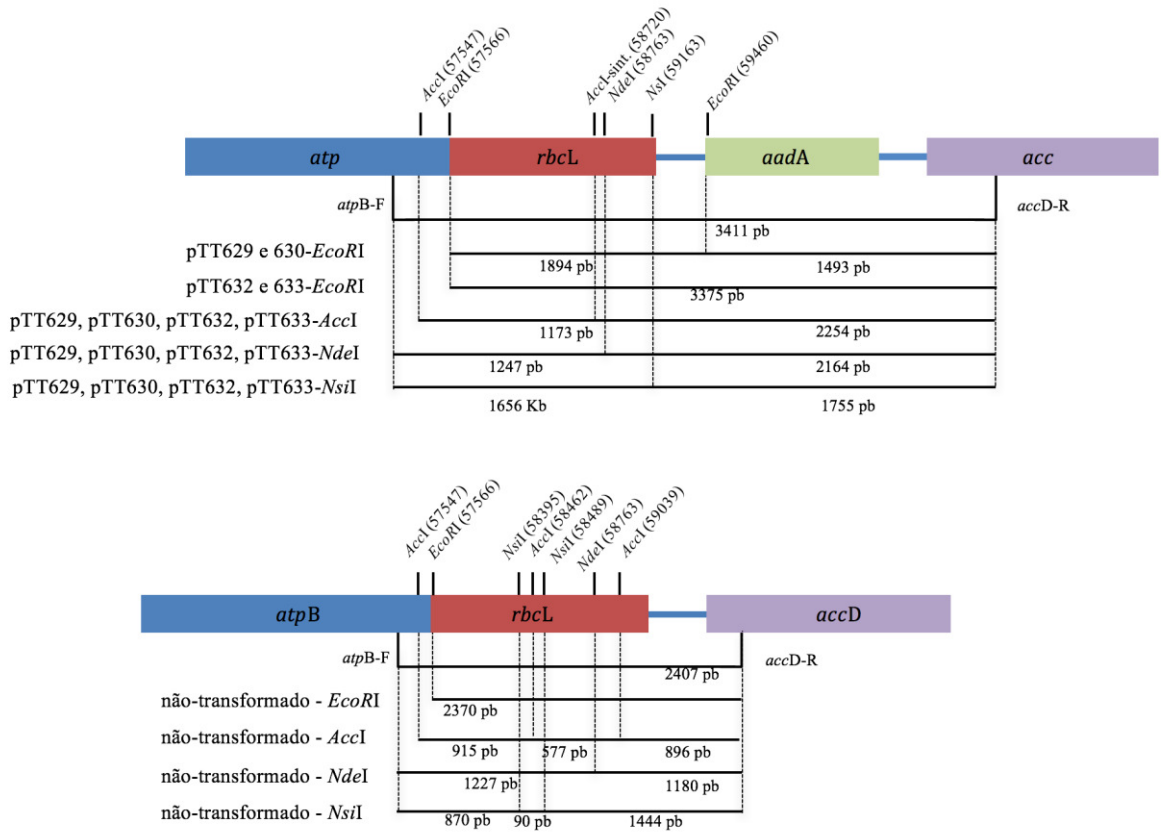


Figura 4 - Esquema da amplificação por PCR do (A) fragmento de 3,4 Kb *atp*B::*rbc*L::*aad*A::*acc*D (A) que possui o gene *rbc*L-sintético com a presença dos sítios de restrição *Eco*RI, *Acc*I, *Stu*I e *Nco*I e do (B) fragmento de 2,4 Kb *atp*B::*rbc*L::*acc*D com o gene *rbc*L-nativo de tabaco (não-transformado) que possui os sítios de restrição homólogos *Acc*I, *Eco*RI e *Nde*I usados na clivagem com as enzimas de restrição correspondentes nas linhagens transplastômicas

3.7 Sequenciamento do gene *rbc*L em plantas Transplastômicas

O sucesso da transformação genética de cloroplastos é devido ao eficiente processo de recombinação homóloga entre o genoma cloroplastidial e o vetor de transformação que possui uma região homóloga flanqueando o local onde a recombinação deve ocorrer. Neste trabalho foi essencial garantir a substituição do gene, gene *rbc*L nativo pelo *rbc*L sintético e assim introduzir a substituição do códon GCT (Alanina) para o códon GTT (Valina) na posição 378 nas plantas transformadas com os vetores pTT630 e pTT633 como também manter o códon GCT nas plantas transformadas com os vetores pTT629 e pTT632 correspondente ao gene *rbc*L original (controle). Apesar de ter sido identificado plantas com a presença do gene *rbc*L oriundo dos vetores de transformação pela amplificação e clivagem com enzimas de restrição específicas, ainda não foi possível confirmar se o códon da mutação foi também incluído no

processo da recombinação homóloga sem ter sido realizado o sequenciamento do gene *rbc*L compreendendo o códon da mutação (A378V).

Para o sequenciamento do DNA das plantas transplastômicas e de plantas controle foi amplificado por PCR um fragmento compreendendo a sequência *atp*B::*rbc*L::*aad*A::*acc*D de 3,4 Kb amplificado com os oligonucleotídeos *atp*B-F1 e *acc*D-R1 (Tabela 2) das plantas transplastômicas 2, 3, 6, 7, 15, 16, 22, 23, 26, 28, e 29 e do fragmento de 2,4 kb plantas controle (não transgênicas). Os fragmentos foram identificados por eletroforese em gel de agarose 2%, purificados com o QIAEX II Gel *Extraction Kit*, segundo recomendações do fabricante. Em seguida fez-se o sequenciamento com os oligonucleotídeos direto *rbc*L-F e reverso *rbc*L-R (Tabela 2) usando o kit ABI *DYEnamic ET da GE*®, em um sequenciador 3100 *Genetic Analyzer da Applied Biosystems/Hitachi*.

Os vetores de transformação pTT629, pTT630, pTT632 e pTT633 foram sequenciados usando-se os oligonucleotídeos *rbc*L-F1 e *rbc*L-R (Tabela 3) e alinhados com a sequência do gene *rbc*L nativo de tabaco (SHINOZAKI et al., 1986) pelo programa Clustal Omega (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) (Tabela 2).

3.8 Cultivo das linhagens transplastômicas em casa de vegetação

Plantas de tabaco controle (não transgênicas) e das linhagens transplastômicas dos ciclos de regeneração T_2, ainda em estado de heteroplasmia e T_5 cultivadas *in vitro*, ao atingirem aproximados 10 cm de altura foram transferidas para vasos de 10 L, aclimatizadas e cultivadas em casa de vegetação com fotoperíodo ambiente, temperatura ambiente entre 25 a 28 ^{o}C e irrigação automática. Após 8 a 10 semanas as plantas iniciaram o florescimento. As flores foram cobertas com saco de papel 30 x 20 cm para garantir a autopolinização. Quando a cápsula que protege as sementes estava marrom, com a sépala verde-marrom foi feita a colheita e as sementes foram armazenadas.

3.9 Análise de homoplasmia pelo teste de germinação de sementes

As sementes das plantas controle foram germinadas em placas e Petri contendo meio RM adicionado de espectinomicina (500 mg/L) e em meio RM sem agente de seleção. As

sementes provenientes das plantas transplastômicas (Tabela 6) foram germinadas em placas de Petri contendo meio RM adicionado de espectinomicina (500 mg/L). O experimento está demonstrado na Figura 5.

Tabela 6 - Planta Controle não transgênica e linhagens de plantas transplastômicas usadas para produção de sementes para teste de homoplasmia

Controle	1, 2
pTT629 não-mutante	2, 7
pTT630 *rbc*L-mutante	3, 6
pTT632 não-mutante	15, 22, 23
pTT633 *rbc*L-mutante	16, 26, 28, 29

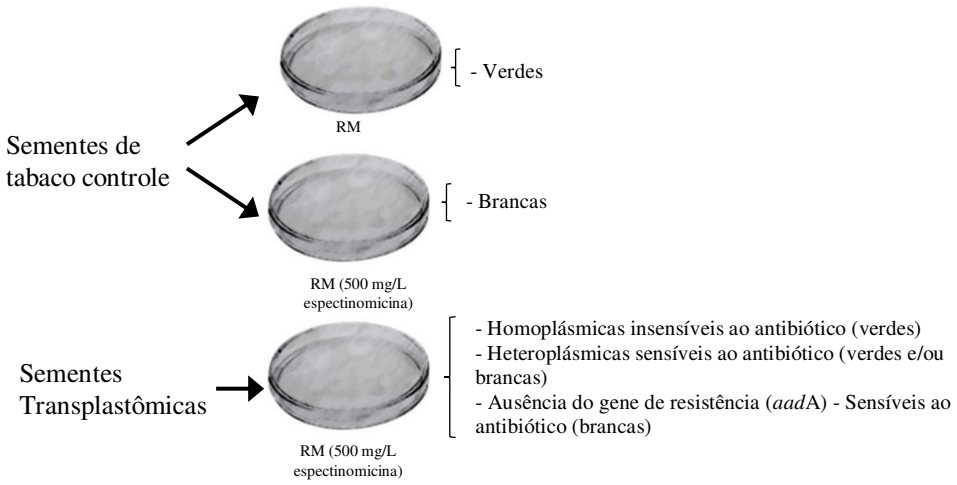


Figura 5 - Esquema do experimento de teste de homoplasmia por germinação de sementes. Sementes de tabaco-controle foram inoculadas em placas de Petri com meio de cultura RM sem antibiótico e com antibió tico espectinomicina (500 mg/L) e sementes das linhagens transplastômicas *rbc*L foram germinadas em meio de cultura RM com antibiótico espectinomicina (500 mg/L)

3.10 Análises fisiológicas da taxa fotossintética, condutância estomática e transpiração das plantas transplastômicas

As análises da taxa fotossintética, fotorrespiração, condutância estomática e transpiraç ão foram realizadas utilizando o equipamento *LC Pro-SD* (analisador de gás infravermelho) (PETERSON, 1987; 1983; MARENCO et al., 2001; CARMO-SILVA; SALVUCCI, 2012). A mensuração das trocas de CO_2 e vapor de água foram realizadas na quarta folha visível de aproximadamente 15 cm, totalmente expandida, a partir do meristema apical em plantas de tabaco transplastômicas e controle das gerações T_2 e T_5 (Tabela 7) aclimatadas em casa de

vegetação por 8 semanas sendo dois experimentos independentes em períodos distintos. As medidas foram obtidas pelo em um sistema aberto pela curva de luz, mensuradas a uma temperatura de 27-42°C que tiveram medidas as concentrações de CO_2 ambiente gerado pela planta e pela curva de luz.

Tabela 7 - Linhagens *rbc*L geradas sob ação do agente seletivo espectinomicina que foram usadas para análise da taxa de fotossíntese, condutância estomática e transpiração

Vetores	Planta com transgene *rbc*L		*rbc*L (controle)
	Geração T_2	Geração T_5	
Não-transformada	-		Controle (sem a mutação A378V)
pTT629-*rbc*L-não-mutante	-	1 e 7	1
pTT630-*rbc*L-mutante	-	1, 3, 4 e 6	4
pTT632-rbcL-não-mutante	14, 15, 20, 22, 23	15, 20, 22, 24	20
pTT633-*rbc*L	16, 19, 26, 28, 29	16, 26, 28, 29	24

O experimento 1 foi feito com 10 das linhagens de geração T_2, enquanto no experiemento 2 foi usado um total de 14 linhagens da geração T_5. Nas linhagens da geração T_2 e T_5 e na planta de tabaco-controle, de cada experimento (Tabela 7).

Em folhas totalmente expandidas foram medidas a taxa de Fotossíntese (A), de condutância estomática (gs), de transpiração (E) que foram comparadas entre as linhagens transplastômicas e a planta de tabaco controle não-transformada. A taxa de resposta DFFFA foi de até 1.200 μmol m^{-2} s^{-1}, em intervalos de aproximadamente 200 μmol m^{-2} s^{-1} (FARQUHAR; SHARKEY, 1982).

3.11 Análise estatística

O delineamento experimental foi feito com 11 plantas transplastômicas independentes do primeiro experimento e 15 do segundo experimento, sendo cada evento com três repetições biológicas. Foi feita 3 parcelas, sendo 1 parcela de cada evento versus parcela das repetições, para o experimento 1 disposição 11 (eventos) x 3 (repetição biológica) e para o experimento 2 com disposição 15 (evento) x 3 (repetição biológica). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey $P<0,05$ de probabilidade, pelo programa ASSISTAT® 9.5 (SILVA; AZEVEDO, 2009).

4 RESULTADOS

4.1 Transformação Genética de Cloroplastos de Tabaco

Transformação genética de cloroplastos de folhas de tabaco foi realizada por biolística utilizando os vetores pTT629, pTT630, pTT632 e pTT633, sendo dois deles (pTT630 e pTT633) construídos para introduzir a alteração de um aminoácido (A375V) no gene *rbc*L que codifica a enzima rubisco, responsável pela fixação do CO_2 em plantas no processo da fotossíntese e outros dois (pTT629 e pTT632) somente com a sequência original do gene *rbc*L. Dos 6 experimentos por biolística com cada um dos vetores pTT629 e pTT630 e dos 4 experimentos com os vetores pTT632 e pTT633 resultaram 35 plantas.

Nos experimentos de transformação com o vetor pTT629, obteve-se 03 plantas; com o vetor pTT630, 16 plantas; com o vetor pTT632, 7 plantas; e com o vetor pTT633, 9 plantas numeradas conforme apresentado na Tabela 8. Até a geração T_4, todas as plantas geradas passaram pela regeneração em meio RMOP sob seleção dos agentes seletivos espectinomicina (500 mg/L) e estreptomicina (500 mg/L) (Figura 6) com o objetivo de identificar possíveis mutantes espontâneos pela mutação no gene *16S* rDNA (SVAB e MALIGA, 1990; 1991) que confere resistência ao antibiótico espectinomicina (500 mg/L). Desde que todas as 35 plantas foram possíveis de regenerar novas plantas no meio seletivo com os dois antibióticos, nenhuma planta foi identificada como mutante, o que foi confirmado em seguida pela análise de PCR indicando a presença do gene *aad*A nas plantas transgênicas.

Tabela 8 - Plantas transplastômicas de tabaco resistentes aos agentes seletivos espectinomicina (500 mg/L) e estreptomicina (500 mg/L) geradas pela transformação genética com os vetores pTT629, pTT630, pTT632 e pTT633

ptDNA	Total	Linhagens transplastômicas
*rbc*L não-mutante (pTT629)	3	1, 2 e 7
*rbc*L mutante (pTT630)	16	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18
*rbc*L não-mutante (pTT632)	7	14, 15, 20, 21, 22, 23 e 24
*rbc*L mutante (pTT633)	9	16, 19, 25, 26, 27, 28, 29, 31 e 32
Total	35	

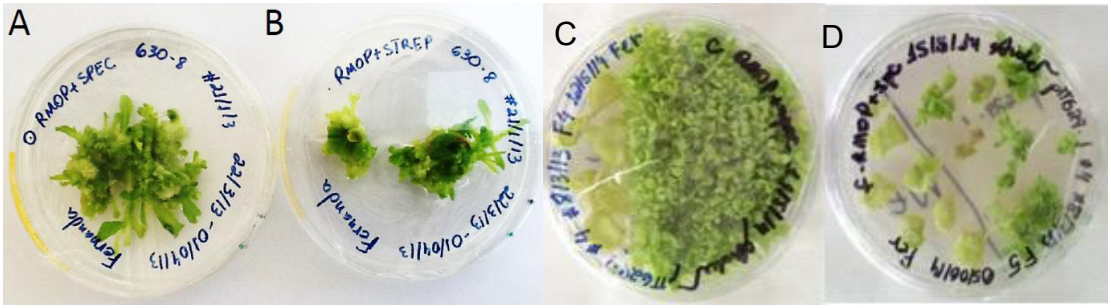


Figura 6 - Representação da regeneração de plantas de tabaco em meio RMOP com os agentes seletivos espectinomicina (A) e estreptomicina (B) de plantas de tabaco transformadas com o vetor pTT630 que contem o gene *rbc*L-mutante. (C e D) regeneração da linhagem 1 transformada com o vetor pTT629 em meio RMOP com 500 mg/L de espectinomicina

4.2 Identificação do gene marcador seletivo *aad*A

Plantas da geração T_0 em meio seletivo foram analisadas por PCR com os oligonucleotídeos *aad*A-F e *aad*A-R (Tabela 2) e confirmaram a amplificação do fragmento de 650 pb (Figura 7) correspondente ao gene marcador seletivo *aad*A conforme o mapa dos vetores de transformação (Figura 2).

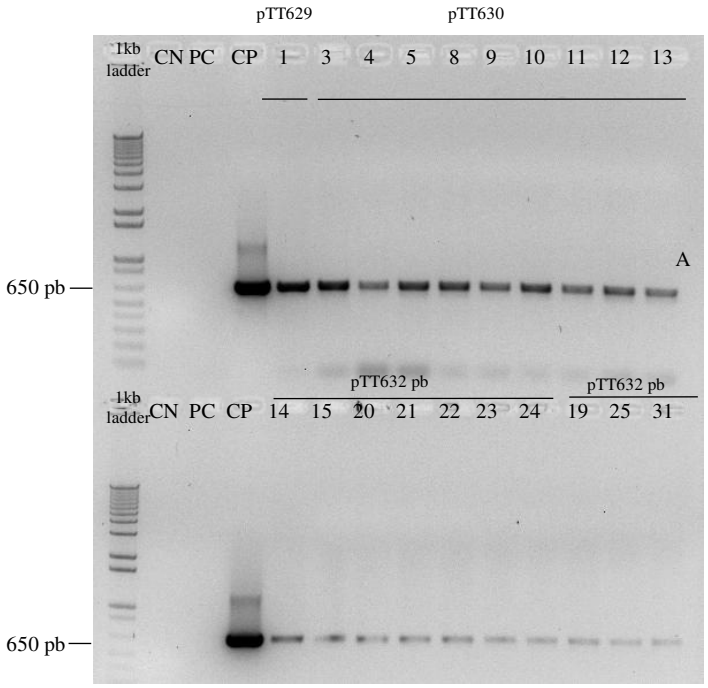


Figura 7 - Gel agarose 1% da amplificação do fragmento de 650 pb do transgene *aad*A. CN: Controle negativo definido como amostra sem DNA; PC: DNA de planta controle não transformada; CP: controle positivo pTT629; amostra pTT629: 1 e amostras pTT630: 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13; (B) CP: controle positivo pTT632; amostras pTT632: 14, 15, 20, 21, 22, 23, 24 e amostras pTT633: 19, 25 e 31.

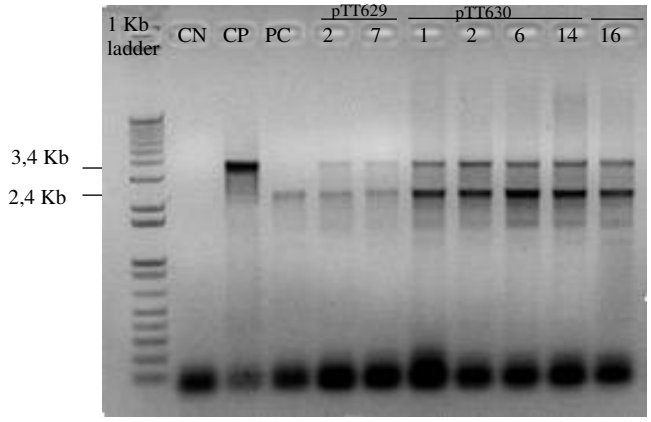
4.3 Análise de homoplasmia das plantas Transgênicas por PCR

Após a confirmação da integração do gene marcador seletivo *aad*A no genoma do cloroplasto das plantas de tabaco foi verificado se a integração do transgene ocorreu na região esperada entre os genes *atp*B e *acc*D no genoma cloroplastidial. O DNA de plantas da geração

B

T_2 (Figura 8) das linhagens pTT629: 2 e 7, das linhagens pTT630: 3 e 6, das linhagens pTT632: 15, 22, e 23 e das linhagens pTT633: 16, 26, 28 e 29, foram utilizadas para a amplificação da sequência *atp*B::*rbc*L::*aad*A::*acc*D com os oligonucleotídeos *atp*B-F1 e *acc*D-R1 (figura 2) demonstrando o fragmento esperado de 3,4 Kb. Contudo, também foi observado o fragmento de 2,4 kb referente a região do genoma cloroplastidial não transformado (Figura 9). Este resultado demonstrou que as plantas estão em estágio heteroplá smico, isto é, quando ocorre a presença de cópias do genomas transformados e cópias não transformadas. Para obtenção de plantas homoplásmicas, novas gerações de subcultivo em meio seletivo (com espectinomicina 500 mg/L) foram realizadas.

Figura 8 - Linhagens transplastômicas heteroplásmicas da geração T_2 de tabaco transformado cultivadas em meio RM seletivo em sala de cultura



.

Figura 9 - Gel agarose 1% da amplificação com os primers *rbc*L-F e *acc*D-R2 de plantas de tabaco transplastô micas e controle. Os fragmentos de 3,4 Kb (*rbc*L::*aad*A::*acc*D), referem-se às plantas contendo o transgene *rbc*L-sintético e os fragmentos de 2,4 Kb (*rbc*L::*acc*D), referem-se ao segmento presente na planta de tabaco controle. Linhas: CN é o controle negativo sem DNA; CP: Controle positivo com DNA de pTT632; PC: DNA da planta de tabaco controle não-transformada; pTT629: amostras 2 e 7 sem a mutação no transgene *rbc*L; pTT630: amostras 1, 2, 6 e 14 com a mutação no transgene *rbc*L; pTT633: amostra 16 com a mutação no transgene *rbc*L

A análise molecular da presença do gene *rbc*L nas plantas transgênicas foi confirmada pela amplificação do fragmento de 2,7 Kb da sequência *atp*B::*aad*A (Figura 10), com os oligonucleotídeos direto *rbc*L-F1 e reverso *acc*D-R2 (Tabela 3). Este resultado confirma a integração do gene *rbc*L juntamente com o cassete de expressão do gene marcador seletivo *aad*A no genoma do cloroplasto de tabaco conforme mostrado na figura 2.

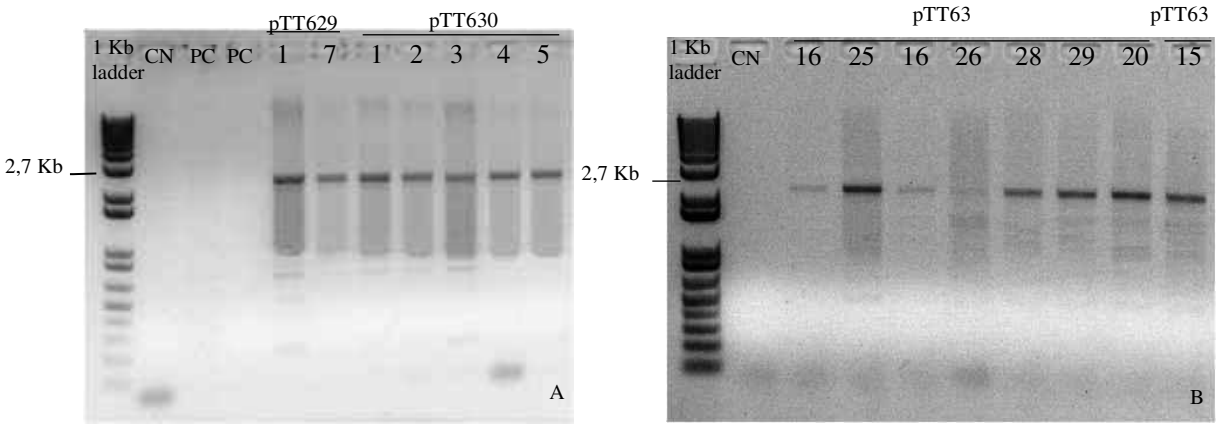


Figura 10 - Fragmento amplificado de 2,7 Kb *atp*B::*aad*A em gel de agarose 1%. **A**: (1k) 1Kb ladder plus; CN: CN: controle negativo sem DNA; PC: DNA da planta de tabaco controle não-transformada; pTT629: amostras 1 e 7 sem a mutação no transgene *rbc*L; pTT630: amostras 1, 2, 3, 4 e 5 com a mutação no transgene *rbc*L; pTT632: 15 sem a mutação no transgene *rbc*L; pTT633: amostras 16 (controle), 25, 16, 26, 28, 29, 20 com a mutação no transgene *rbc*L

4.4 Substituição do gene *rbc*L no genoma do cloroplasto

O DNA isolado de 11 plantas da geração T_5 (Figura 8) das linhagens pTT629: 2 e 7, das linhagens pTT630: 3 e 6, das linhagens pTT632: 15, 22, e 23 e das linhagens pTT633: 16, 26, 28 e 29 foram utilizadas para a amplificação da sequência *atp*B::*rbc*L::*aad*A::*acc*D, usando-se oligonucleotídeos *atp*B-F1 e *acc*D-R1 (tabela 3) desenhados para se parearem à sequência *atp*B::*acc*D correspondente nas plantas. Obteve-se o fragmento esperado de 3,4 Kb, contendo o cassete do gene *aad*A nas plantas transgênicas enquanto que nas plantas controle não transformadas obteve-se o fragmento de 2,4 Kb (Figura 2) confirmando o esperado pela inserção dos transgenes dos vetores nas plantas (Figura. 11).

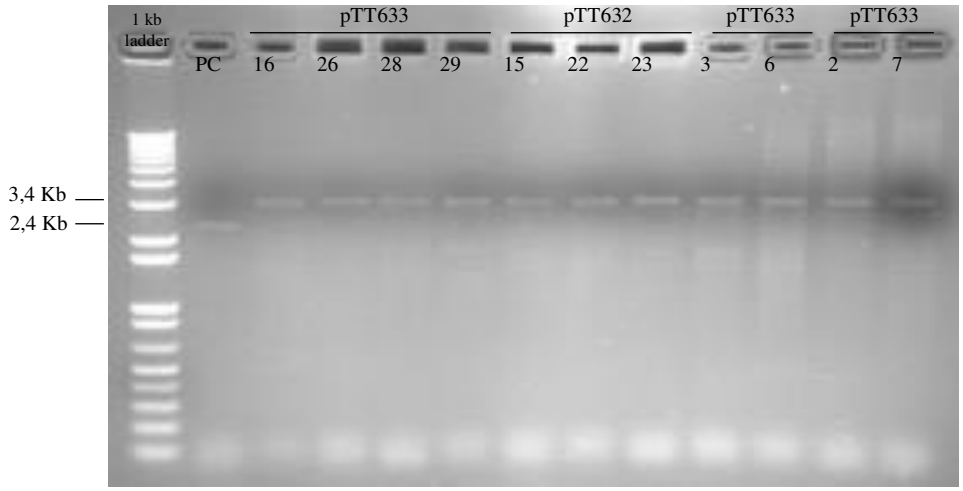


Figura 11 - Gel agarose 1% da amplificação do fragmentos de 3,4 Kb do transgene *atp*B::*rbc*L::*aad*A::*acc*D integrado a sequências do genoma cloroplastidial de tabaco. O fragmento de 2,4 Kb refere-se ao segmento *atp*B::*rbc*L::*acc*D nativo no genoma do cloroplasto do tabaco controle não-transformado e o fragmento de 3,4 kb refere-se ao inserção do fragmento *atp*B::*rbc*L::*aad*A::*acc*D. PC: Planta Controle não-transgênica; linhagens com inserção do transgene *rbc*L mutante PTT633-16, 26, 28 e 29 e pTT630- 3 e 6; linhagens com transgene *rbc*L não-mutante pTT632-15, 22 e 23 e pTT629-2 e 7

4.5 Análise da presença do sítio de restrição *Acc*I nas linhagens transplastômicas

Os vetores construídos pTT629 e pTT632 com o gene *rbc*L-não-mutante e pTT630 e pTT633 com o gene *rbc*L-mutante (A378V) foram desenhados para substituir o gene *rbc*L nativo, presente no genoma de cloroplastos de tabaco. Considerando o eficiente processo de recombinação homóloga entre as cópias do genoma poliploide de cloroplastos (MALIGA; BOCK 2004; BOCK 2001) foi realizado várias digestões com endonucleases específicas presente nos vetores para confirmar se as linhagens transplastômicas obtidas apresentavam o gene *rbc*L-não-mutante e mutante substituindo o gene *rbc*L original.

Na sequência do gene sintético *rbc*L (dos vetores) foi inserido um sítio de restrição *Acc*I com 17 pb à esquerda do códon A378V. Ainda neste gene, tanto nos vetores como na sequência original existe um outro sítio de reconhecimento da sequencia *Acc*I a 241 pb "upstream" do sítio inserido e outro 577 pb “downstream” somente nos vetores (figura 4).
Após obter a amplificados do fragmento *rbc*L::*aad*A de 2,2 kb (figura 3) e a digestão com a endonucleases *Acc*1 (figura 4) foi visualizado no gel de agarose os fragmentos de 915 pb e 1,2

kb (figura 12). Estes fragmentos foram confirmados nas linhagens pTT633-16, 26, 28 e 29; pTT632-15, 22 e 23; pTT630- 3 e 6; vetor pTT629- 2 e 7 (Figura 12, A, B, C e D).

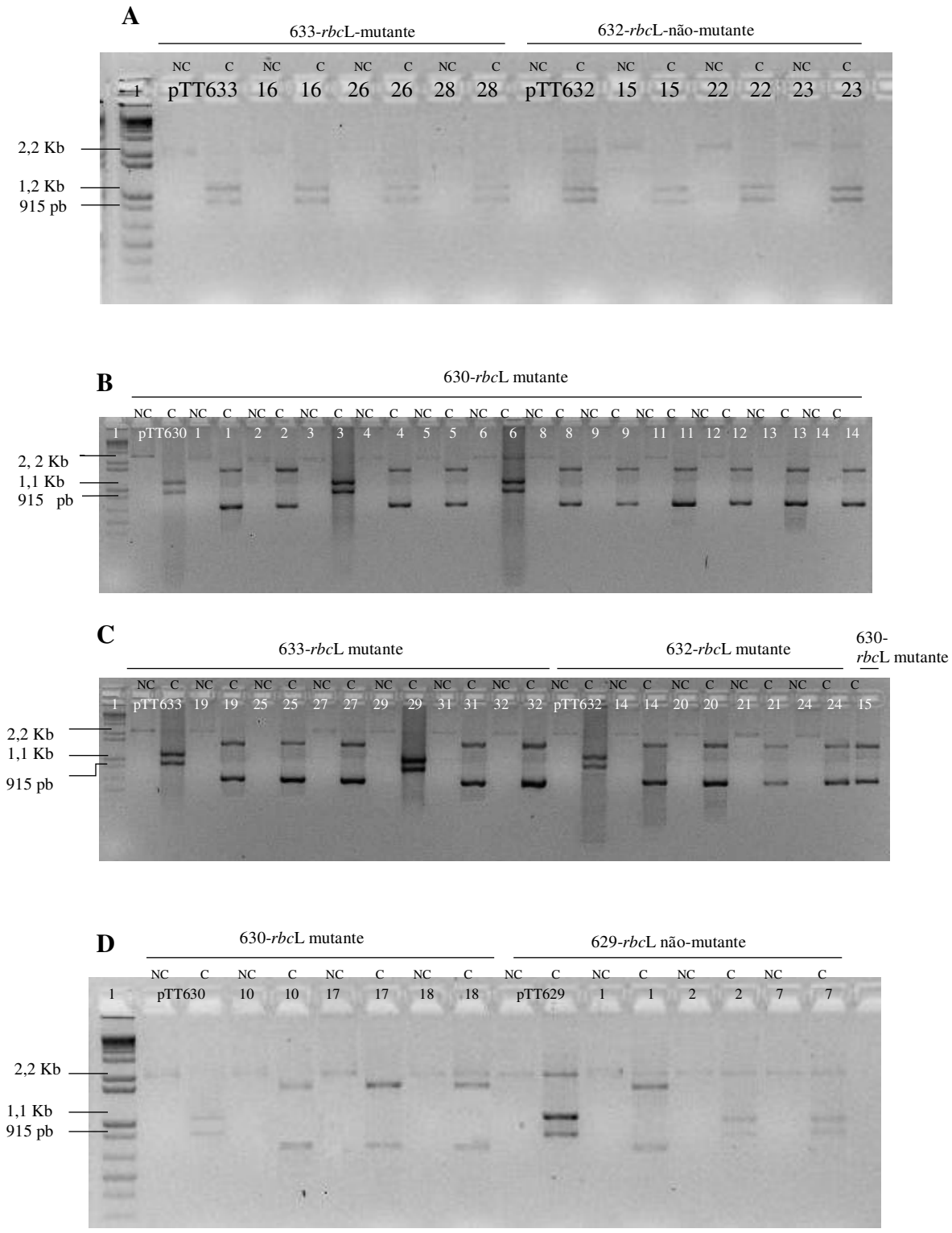


Figura 12 - Gel agarose 2% resultado da clivagem com a enzima de restrição *Acc*I do fragmento de 2,2 Kb da sequência *rbc*L::*aad*A obtido pela amplificação de DNA total das linhagens de plantas obtidas pela transformação com os vetores pTT629, pTT630, pTT632 e pTT633. **A:** (1) 1 Kb ladder plus; Controle positivo: vetor pTT633 e linhagens 16, 26 e 28; Controle positivo: vetor pTT632 e linhagens 15, 22 e 23; **B:** 1 Kb ladder plus; Controle positivo: vetor pTT630 e linhagens 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 13 e 14; **C:** 1 Kb ladder plus; Controle positivo: vetor pTT633 e linhagens 19, 25, 27, 29, 31 e 32; Controle positivo: vetor pTT632 e linhagens 14, 20, 21 e 24; Controle positivo: vetor pTT630 e linhagem 15; **D:** 1 Kb ladder plus; Controle positivo: pTT630 e linhagens 10, 17 e 18; Controle positivo: pTT629 e linhagens 1, 2 e 7; NC: não clivado; C: clivado

Para atestar que a clivagem das linhagens transplastômicas que carrega os transgenes *rbc*L-mutante e não-mutante provenientes dos vetores sintéticos difere do gene *rbc*L nativo de plantas de tabaco não transgênicas, a amplificação com os oligonucleotídeos *rbc*L-F e *rbc*L-R (Tabela 3) produziu um fragmento de 1,1 Kb (figura 3). A digestão com a enzima *acc*1 a gerou os fragmentos de 429 pb e 629 pb como esperado (Figura 13).

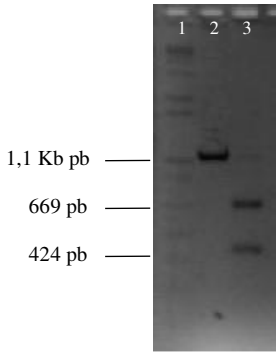


Figura 13 - Gel agarose 2% do fragmento de 1,1 Kb pb amplificado do DNA de uma planta de Tabaco-controle (não-transgênica) que produziu os fragmentos de 424 pb e 669 pb . Linha 1: 1 kb Ladder Plus; linha 2: fragmento de amplificação por PCR de 1,1 Kb do gene *rbc*L; Linha 3: Fragmento de DNA clivado com enzima de restrição *Acc*I

Os fragmentos esperados de 1,1 Kb e 915 pb da sequência *rbc*L::*aad*A das linhagens *rbc*L transplastômicas, diferem em tamanho dos fragmentos de 669 pb e 445 pb produzidos pela clivagem com a mesma enzima de restrição *Acc*I. Este resultado demonstra que ocorreu distintos locais de recombinação homóloga no gene rbcL, que levou a testar a presença dos outros sítios de clonagem presente nos vetores e DNA cloroplastidial de tabaco. Os outros sí tios de restrição utilizados foram o *Nde*I, *EcoR*I e *Nsi*I.

4.6 Análise da presença do sítio de restrição *Nde*I nas linhagens transplastômicas

O DNA dos vetores construídos pTT629, pTT630, pTT632 e pTT630 o DNA total da planta de tabaco-controle foram usados como referência na clivagem do sítio de restrição *Nde*I à direita do mutação A378V. A amplificação do fragmento de 2,2 Kb da sequência *rbc*L::*aad*A do pDNA dos controles e das linhagens transplastômicas foram purificadas e digeridas individualmente com a enzima de restrição *Nde*I. Como esperado obteve-se um fragmento de 1,1 Kb e outro de 962 pb nas plantas transplastômicas de acordo com os vetores utilizados, confirmando a presença do sítio de restrição *Nde*I no gene *rbc*L (Figura 14).

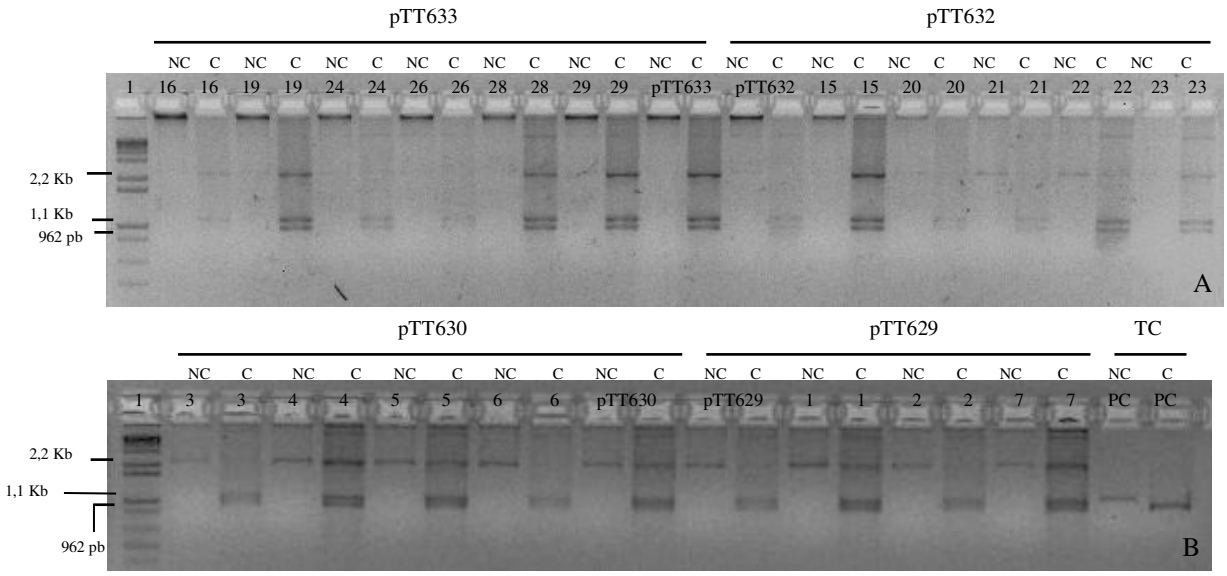


Figura 14 - Gel agarose 2% da clivagem com a enzima de restrição *Nde*I do fragmento de 2,2 Kb da sequência *rbc*L::*aad*A. **A:** (1) 1 Kb ladder plus; linhagens 16, 19, 24, 26, 28, 29 e Controles positivos: vetor pTT633; pTT632 e linhagens 15, 20, 21, 22, 23; **B:** (1) 1 Kb ladder plus; e linhagens 3, 4, 5, 6 e Controles positivos: pTT630 e pTT629 e linhagens1, 2 e 7; NC: não-digerido; C: digerido

4.7 Clivagem de sítios de restrição inseridos na sequência *atp*B::*rbc*L::*aad*A::*acc*D

Após a confirmação da inserção do gene *rbc*L-sintético pela presença dos sítios *Acc*1 e *Nde*I foi feita a amplificação da sequência *atp*B::*acc*D (tabela 2, figura 2) utilizando DNA dos vetores, DNA de uma planta controle não transformadas e DNA das folhas de tabaco das linhagens transplastômicas pTT633-16, 26, 28 e 29; pTT632-15, 22 e 23; pTT629-2 e 7 e pTT630-3 e 6. A amplificação do fragmento de 3,4 kb e os resultados das clivagem dos sítios de restrição *EcoR*I, *AccI,*, *Nde*I e *Nsi*I foram confirmadas conforme apresentado nas Figuras 15, 16, 17 e 18, respectivamente. Os tamanhos dos fragmentos esperados estão descritos na Figura 4 e Tabela 9.

Tabela 9 - Tamanho esperado de fragmentos pela clivagem com enzimas de restrição do fragmento de 3,4 Kb amplificado da sequência *atp*B::*rbc*L::*aad*A::*acc*D das linhagens transplastômicas e do fragmento de 2,2 Kb amplificado da sequência *atp*B::*rbc*L::*acc*D da amostra de DNA controle de tabaco não transformado (Controle)

Alvo	Enzima	Fragmentos (pb)
*atp*B::*rbc*L-sint::*aad*A::*acc*D pTT629 e pTT632	*Eco*RI	1894 + 1493
*atp*B::*rbc*L-sint::*aad*A::*acc*D pTT629 e pTT632		3375
*atp*B::*rbc*L::*acc*D (controle)		2370
*atp*B::*rbc*L-sint::*aad*A::*acc*D pTT629, pTT630, pTT632 e pTT633	*Acc*I	2254 + 1173
*atp*B::*rbc*L-nt::*acc*D (Controle)		915 + 896 + 577
*atp*B::*rbc*L-sint::*aad*A::*acc*D pTT629, pTT630, pTT632 e pTT633	*Nde*I	2164 + 1247
*atp*B::*rbc*L::*acc*D (controle)		1227 + 1180
*atp*B::*rbc*L-sint::*aad*A::*acc*D pTT629, pTT630, pTT632 e pTT633	*Nsi*l	1755 + 1656
*atp*B::*rbc*L-nt::*acc*D (Controle)		1444 +870 + 93

O sítio de restrição *EcoR*I está presente no gene *rbc*L (Figura 4) à esquerda do códon (A378V) e na região 5' do gene *aad*A dos vetores pTT629 e pTT630 utilizados. Tanto nestes vetores e nas plantas transplastômicas com estes genes a clivagem gerou os fragmentos de 1,8 Kb e 1,4 Kb nas amostras 2 e 7 (pTT629) e nas linhagens 3 e 6 (pTT630) (Tabela 9). Nas amostras 16, 26, 28, 29 (pTT633); 15, 22 e 23 (pTT632) a clivagem do sítio de restrição *EcoR*I que está somente à esquerda do códon A378V gerou os fragmentos de aproximadamente 3,3 Kb, enquanto que as plantas não transgênicas apresentam um fragmento de 2,3kb (Figura 15).

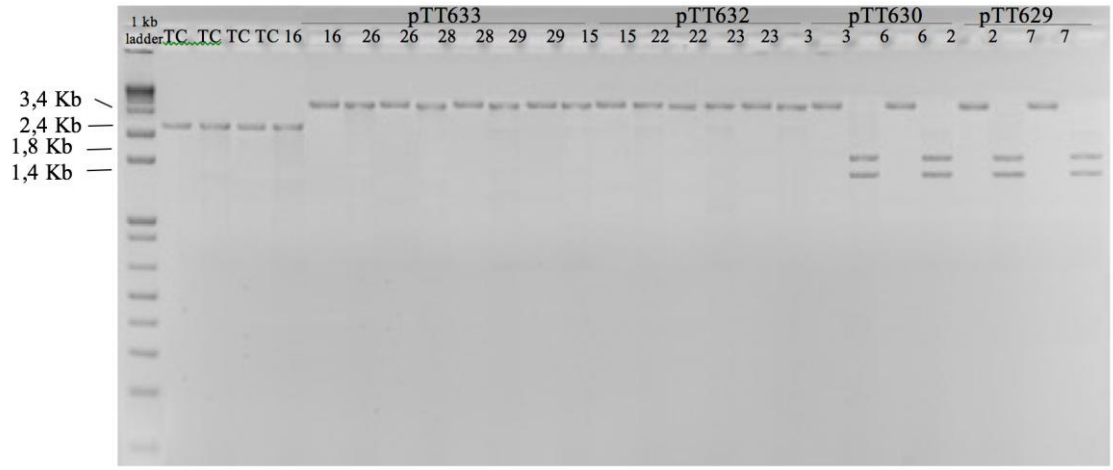


Figura 15 - Clivagem com enzimas de restrição *Eco*RI do fragmentos de 3,4 Kb amplificado da sequência *atp*B::*rbc*L::*aad*A::*acc*D com a sequência *rbc*L-sintética das linhagens 2, 3, 6, 7, 16, 22, 23, 26, 28 e 29 e de 2,4 Kb *atp*B::*rbc*L::*acc*D da planta tabaco-controle

O sítio de restrição *Acc*I (Figuras 1 e 3) está à esquerda 17 nucleotídeos da região do codon A378V nos quatro vetores e deve estar presente nas plantas transplastômicas. Também, na região 3' do gene *atp*B existe outro sítio de reconhecimento na sequência do gene interna no fragmento amplificado *atp*B::*rbc*L::*aad*A::*aad*A::*acc*D que deve ser considerado (figura 1, 4). A clivagem do fragmento amplificado das plantas transplastômicas das linhagens pTT633-16, 26, 28 e 2; e pTT632-15, 22 e 23 apresentaram os fragmentos de aproximadamente 1,1 kb e 2,2 kb (Tabela 9) enquanto as plantas controle não transgênicas geraram os fragmentos de 915 pb, 896 pb e 577 pb (tabela 9) conforme demonstrado na Figura 16. Nas plantas controle os fragmentos de 896 pb e 915 pb são muito próximos e aparecem no gel de eletroforese 2% como somente uma banda.

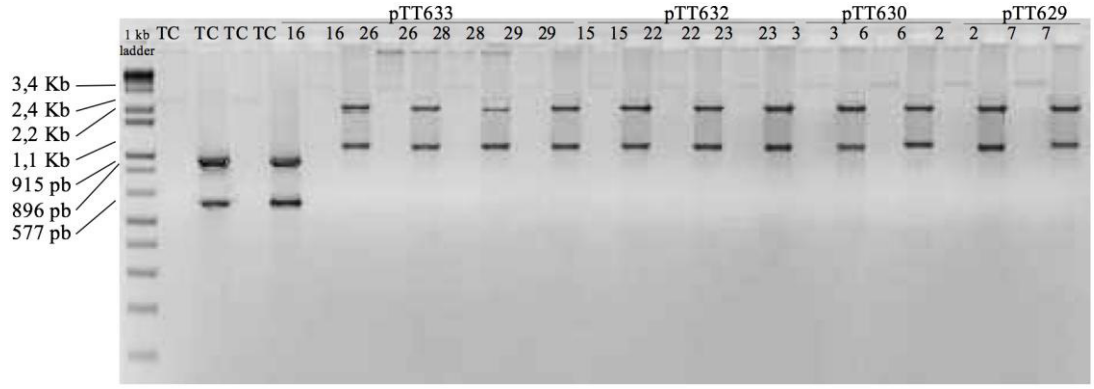


Figura 16 - Clivagem com a enzima de restrição *Acc*I do fragmentos de 3,4 Kb amplificado da sequência *atp*B::*rbc*L::*aad*A::*acc*D das linhagens transplastômicas 2, 3, 6, 7, 16, 22, 23, 26, 28 e 29 e de 2,4 Kb *atp*B::*rbc*L::*acc*D da planta tabaco-controle

O sítio de restrição *Nde*I (Figura 1, 4) está à direita 3' do códon A378V. A clivagem do fragmento *atp*B::*aad*A::*acc*D de 3,4 kb com esta enzima gerou dois fragmentos de aproximadamente 1,2 K e 2,2 kb (tabela 9) em todas as amostras das linhagens transgênicas pTT629-2 e 7; pTT630-3 e 6; pTT632-15, 22 e 23; e pTT633-16, 26, 28 e 29. As plantas controle não transgênicas apresentou os fragmentos de aproximadamente 1,2 Kb, e 1,1 Kb conforme demonstrado na Figura 17. Os fragmentos de 1,1 kb e 1,2 kb não foram separados no gel de agarose 2% e aparecem como uma única banda.

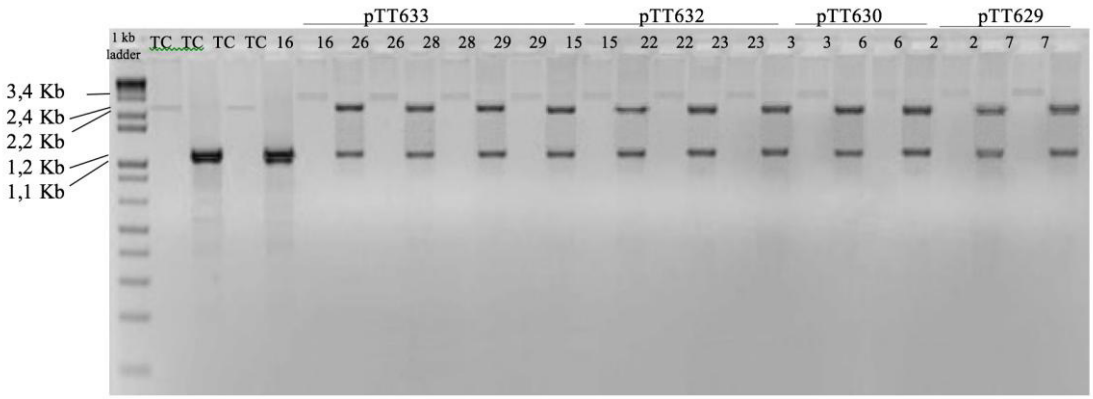


Figura 17 - Clivagem com a enzima de restrição *Nde*I do fragmentos de 3,4 Kb amplificado da sequência *atp*B::*rbc*L::*aad*A::*acc*D em linhagens transplastômicas e 2,4 Kb *atp*B::*rbc*L::*acc*D de plantas controle não transgênicas. 1 kb plus, TC são plantas controle (não transgênicas) amplificadas com as sequencias e as linhagens transplastômicas pTT633, pTT632, pTT630 e pTT629.

Outra enzima considerada referência utilizada para confirmar a integração do vetor de clonagem foi a *Nsi*I. O sítio de restrição está presente na posição terminal 3' do gene *rbc*L (Figuras 1, 4) nos quatro vetores e consequentemente deve estar presente nas plantas transplastômicas. Entretanto, a sequencia original do gene *rbc*L possui dois sítios de restrição que está à direita e esquerda do sítio da *Acc*1. A clivagem do fragmento *atp*B::*acc*D de 3,4 kb amplificadas das plantas transplastômicas de 2,4 kb das plantas controle não transformadas com esta enzima gerou os fragmentos de 1,6 Kb e 1,7 Kb nas amostras das linhagens transplastômicas e de 0,9 e 1,4 kb (tabela 9) nas tabaco-controle conforme confirmado na figura 18.

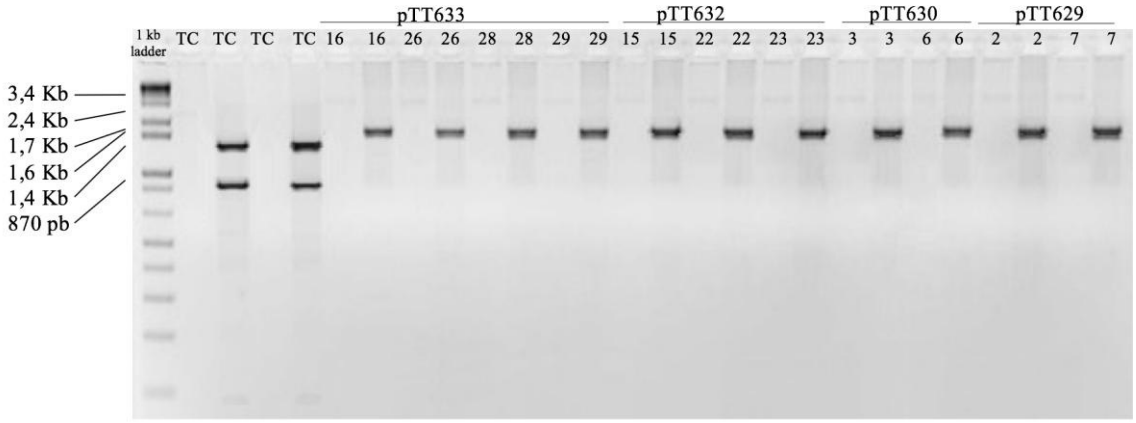


Figura 18 - Clivagem com a enzima de restrição *Nsi*I do fragmentos de 3,4 Kb amplificado da sequência *atp*B::*rbc*L::*aad*A::*acc*D com a sequência *rbc*L-sintética das linhagens 2, 3, 6, 7, 15, 16, 22, 23, 26, 28 e 29 e de 2,4 Kb *atp*B::*rbc*L::*acc*D da planta tabaco-controle

4.8 Alinhamento das linhagens transplastômicas

O sequênciamento do fragmento amplificado *atp*B::*acc*D das plantas transgênicas e controle foi usado como molde para verificar a presença do códon GCT que codifica o aminoá cido alanina e GTT que codifica o aminoácido valina nas plantas transplastômicas. O oligonucleotídeo *atp*B-F foi utilizado no sequenciamento e o alinhamento foi realizado pela ferramenta de bioinformática Clustal Omega (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/). Conforme os resultados apresentado na figura 19, o códon para alanina foi confirmado nas plantas controle não transformada PC1 e PC2, e nas plantas transplastômicas pTT629-2,7; pTT-632-

15, 22 e 23 enquanto o códon da valina foi confirmado nas plantas transplastômicas pTT630-3 e 6 e pTT633-16, 26, 28 e 29.

```
PC1-rbcL-nativo          CTTTACCAGGTGTTCTACCCGTGGCTTCAGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCT
PC2-rbcL-nativo          CTTTACCAGGTGTTCTACCCGTGGCTTCAGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCT
pTT629-2-não-mutante       GTCTACCAGGTGTTCTACCCGTGGCTTCAGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCT
pTT629-7-não-mutante       GTCTACCAGGTGTTCTACCCGTGGCTTCAGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCT
pTT632-15-não-mutante      GTCTACCAGGTGTTCTACCCGTGGCTTCAGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCT
pTT632-22-não-mutante      GTCTACCAGGTGTTCTACCCGTGGCTTCAGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCT
pTT632-23-não-mutante      GTCTACCAGGTGTTCTACCCGTGGCTTCAGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCT
pTT630-3-mutante         GTCTACCAGGTGTTCTACCCGTGGTTTCAGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCT
pTT630-6-mutante         GTCTACCAGGTGTTCTACCCGTGGTTTCAGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCT
pTT633-16-mutante          GTCTACCAGGTGTTCTACCCGTGGTTTCAGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCT
pTT633-26-mutante          GTCTACCAGGTGTTCTACCCGTGGTTTCAGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCT
pTT633-28-mutante          GTCTACCAGGTGTTCTACCCGTGGTTTCAGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCT
pTT633-29-mutante          GTCTACCAGGTGTTCTACCCGTGGTTTCAGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCT
                           * ********************* ******************************
```

Figura 19 - Alinhamento das sequências de 56 pb do fragmento *atp*B::*acc*D de plantas controle não transgênicas e das linhagens transplastômicas 2, 7 (pTT629), 15, 22 e 23 (pTT632), 3 e 6 (pTT630) e 16, 26, 28 e 29 (pTT633). Os sítios de restrição *Acc*1 (GTCTAC) e *Nde*1 (CATATG) estão mostrados sublinhados. O códon GCT para a alanina está em amarelo e o GTT da valina está mostrado em azul

4.9 Germinação de sementes

O experimento de germinação de sementes das linhagens *rbc*L transplastômicas foi realizado para demonstrar a homoplasmia das plantas transplastômicas. Sementes germinadas em meio RM com o agente seletivo espectinomicina (500 mg/L) demonstraram resistência ao antibiótico devido todas as sementes terem germinado plantas verdes uniforme nas placas de Petri, esta resistência ocorre pela presença do transgene *aad*A que codifica o aminoácido acetil aminotransferase que confere resistência ao antibiótico espectinomicina e estreptomicina. Todas as plantas de cada réplica biológica das linhagens transplastômicas pTT-2, 7; pTT-632-15, 22 e 23; pTT630-3 e 6; e pTT633-16, 26, 28 e 29 foram testadas em ré plica e apresentaram fenótipo verde uniforme (Figura 20 A,C,D,E,F,G,H e I) e confirmando que as plantas estavam homoplásmicas. As sementes de plantas de tabaco controle não-transformado apresentaram fenótipo branco (figura 20B) devido à sensibilidade ao agente seletivo espectinomicina (500 mg/L) pela ausência do gene marcador seletivo *aad*A no genoma do cloroplasto.

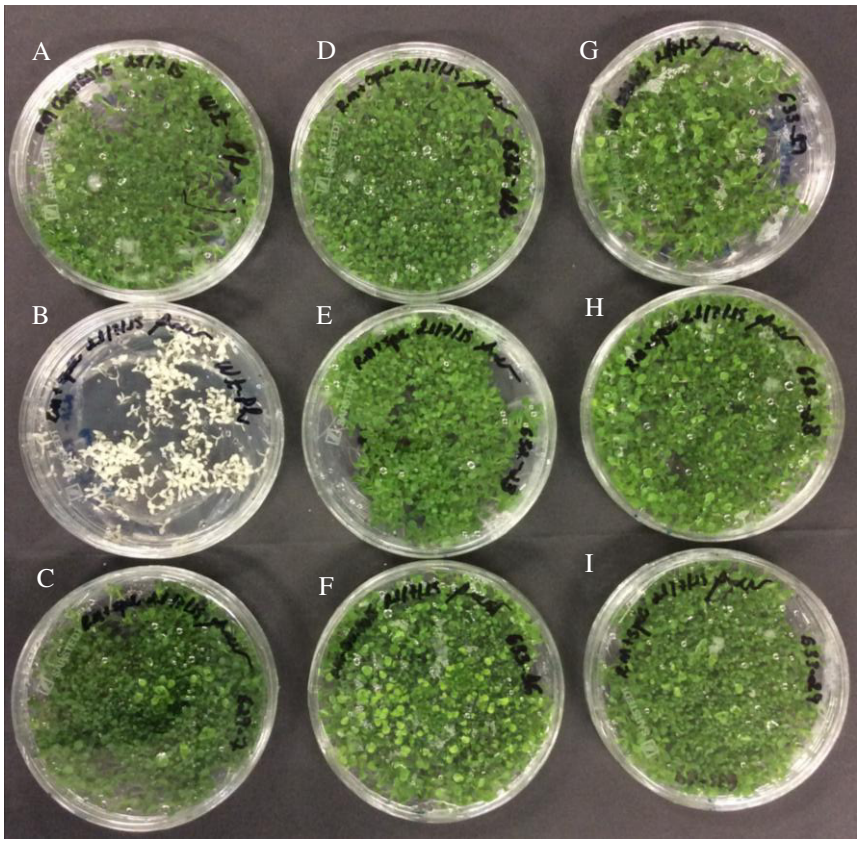


Figura 20 - Representação das linhagens *rbc*L transplastômicas e controle não transgênico germinadas em meio RM com o agente seletivo espectinomicina (500 mg/L). A) sementes de plantas controle não transgênica em meio RM sem agente de seleção; B) sementes de plantas controle não transgênica em meio RM com agente seletivo espectinomicina (500 mg/L); C) pTT6629-7; D) pTT632-22; E) pTT632-23; F) pTT633-16; G) pTT633-26; H) pTT633-28; I) pTT633-29

4.10 Análise fisiológica das taxas fotossintética, da condutância estomática e da transpiração

Para testar a capacidade inserção da sequência *rbc*L com a mutação A378V em tornar funcional a expressão da subunidade maior (L) da RuBisCO para que altere a taxa fotossintética, da condutância estomática e da transpiração. Nós geramos 11 plantas pelo método de biolística que tiveram confirmadas, por clivagem de sítios de restrição, a integração da sequência do transgene *rbc*L-mutante e não-mutante e 24 linhagens de transformantes que não apresentaram o mesmo padrão de clivagem. Em dois experimentos independentes realizados em períodos distintos para averiguar se apenas as linhagens com a mutação inserida no clone

ptDNA de tabaco e se as linhagens transplastômicas com a inserção do transgene-sintético com a sequência codante do agente seletivo foram selecionadas 25 linhagens transplastô micas, sendo 10 linhagens da geração T_2 e 15 linhagens da geração T_5 (Tabela 7) que foram comparadas com a planta de tabaco-controle não-transformada, para averiguar se poderia haver alguma resposta fisiológica igual ou diferente ao controle, quanto a taxa de fotossíntese, de condutância estomática e de transpiração.

Antes da antese, as triplicatas de cada linhagem transplastômica da geração T_2 e T_5 e da planta de tabaco-controle com 8 semanas de cultivo em casa de vegetação foram analisadas usando-se o equipamento portátil IRGA para as medições da taxa da troca de CO_2 e vapor de água das folhas intactas de tabaco com o ambiente externo. A condição de temperatura da câ mara interna do aparelho variou no primeiro experimento de 31°C a 40°C, enquanto que no segundo experimento variou de 34°C a 36°C (Figura. 22). Nestes dois períodos de medição, a variação da temperatura não foi significativa (P<0,05%, pelo teste de Tukey).

Figura 21 - Período 1 em que as linhagens transplastômicas não-mutante pTT632-14, -22, -20, -15, -23, mutante pTT633-29, -26, -16, -19 e da planta de tabaco controle não-transformada cultivadas em vasos de 5 L, em casa de vegetação com 4 semanas de cultivo- irrigação manual (diária) e tratamento com solução Hoagland (50mL, semanal)

A análise de temperatura foliar (Figura 22A) dentro da câmara do aparelho portátil IRGA manteve uma média de temperatura constante durante as análises fisiológicas das taxas de fotossíntese (*A*) (Figura 22B), condutância estomática (*gs*) (Figura 22C) e transpiração (*E*) (Figura 22D) que não apresentaram, no experimentos 1 e 2 nenhuma diferença significativa entre as três repetições biológicas, de cada uma das linhagens transplastômica com o gene

*rbc*L-mutante e as plantas transplastômicas controle com o gene *rbc*L-não-mutante e a planta de tabaco não-transformada.

No primeiro experimento as linhagens transplastômicas da geração T_2 a concentração de CO_2 no interior da câmara de medição ficou entre 4,01 e 4,24 μmol $CO_2.mol^{-1}$. No primeiro experimento, as taxas de A observadas sob condições de temperatura e DPV de casa de vegetação variaram de 2,22 μmol.m^{-2} s^{-1} a 4,60 μmol.m^{-2} s^{-1}. As taxas de *A* foram produziram valores acima de 4,3 μmol m^{-2} s^{-1} nas linhagens transplastômicas 16, 26, 28 e 29 foram significativamente (*P*<0,05, teste de Tukey) maiores do que a taxa produzida pela planta de tabaco-controle. No segundo experimento, as linhagens transplastômicas da geração T_5 foram analisadas com concentração de CO_2 no interior da câmara de medição entre 4,02 μ mol.m^{-2} s^{-1} a 4,2 μmol.m^{-2} s^{-1}, com a taxa de *A* variou de 2,09 ± 0,6 μmol.m^{-2} $s^{-}1$ a 2,8 ± 0,5 μ mol m^{-2} s^{-1}, sendo que as linhagens transplastômicas 3, 6, 16, 26, 28 e 29 produziram taxas superiores a 2,83 μmol.m^{-2} s^{-1} que foram significativamente (*P*<0,05, teste de Tukey) do que as taxas observadas nos controles (Figura. 22B).

A taxa gs manteve-se entre 0,05 μmol.m^{-2} s^{-1} e 0,26 μmol.m^{-2} s^{-1} no experimento 1 e entre 0,12 e 0,26 μmol.m^{-2} s^{-1} no experimento 2 produziram valores acima de 0,2 μmol m^{-2} s^{-1} nas linhagens transplastômicas 16, 26, 28 e 29 significativamente (*P*<0,05, teste de Tukey) maiores do que a taxa produzida pelos controles (Figura 22C). A taxa de *E* variou de 2,11 μ mol.m^{-2} s^{-1} a 4,56 μmol.m^{-2} s^{-1} no experimento 1 e de 1,11 μmol.m^{-2} s^{-1} a 1,98 μmol.m^{-2} s^{-1}, com taxas significativamente (*P*<0,05, teste de Tukey) maiores observadas nas linhagens transplastômicas, quando comparado com os controles (Figura 22D).

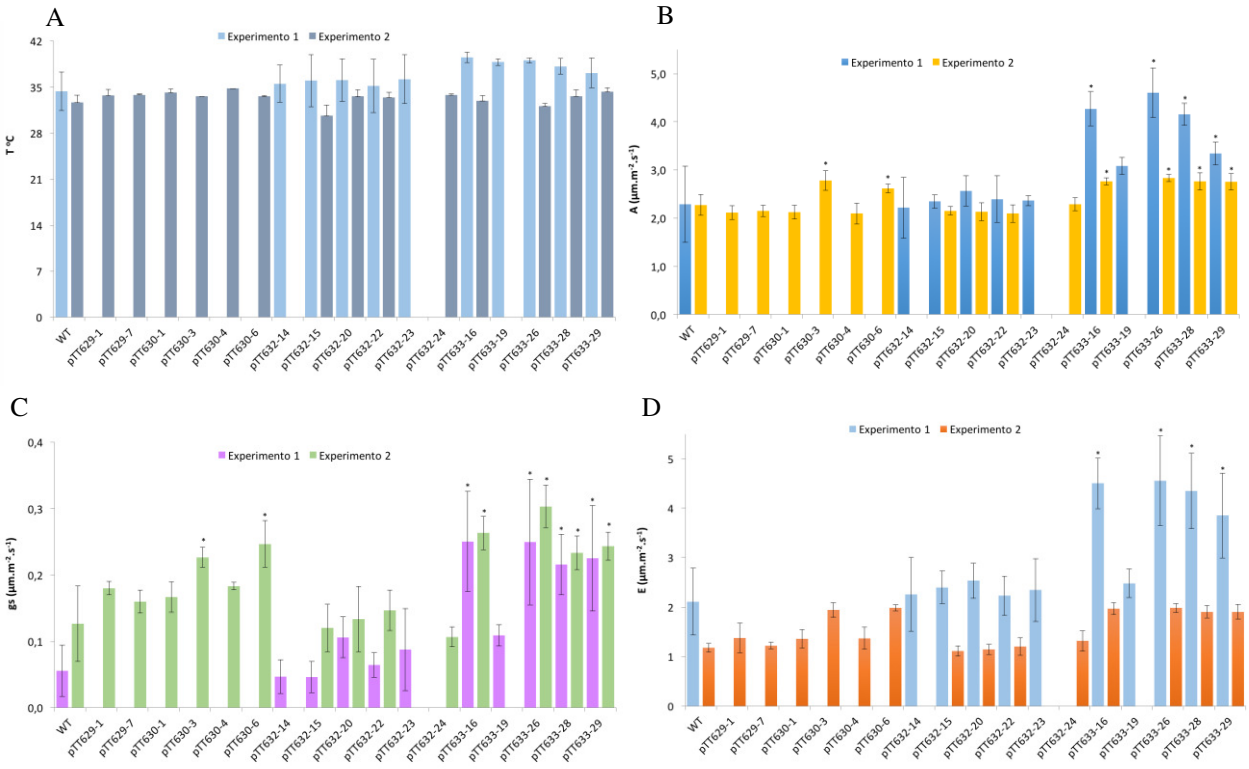


Figura 22 - Taxas de (**A**) temperatura (T°C), de (**B**) fotossíntese (*A*), de (**C**) condutância estomática (*gs*) e de (**D**) Respiração (*E*) da planta de tabaco controle (Wt) comparada, no experimento 1, com as taxas das linhagem 14,15, 20, 22, 23 (pTT630) e 16, 19, 28 e 29 e no experimento 2, com as taxas das linhagens 1 e 7 (pTT629); 1, 3, 4 e 6 (pTT630), 15, 20, 22 e 24 (pTT632), 16, 26, 28 e 29 (pTT633); (Tukey; $P< 0,05$)

5 DISCUSSÃO

5.1 Inserção do transgene *rbc*L-sintético por recombinação homóloga

Muitos estudos viabilizando a transformação genética de cloroplasto pelo uso de vetores específicos está disponível e podem de maneira segura permitir a transcrição das sequências codantes *rbc*L e *acc*D. Assim, diversos experimentos têm sido desenvolvidos, com diferentes estratégias para o processamento do mRNA, pelo uso de diferentes vetores de transformação (WOSTRIKOFF; STERN 2007; MONDE et al., 2000a; STAUB; MALIGA 1994;) com alto potencial da expressão do transgene nas linhagens transplastômicas (SINGH et al., 2010).

Os vetores sintéticos pTT629, pTT630, pTT632 e pTT633 foram construídos para carregar as sequências *rbc*L-sintética de interesse que apresentam sítios de recombinação bem caracterizados (Figura. 1). Pela recombinação homóloga, o transgene *rbc*L-sintético que carrega o códon com e sem a mutação A378V foi inserido na região homóloga *rbc*L::*acc*D nativa do genoma do cloroplasto de tabaco. O vetor de transformação pSS16 foi usado como base para o desenvolvimento desses vetores de expressão personalizados, com inserções de interesse na sequência *rbc*L::*acc*D, na qual foram inseridos muitos sítios de restrição a partir do seu vetor base que foi considerado adequado para construir um plasmídeo com o gene exó geno que carrega uma mutação e que pudesse ser inserido em *E. coli*. Os plasmídeos que possuem a informação, sobre a integração de sequências que diferem em um único nucleotí deo da sequência homóloga alvo é escasso e tem sido feito esforços que possam torná-los modelos úteis, para a mutagênese pela transformação genética plastidial em plantas de interesse agronômico (SINAGAWA-GARCÍA et al., 2009).

O gene *aad*A é usado na integração concomitante ao gene de interesse, como gene marcador seletivo para conferir aos transformantes a resistência necessária ao antibiótico espectinomicina e/ou estreptomicina, para o desenvolvimento da planta transplastômica. Neste trabalho esse gene está inserido respectivamente à direita e à esquerda dos transgenes *rbc*L e *acc*D nos vetores de transformação (Figura. 1), detectou-se visualmente a inserção do transgene *aad*A (Figura. 7) incorporado ao genoma do cloroplasto de todas as plantas que eram candidatas a transformantes. A partir da confirmação da integração do gene marcador seletivo no genoma do cloroplasto, fez-se a amplificação da sequência *rbc*L::*acc*D das

linhagens transplastômicas que mostraram a presença tanto do fragmento correspondente ao gene *rbc*L nativo da planta não-transformada, quanto do transgene na planta transformada (Figura 9) indicando que as plantas transplastômicas estavam em estado de heteroplasmia. Nos subcultivos seguintes, pela análise da amplificação da sequência *atp*B::*rbc*L::*acc*D, observou-se que a geração T_5 apresentava apenas o transgene *rbc*L (Figura 10) apenas nas linhagens transplastômicas e não mais a presença do fragmento do gene nativo da planta transformada, indicando o estado homoplásmico dos transplastomas. Assim, a homoplasmia foi confirmada também pela análise de germinação de sementes em meio com o agente de seleção espectinomicina, pelo qual observou-se que todas as plantas transplastômicas apresentavam fenótipo verde (Figura. 20C, D, E, F, G, H e I) e apenas as plantas tabaco controle não-transformada se mostrou sensível ao agente se seção pelo fenótipo branco característico (Figura. 20B).

O processo de inserção do DNA exógeno no genoma do cloroplasto ocorre pelo mecanismo de recombinação homóloga. O tecido vegetal pode se tornar homoplásmico para o plastoma transformado, indicando que o gene *aad*A que codifica para resistência ao agente seletivo foi incorporado ao plastoma da planta inicialmente não transformada, após vários subcultivos em meio de cultura. O processo de transformação se mostrou eficaz, pois houve a substituição da sequencia do transgene que contem o cassete de expressão do gene *rbc*L-sinté tico e do gene marcador seletivo pela sequência homóloga do plastoma da planta controle não transformada, como demonstrado por MALIGA (1993). Em outro experimento de transformação com um gene *rbc*L-mutante e o gene marcador seletivo *aad*A, mostrou-se a inserção no plastoma por recombinação homóloga, mostrando que pode ocorrer a coexistência do genoma nativo e do transformante até se obter a homoplasmia das plantas que mantiveram a inserção da mutação dirigida do transgene *rbc*L após vários subcultivos em meio de cultura com o agente seletivo espectinomicina.

Para identificar a origem do ptDNA nas linhagens transplastômicas, fez-se a amplificação, pela PCR, dos fragmentos alvos específicos que foram em seguida clivados com enzimas de restrição para análise visual. Foram analisados, após a clivagem com enzimas de restrição, o fragmento de 2,2 Kb gerados pela amplificação da sequência *rbc*L::*aad*A de 33 plantas transplastômicas de eventos independentes de regeneração em meio seletivo, produzidas pela transformação genética, pela clivagem independente com as enzimas de

restrição *Acc*I com 17 pb à esquerda e *Nde*I com 21 pb à direita da região do códon sintético com e sem a mutação (Figura 12). O diagnóstico da clivagem dos sítios *Acc*I e *Nde*I mostrou que 11 linhagens transplastômicas apresentavam a inserção correta do gene *rbc*L-sintético, adjacente ao gene marcador seletivo *aad*A, pela comparação visual com o controle da planta de tabaco não-transformada.

A inserção de sequências do gene de interesse *rbc*L-sintético e do gene marcador seletivo *aad*A na região homóloga alvo no genoma do cloroplasto pode ocorrer por diferentes eventos de recombinação homóloga. Se a recombinação ocorreu no fim da sequência *rbc*L alvo, a transformação pode não ter substituído de forma integral a sequência *rbc*L::*acc*D endó geno alvo pela sequência de interesse presente no vetor de transformação sintético. O diagnó stico da clivagem do sítio de restrição *Acc*I, adjacente à esquerda aos códons sintéticos com e sem a mutação mostrou que pode não ter ocorrido a inserção do códon sintético GTT, mas a inserção apenas da sequência que possui o gene marcador seletivo das linhagens transplastô micas, 1, 2, 4, 5, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15 (Figura. 12 B), 19, 25, 27, 31, 32 (Figura 12 C) e 1, 10, 17 e 18 (Figura. 12D) que apresentaram um padrão de tamanho de fragmentos diferente ao observado no controle e nas demais linhagens transplastômicas 16, 26, 28, 29 (Figura. 12A), 3 e 6 (Figura 12B), 15, 22, 23 (Figura.12C) e 2, 7 (Figura. 12D).

A inserção da sequência do gene *aad*A nas linhagens que não apresentaram o mesmo padrão de clivagem do controle foi confirmado pela resistência destas plantas ao agente seletivo espectinomicina (Figura. 20). A produção de múltiplos transplastomas com diferentes processos de recombinação homóloga pode ser produto de múltiplos eventos de transformaçã o independentes (CARRER; MALIGA, 1995; SINAGAWA-GARCÍA et al., 2009). O processo de inserção do DNA exógeno no genoma do cloroplasto ocorre pelo mecanismo de recombinação homóloga, que tem na sua maquinaria a enzima RecA que é essencial nesse processo e que também está relacionada ao reparo do DNA (CERUTTI et al., 1992; CAMERINI-OTERO; HSIEH, 1995; BOCK, 2001). O tecido vegetal pode se tornar homoplá smico para o plastoma transformado, indicando que o gene *aad*A que codifica para resistência ao agente seletivo foi incorporado ao plastoma da planta inicialmente não transformada, após vários subcultivos em meio de cultura. O processo de transformação se mostrou eficaz, pela substituição da sequencia do transgene que contem o cassete de expressão do gene *rbc*L-sinté tico e do gene marcador seletivo pela sequência homóloga do plastoma da planta controle não transformada, como demonstrado por MALIGA (1993). Em outro experimento de

transformação com um gene *rbc*L-mutante e o gene marcador seletivo *aad*A, mostrou-se a inserção no plastoma por recombinação homóloga, mostrando que pode ocorrer a coexistência do genoma nativo e do transformante até se obter a homoplasmia das plantas que mantiveram a inserção da mutação dirigida do transgene *rbc*L após vários subcultivos, em meio de cultura com o agente seletivo espectinomicina (WHITNEY et al. 1999).

A clivagem com as enzimas de restrição *Acc*I do fragmento 2,2 kb da sequência *rbc*L::*aad*A do ptDNA das plantas transplastômicas mostrou que o bombardeamento no tecido alvo com a sequência *rbc*L-sintética foi incorporada no genoma do cloroplasto em 33% (11 de 33) dos clones de tabaco. A frequência de transformação usando-se vetores apropriados para incorporar sequências de interesse na sequência homóloga alvo no plastoma do cloroplasto de tabaco é maior do que em outras cultivares como a batata, o tomate e *Arabidopsis* (LIU et al., 2008; RUF et al., 2001). O uso de vetores específicos na transformaç ão do genoma do cloroplasto tem sido eficiente pelo método de biolística.

Em 11 clones esperou-se que a região homóloga alvo *rbc*L::*acc*D do plastoma fosse totalmente substituída pela sequência-sintética, presente nos vetores de transformação, enquanto que nas demais 22 plantas transplastômicas, a clivagem do sítio de restrição *Acc*I e *Nde*I que a região da sequência-sintética à direita do sítio de restrição *Nde*I e adjacente ao cassete codante do gene marcador seletivo *aad*A foram incorporados ao genoma do cloroplasto enquanto a região à esquerda manteve-se inalterada, estando portanto ausente a região que possui o códon-mutante e o códon-sintético congênere da sequência *rbc*L nativo do cloroplasto de tabaco.

5.2 Análise fisiológica da taxa fotossintética

Até o momento, a forma ativa da enzima RuBisCO e sua capacidade de expressão carboxilase e oxigenase, em respectivamente fixar o CO_2 e o O_2, no sítio catalítico da estrutura proteica, está caracterizada em diversas espécies hospedeiras. A transformação gené tica do cloroplasto é uma importante ferramenta desenvolvida que suprimiu a frustação da dificuldade de se obter uma planta superior com uma RuBisCO mutante, por que permite a

inserção se uma sequência codante do gene da enzima RuBisCO com a presença de uma mutação. Assim, neste trabalho tentou-se substituir uma alanina por uma valina, A378V na planta modelo de tabaco para induzir a subunidade maior *rbc*L catalisar mais CO_2, possibilitando o aumento da taxa fotossintética das linhagens transplastômicas, como relatado por Satagopan et al. (2009) que indicou maior atividade carboxilase após a substituição de uma alanina por uma valina do sítio catalítico da subunidade maior da RuBisCO, sem perde a especificidade CO_2/O_2. A alteração catalítica do gene *rbc*L pode requerer alterações nos resí duos, como o de Lys-201 (sítio de carbamilação), de Lys-175 (essencial para a enolação da RuBP) ou de Lys-334 (estabiliza o estado de transição da carboxilação do enediol) (CLELAND et al., 1998).

As linhagens transplastômicas não apresentaram diferenças fenotípicas óbvias causadas pela integração total ou parcial do ptDNA-sintético em relação à planta selvagem de tabaco. Entretanto, muitos estudos de eliminação ou suspensão da expressão de genes do cloroplasto sugerem que a alteração da função desses genes, quando prejudiciais à resposta fisiológica da planta, no ambiente em que vivem, elas podem apresentar alterações fenotípicas óbvias sob condições ambientais extremas (ROGALSKI et al., 2008).

No primeiro e segundo experimentos, respectivamente as linhagens transplastômicas da geração T_2 e T_5, com a mutação, mostraram taxas de *A* (Figura 22 B), gs (Figura 22C) e de E (Figura 22D) superiores à observada na planta de tabaco-controle, com exceção da linhagem 29, que no segundo experimento não apresentou uma diferença significativa em relação aos controles. A resposta observada da taxa de fotossíntese pode ser devido à inserção da mutação A378V no transplastoma, visto que as linhagens transplastômicas com a mutação mantiveram as maiores taxas de *A*, em condições iguais de casa de vegetação.

As menores taxas de *A*, *gs* e *E* da das linhagens transplastômicas com o gene *rbc*L-nã o-mutante, comparadas com as linhagens com a mutação, do primeiro e segundo experimentos são consistentes, pois ocorreu em todas as plantas transplastômicas sem a mutaç ão e na planta de tabaco controle, em ambiente com o mesmo tratamento hídrico, nutricional e de luminosidade. Um resultado diferente poderia ter sido observado, caso algum destes parâ metros não tivessem sido aplicados na mesma medida no mesmo experimento (YODER et al., 1994; GOWER, 1996; O'GRADY et al., 2008). Otimizando a eficiência da carboxilase da RuBP pela transgenia da RuBisCO, tem o potencial de melhorar a eficiência do uso da água

pela planta (PARRY et al., 2007), o que pode melhorar a logística de irrigação nos campos agriculturáveis.

A análise da fotorrespiração, como resultado da medição do Km (CO_2), isolando-se a proteína RuBisCO, faz-se necessária em futuros estudos, para se determinar os parâmetros para se mensurar as trocas gasosas entre a folha e o ambiente atmosférico. Whitney et al. (1993) mostrou uma perturbação no balanço entre a fotossíntese e a fotorrespiração após a inserção de um gene *rbc*L-mutante para a valina (Val-335), confirmando o modelo de análise proposto por Farquhar et al. (1980). A taxa da assimilação de CO2 da relação fotossí ntese/fotorrespiração foi de 5% em relação à observada na planta controle de tabco não transgênica, suficiente para levar o ponto de compensação do CO2 próximo à concentração do CO2 atmosférico. Em outro relato foi demonstrado que a superexpressão da proteína bi-funtional SBPase/frutose-1,6-bisfosfatase (FBPase) aumentou a fixação do CO_2 pela fotossí ntese e em condições de CO_2 saturante (RAINES, 2006).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A transformação genética do cloroplasto realizada neste trabalho confirmou que o mé todo por biolística é eficiente para a transformação genética do cloroplasto, pois permitiu inserir um gene *rbc*L-sintético no plastoma dos clones de tabaco não transgênico.

As técnicas moleculares, como a PCR, o sequenciamento a partir do DNA total de folhas de tabaco transformados com os vetores pTT629, pTT630, pTT632 e pTT633 que contem o gene *rbc*L-sintético e a clivagem de sítios de restrição específicos, de fragmentos amplificados desse DNA total permitiram identificar e confirmar a inserção do transgene, no genoma do cloroplasto, em 11 linhagens transplastômicas de tabaco.

A identificação da inserção do transgene *rbc*L-sintético, pela clivagem nos sítios de restrição *EcoR*I, *Acc*I, *Nde*I, *Nsi*L permitiu perceber que o processo de recombinação homó loga é uma vantagem, por ocorrer no genoma do cloroplasto, tornando-se uma ferramenta natural e estratégica para auxiliar na inserção de genes exógenos de interesse após o processo de transformação genética. A identificação, pela clivagem dos sítios de restrição, de linhagens transplastômicas com, apenas, a inserção da região codante do gene marcador seletivo no transplastoma, mostrou que a recombinação homóloga, pode inserir parte e não a sequência exógena inteira.

A pressão de seleção é essencial para se obter as linhagens transplastômicas. As sementes produzidas por estas plantas germinaram em meio seletivo com fenótipo verde, confirmando, a prévia identificação pela técnica da PCR, o estado de homoplasmia dos cloroplastos nessas linhagens.

Há evidência, pela média e desvio padrão observado, entre as amostras transplastô micas e a planta controle de tabaco que a RuBisCO ativada teve sua atividade carboxilase mais ativa, sem detrimento da relação CO_2/O_2 pela maior taxa fotossintética observada nas linhagens transplastômicas, que poderá ser avaliada em estudo posterior, quanto à atividade catalítica da RuBisCO e o quantão a relação fonte/dreno e possíveis alterações na produção ptoteínas fotossintéticas pode afetar estes parâmetros, quando os carboidratos, produto da fotossíntese, acumulam-se nas folhas. A resposta fotossintética, das linhagens transplastô micas, aclimatadas em casa de vegetação. O maior potencial da resposta fotossintética

observado nas linhagens transplastômicas, contendo no transplastoma a mutação A378V está relacionado.

Este trabalho gerou plantas com a mutação A378V, indicando uma maior atividade fotossíntética das plantas de Tabaco transplstômicas. Outras análises como: i) Analisar via PCR Tempo Real para outras enzimas da via da fotossíntese e da rota de redução do carbono e da fotorrespiração; ii) Curva de amido, molécula que é armazenada no cloroplasto e permitirá conhecer o quanto o excesso de trioses fosfato são estocadas; iii) Quantificar rubisco e rubisco ativase em todas as plantas, pelo método não radioativo como Elisa ou SDS-PAGE; iii) curvas do fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (curvas de luz) e em função da concentração de CO_2 (curvas de CO2) na mesma folha; iv) Experimentos com concentração de CO_2 elevada para determinar as taxas de crescimento, a alocação de recursos e o desempenho fotossintético (assimilação de CO_2 e taxa de transporte de elétrons) nas plantas jovens, em desenvolvimento e adulta de tabaco transplastômico; v) Análise de nitrogênio, para determinar o qianro deste micronutriente está sendo usado pela atividade da RuBisCO; vi) Análise de biomassa e consumo de água. Tais experimentos enriquecem o trabalho com resultados que possam esclarecer a forma como a RuBisCO mutante inserida no transplastoma responde às situações em diferentes taxas de CO_2 e luz, além de poder demonstrar se há alterações nas enzimas envolvidas no processo fotossintético e na na rota de redução do carbono.

REFERÊNCIAS

ACHARYA, K.; NEUPANE, B.; ZAZUBOVICH, V.; SAYRE, R.T.; PICOREL, R.; SEIBERT, M.; JANKOWIAK, R. Site energies of active and inactive pheophytins in the reaction center of photosystem ii from *Chlamydomonas reinhardtii*. **The Journal of Physical Chemistry**, New York, v. 116, n. 12, p. 3890-3899, 2012.

ALLAKHVERDIEVA, S.I.; TOMOC, T.; SHIMADAB, Y.; KINDOC, H.; NAGAOD, R.; KLIMOVA, V.V.; MIMUROB, M. Redox potential of pheophytin A in photosystem ii of two cyanobacteria having the different special pair chlorophylls, **Proceedings National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 110, p. 1-6, 2010.

ALONSO, H.; BLAYNEY, M.J.; BECK, J.L.; WHITNEY S.M. Substrate-induced assembly of *Methanococcoides burtonii* D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase dimers into decamers. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 284, p. 33876-33882, 2009.

AMARNATH, K.; BENNETT, D.I.G.; SCHNEIDER, A.R.; FLEMING, G.R. Mechanisms of light harvesting by photosystem II in plants. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington , v. 113, p. 1-23, 2015.

ANDERSON B., STYRING S. Photosystem II: molecular organization, function and acclimation. **Currents Topics in Bioenergetics**, Amsterdam, v. 16, p. 2-81, 1991.

ANDERSSON, I. Large structures at high resolution: the 1.6 Å crystal structure of spinach ribulose-1,5-bis-phosphate carboxylase/ oxygenase complexed with 2-carboxyarabinitol bisphosphate. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 259, p. 160-74, 1996.

BENT, A.F. *Arabidopsis* in Planta Transformation. Uses, Mechanisms, and Prospects for Transformation of Other Species. Uses, Mechanisms, and Prospects for Transformation of Other Species. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 124, p. 1540–1547, 2000.

AMERONGEN, H.; CROCE, R. Light harvesting in photosystem II. **Photosynthesis Research**, Washington, v. 113, n. 2/3, p. 251-263, 2013.

ANDREWS, J.T.; LORIMER, G.H. Rubisco: structure, mechanisms and prospects improvement. In: HALEH, M.D.; BOARDMAN, N.K. (Ed.). **Biochemistry of plants.** New York: Academic Press, 1987. v. 10, p. 132-207.

ANDREWS, T.J.; WHITNEY, S.M. Manipulating ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase in the chloroplasts of higher plants. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 414, p. 159-169, 2003.

BAR-EVEN, A.; NOOR, E.; LEWIS, N.E.; MILO, R. Design and analysis of synthetic carbon fixation pathways. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 107, p. 8889–8894, 2010.

BARKAN, A.; WALKER, M.; NOLASCO, M.; JOHNSON, D. A nuclear mutation in maize blocks the processing and translation of several chloroplast mRNAs and provides evidence for

the differential translation of alternative mRNA forms**. EMBO Journal** v. 13, p. 3170–3181, 1994.

BASSI, R.; SANDONA, D.; CROCE, R. Novel aspects of chlorophyll a/b-binding proteins. **Physiologia Plantarum**, Praha, v. 100, p. 769–779, 1997.

BAUWE, H.; HAGEMANN, M.; KERN, R.; TIMM, S. Photorespiration has a dual origin and manifold links to central metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, Berlin, v. 15, p. 269–275, 2012.

BERNARDO, M.K.O.; ORGANO, V.G. Chlorophyll as a simple, inexpensive and environment-friendly colorimetric indicator for NO_2 gas. **Oriental Journal of Chemistry**, BHOPAL, v. 30, n. 2, p. 445-449, 2014.

BOCK, R. Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. **Journal of Molecular Mycology**, London, v. 312, n. 3, p. 425-38, Sept.. 2001.

BOCK, R.; KHAN, M.S. Taming plastids for a green future. **Trends in Biotechnology**, Barking, v. 22, p. 311-318, 2004.

CAMERINI-OTERO, D.; HSIEH, P.; Homologous Recombination Proteins in Prokaryotes and Eukaryotes. **Annual Review Genetics**. Palo Alto California, v. 29, p. 509-552, 1995.

CARMO-SILVA, A.; SALVUCCI, M.E. The temperature response of CO_2 assimilation, photochemical activities and Rubisco activation in *Camelina sativa*, a potential bioenergy crop with limited capacity for acclimation to heat stress. **Planta**, Berlin, v. 9, p. 1817-1832, 2012.

CARRER, H. Transformação de cloroplastos. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 1, n. 5, p. 52-54, 1998.

CARRER, H.; MALIGA, P. Targeted insertion of foreign genes into the tobacco plastid genome without physical linkage to the selectable marker gene. **BioTechnology**, New York, v. 13, n. 8, p. 791-794, 1995.

CARRER, H.; BARBOSA, A.L.; RAMIRO, D.A. Biotecnologia na Agricultura, **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 24, p. 156-157, 2010.

CARRER, H.; HOCKENBERRY, T.N.; SVAB, Z.; MALIGA, P. Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation in tobacco. **Molecular & General Genetics**, Berlin, v. 241, p. 49–56, 1993.

CEGELSKI, L.; SCHAEFER, J. NMR determination of photorespiration in intact leaves using in vivo $13CO_2$ labeling. **Journal of Magnetic Resonance**, San Diego, v. 178, n. 1, p. 1-10, 2006.

CERUTTI, H.D; OSMAN, M.; GRANDONI, P.; JAGENDORF, A.T. A Homolog of Escherichia coli RecA Protein in Plastids of Higher Plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, Washington, v. 89, p. 8086-8072, 1992.

CHITNIS, P.R.; THORNBER, J.P. The major light-harvesting complex of photosystem II: aspects of its molecular and cell biology. **Photosynthesis Research**, Washington, v. 16, p. 41–63, 1988.

CLELAND, W.W.; ANDREWS, T.J.; GUTTERIDGE, S.; HARTMAN, F.C.; LORIMER, G.H. Mechanism of Rubisco: the carbamate as general base. **Chemical Reviews**, Washington, v. 98, p. 549-561, 1998.

DAY, A.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, M. The chloroplast transformation toolbox: selectable markers and marker removal. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 9, p. 540–553, 2011.

DEAN, C.; PICHERSKY, E.; DUNSMUIR, P. Structure, evolution, and regulation of RbcS genes in higher plants, **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 40, p. 415-439, 1989.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, Hauppauge, v. 19, p. 11-15, 1987.

EIBL, C.; ZOU, Z.; BECK, A.; KIM, M.; MULLET, J.; KOOP, H.U. In vivo analysis of plastid *psb*A, rbcL and rpl32 UTR elements by chloroplast transformation: tobacco plastid gene expression is controlled by modulation of transcript levels and translation efficiency. **The Plant Journal**, Oxford, v. 19, p. 333-345, 1999.

ELLIS, R.J. Most abundant protein in the world. **Trends Biochemical Science**, Amsterdam, v. 4, p. 241-244, 1979.

EVANS, J.R. The relationship between CO_2-limited photosynthetic rate and ribulose-1,5-bisphosphate-carboxylase content in two nuclear-cytoplasm substitution lines of wheat, and the coordination of Ribulose-bisphosphate-carboxylation and electron-transport capacities, **Planta**, Berlin, v. 167, n. 3, p. 351-358, 1986.

FALCONE, D.L; TABITA, F.R. Expression of endogenous and foreign Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase (RuBisCO) genes in a RuBisCO deletion mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, n. 6, p. 2099-108, 1991.

FARQUHAR, G.D.; SHARKEY, T.D. Stomatal conductance and photosynthesis. Annual **Review of Plant Physiology**, Boca Raton, v. 33, p. 317-345, 1982.

FERNIE, A.R.; BAUWE, H.; EISENHUT, M.; FLORIAN, A.; HANSON, D.T.; HAGEMANN, M.; KEECH, O.; MIELEWCZIK, M.; NIKOLOSKI, Z.; PETERHÄNSEL, C.; ROJE, S.; SAGE, R., TIMM; S., VON CAMMERER, S.; WEBER, A.P.M.; WESTHOFF, P. Perspectives on plant photo respiratory metabolism. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 15, n. 4, p. 748-53, 2012.

FLEXAS, J.; BARBOUR M.M.; BRENDEL, O.; CABRERA, H.M., CARRIQUÍ, M.; DÍAZ-ESPEJO, A.; DOUTHE, C.; DREYER, E.; FERRIO, J.P.; GAGO, J.; GALLÉ, A.; GALMÉS, J.; KODAMA, N.; MEDRANO, H.; NIIMETS, Ü.; PEGUERO-PINA, J.J.; POU, A.; RIBAS-CARBÓ, M.; TOMÁS, M.; TOSENS, T.; WARREN, C.R. Mesophyll diffusion conductance

to CO2: an unappreciated central player in photosynthesis. **Plant Science**, Shannon, v. 193-194, p. 70-84, 2012.

FURBANK, R.T.; HATCH, M.D. Mechanism of C_4 photosynthesis: the size and composition of the inorganic carbon pool in bundle-sheath cells. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 85, p. 958–964, 1987.

GALMÉS, J.; KAPRALOV, M.V.; ANDRALOJC, P.J.; CONESA, M.À.; KEYS, A.J.; PARRY, M.A.; FLEXAS J. Expanding knowledge of the Rubisco kinetics variability in plant species: environmental and evolutionary trends. **Plant, Cell & Environment**, New York, v. 37, n. 9, p. 1989-2001, 2014.

GIBSON, J.L.; TABITA, F.R. The molecular regulation of the reductive pentose phosphate pathway in Proteobacteria and Cyanobacteria. **Archives of Microbiology,** Berlin v. 166, p. 141–150, 1996.

GOLDS, T.; MALIGA; P., KOOP, H.-U. Stable plastid transformation in PEG-treated protoplasts of *Nicotiana tabacum*. **Biotechnology**, Berlin, v. 11, p. 95-97, 1993.

GOVINDJEE; KERN, J.F.; MESSINGER, J.; WHITMARSH, J. Photosystem II. In: **Encyclopedia of Life Sciences (ELS)**. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2010. p. 1-15.

GOWER, S.T.; McMURTRIE, R.E.; MURTY, D. Aboveground net primary production decline with stand age: potential causes. **Trends in Ecological and Evolutionary Research**, Amsterdam, v. 11, p. 378-382, 1996.

GOWIK, U.; WESTHOFF, P. The path from C_3 to C_4. **Photosynthesis Plant Physiology**, Lancaster, v. 155, n. 1, p. 56-63, 2011.

GRAY, B.N.; AHNER, B.A.; HANSON, M.R. High-level bacterial cellulase accumulation in chloroplast-transformed tobacco mediated by downstream box fusions. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 102, p. 1045-1054, 2009.

GRAY, B.N.; YANG, H.; AHNER, B.A.; HANSON, M.R. An efficient downstream box fusion allows high-level accumulation of active bacterial beta-glucosidase in tobacco chloroplasts. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 76, p. 345–355, 2011.

HANKAMER, B.; BARBER, J. Structure and membrane organization of photosystem II in green plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 641-671, 1997.

HANSEN, G.; M.S., WRIGHT Recent advances in the transformation of plants. v. 4 (6), p. 226-231, 1999.

HANSON, M.R.; GRAY, B.N.; AHNER, B.A. Chloroplast transformation for engineering of photosynthesis, **Journal of Experimental Botany**, Oxford 64(3):731-42 2012.

HASSE, C.; SCHÖTTLER, M.A.; BOCK, R. The plastid genome-encored Ycf4 protein functions as a nonessential assembly factor for photosystem in higher plants, **Plant Physiology**, Lancaster, v. 159, n. 2, p. 579-591, p. 2012.

HUDSON, G.S.; EVANS, J.R.; VON CAMMERER, S.; ARVIDSSON, Y.B.C.; ANDREWS, T.J. Reduction of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase content by antisense RNA reduces photosynthesis in transgenic tobacco plants. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 98, p. 294-302, 1992.

JANSSON, S.; PICHERSKY, E.; BASSI, R.; GREEN, B.R.; IKEUCHI, M.; MELLIS A.; SIMPSON, D.J.; SPANGFORT, M.; STAEHELIN, L.A.; THORNBER, J.P. A nomenclature for the genes encoding the chlorophyll a/b binding proteins of higher plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v. 10, p. 242-253, 1992.

Mimosa scabrella, *Peltophorum dubium*, *Schinus therebinthifolius* e *Matayba Elaeaginoides* em dependência da intensidade luminosa. **Acta Forestalia Brasiliensis**, Curitiba, v. 1, n. 1, p. 89-98, 1986.

JARVIS, P.; DORMANN, P.; PETO, C.A.; LUTES, J.; BENNING, C.; CHORY, J. Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the *Arabidopsis MGD syntetase* 1 mutant. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, Washington. v. 97, n. 14, p. 8175-8179, 2000.

KAJALA, K.; COVSHOFF, S.; KARKI, S.; WOODFIELD, H.; TOLLEY, B.J.; DIONORA, M.J.; MOGUL, R.T.; MABILANGAN, A.E.; DANILA, F.R.; HIBBERD, J.M.; QUICK, W.P. Strategies for engineering a two-celled C(4) photosynthetic pathway into rice. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, p. 3001-3010, 2011.

KANEVSKI, I.; MALIGA, P. Relocation of the plastid rbcL gene to the nucleus yields functional ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in tobacco chloroplasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, Washington, v. 91, p. 1969-1973, 1994.

KANEVSKI, I.; MALIGA, P.; RHOADES, D.F.; GUTTERIDGE, S. Plastome engineering of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in tobacco to form a sunflower large subunit and tobacco small subunit hybrid. **Plant Physiology,** Lancaster, v. 119, p. 133-142, 1999.

KAPRALOV, M.; FILATOV, D. Widespread positive selection in the photosynthetic Rubisco enzyme. BMC **Evolutionary Biology**, London, v. 7, p. 1–10, 2007.

KNIGHT, S.; ANDERSSON, I.; BRANDEN, C.-I. Crystallographic analysis of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase from spinach at 2.4C resolution. **Journal of Molecular Biology**. London, v. 215, p. 113-160, 1990.

KLEIN, T.M.; HARPER, E.C.; SVAB, Z.; SANFORD, J.C.; FROMM, M.E.; MALIGA, P. Stable genetic transformation of intact Nicotiana cells by the particle bombardment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 85, p. 8502-8505, 1987.

KO, K.; KO, Z.W.; TURPIN, D.H.; LABATE, C.A.; MOHANTY, N.; GRANELL, A. Overproduction of chlorophyll a/b binding protein enhances photosyntetic actvity in

transgenic tobacco. In: MURATA, N. (Ed.). **Research in photosynthesis**. Amsterdam: Kluwer Academic, 1992. chap. 3, p. 445-448.

KROLL, D.; MEIERHOFF, K.; BECHTOLD, N.; KINOSHITA, M.; WESTPHAL, S.; VOTHKNECHT, J.S.; WESTHOFF, P. *VIPP1*, a nuclear gene of *Arabidopsis thaliana* essential for thylakoid membrane formation. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 98, n. 7, p. 4238-4242, 2001.

KÜHLBRANDT, W.; WANG, D.N.; FUJIYOSHI, Y. Atomic model of plant light-harvesting complex. **Nature**, London, v. 367, p. 614-621, 1994.

KURODA, H.; MALIGA, P. Complementarity of the 16S rRNA penultimate stem with sequences downstream of the AUG destabilizes the plastid mRNAs. **Nucleic Acids Research**, London, v. 29, p. 970–975, 2001a.

_____. Sequences downstream of the translation initiation codon are important determinants of translation efficiency in chloroplasts. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 125, p. 430-436, 2001b.

LACIS, A.A.; SCHMIDT, G.A.; RIND, D.; RUEDY, R.A. Atmospheric CO_2: principal control knob governing Earth's temperature. **Science**, Washington, v. 330, p. 356-359, 2010.

LAING, W.A.; OGREN, W.L.; HAGEMAN, R.H. Regulation of soybean net photosynthetic CO_2 fixation by interaction of CO_2, O_2 and ribulose 1,5- diphosphate carboxylase. **Plant Physiology**, Lancaster, v, 54, p. 678–685, 1974.

LEE, B.G.; READ, B.A.; TABITA, F.R. Catalytic properties of recombinant octameric, hexadecameric, and heterologous cyanobacterial/bacterial ribulose- 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 291, n. 2, p. 263-269, 1991.

LEUNING, R.; KRIEDMANN, P.E.; McMURTRIE, R.E. Simulations of evapotranspiration by trees. **Agricultural Water Management**, Amsterdam, v. 19, p. 205-221, 1991.

Li H, Sawaya MR, Tabita FR, Eisenberg D. 2005. Crystal structure of a novel Rubisco-like protein from the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. **Structure,** Cambridge, 13, 779–789.

LIN, M.T.; OCCHIALINI, A.; ANDRALOJC, P.J.; PARRY, M.A.J.; HANSON, M.R. A faster Rubisco with potential to increase photosynthesis in crops. **Nature**, London, v. 513, p. 547-557, 2014.

LINDAL, M.; SPETEA, C.; HUNDAL, T.; OPPENHEIM, A.B.; ADAM, Z.; ANDERSSONB, B. The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1. **Protein**, Rockville, v. 12, p. 419–431, 2000.

LIU, C.W.; LIN, C.C.; YIU, J.C.; CHEN, J.J.; TSENG, M.J. Expression of a *Bacillus thuringiensis* toxin (*cry1*Ab) gene in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) chloroplasts confers high insecticidal efficacy against *Plutella xylostella*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 117, p. 75–88, 2008.

LONG, S.P.; ZHUX, G.; NAIDUS, L. Ort DR. Can improvement in photosynthesis increase crop yields? **Plant, Cell & Environment**, New York, v. 29, p. 315–330, 2006.

SSL, A.; EIBL, C.; HARLOFF, H.J.; JUNG, C.; KOOP, H.U. Polyester synthesis in transplastomic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.): significant contents of polyhydroxybutyrate are associated with growth reduction. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 21, p. 891-899, 2003.

SSL, A.; BOHMERT, K.; HARLOFF, H.; EIBL, C.; MUHLBAUER, S.; KOOP, H.U. Inducible trans-activation of plastid transgenes: expression of the *R. eutropha* phb operon in transplastomic tobacco. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v. 46, p. 1462-1471, 2005.

MAGEE, A.M.; MACLEAN, D.; GRAY J.C.; KAVANAGH T.A. Disruption of essential plastid gene expression caused by T7 RNA polymerase- mediated transcription of plastid transgenes during early seedling development. **Transgenic Research**, London, v. 16, p. 415-428, 2007.

MAKINO, A.; MAE, T.; PHIRA, K., Differences between wheat and rice in the enzyme properties of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and their relationship to photosynthetic gas exchange, **Plant,** Berlin, v. 174, p. 30-38, 1998.

MALIGA, P. Plastid Transformation in higher plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 289-313, 2004.

MALIGA, P.; BOCK, R. Plastid biotechnology: food, fuel, and medicine for the 21st century. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 155, n. 4, p. 1501-1150, 2011.

MALLMANN, J.; HECKMANN, D.; BRAUTIGAM, A.; LERCHER, M.J.; WEBER, A.P.M.; WESTHOFF, P.; GOWIK, U. The role of photorespiration during the evolution of C_4 photosynthesis in the genus *Flaveria*. **eLife Science,** Cambridge, v. 16, n. 3, e02478, 2014.

ALVES, J.F.C.; VIEIRA, G. Leaf gas exchange and carbohydrates in tropical trees differing in successional status in two light environments in central Amazonia. **Tree Physiology**, Oxford, v. 21, p. 1311-1318, 2001.

MAURINO, V.G.; PETERHÄNSEL, C. Photorespiration: current status and approaches for metabolic engineering. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 13, n. 3, p. 249-256, June 2010.

MAURINO, V.G.; WEBER, A. Engineering photosynthesis in plants and synthetic microorganisms. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 3, p. 743-751, 2013.

MEDINA, M. Structural and mechanistic aspects of flavoproteins: photosynthetic electron transfer from photosystem I to NADP+. **The FEBS journal**, Oxford, v. 276, n. 15, p. 3942-58, ago. 2009.

MEDIAVILLA, S.; ESCUDERO, A. Stomatal responses to drought of mature trees and seedlings of two co-occurring Mediterranean oaks. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 187, p. 281-294, 2004.

MCBRIDE, K.E.; SVAB, Z.; SCHAAF, D.J.; HOGAN, P.S.; STALKER, D.M.; MALIGA, P. Amplification of a chimeric Bacillus gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. **Bio/Technology**, New York, v. 13, p. 362-365, 1995.

MELKOZERNOV, A.N.; BARBER, J.; BLANKENSHIP, R.E. Light harvesting in photosystem I supercomplexes. **Biochemistry**, Washington, v. 45, n. 2, p. 331-345, Jan. 2006.

MIELKE, M.S.; OLIVA, M.A.; BARROS, N.F. de; PENCHEL, R.M.; MARTINEZ, C.A.; ALMEIDA, A.C. Stomatal control of transpiration in the canopy of a clonal *Eucalyptus grandis* plantation. **Trees**, Berlin, v. 13, p. 152-160, 1999.

MONDE, R.A.; GREENE J.C.; STERN D.B. The sequence and secondary structure of the 3'-UTR affect 3'-end maturation, RNA accumulation, and translation in tobacco chloroplasts. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 44, p. 529-542, 2000a.

MONDE, R.A.; SCHUSTER, G.; STERN, D.B. Processing and degradation of chloroplast mRNA. **Biochimie**, Paris, v. 82, p. 573-582 2000b.

MONTEITH J.L. Climate and the efficiency of crop production in Britain. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London,** London, v. 281, p. 277–294, 1977.

MÜLLER, M.G.; NIKLAS, J.; LUBITZ, W.; HOLZWART, A.R. Ultrafast transient absorption studies on photosystem I reaction centers from *Chlamydomonas reinhardtii*. 1. A new interpretation of the energy trapping and early electron transfer steps in Photosystem I. **Biophysical Journal**, Cambridge, v. 85, n. 6, p. 3899-3922, 2003.

MUELLER-CAJAR, O.; STOTZ, M.; WENDLER, P.; HARTL, U.; BRACHER, A.; HAYER-HARTL, M. Structure and function of the AAA+ protein CbbX, a red-type Rubisco activase. **Nature**, London, v. 0, p. 1476-4687, 2011.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum Kobenhavn**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger principles of biochemistry**. 5th ed. New York: W. H. Freeman, 2005. p. 776.

NGUGI, M.R.; HUNT, D.D.; DOLEY, D.; RYAN, P.; DART, P. Selection of species and provenances for low-rainfall areas: physiological responses of *Eucalyptus cloeziana* and *Eucalyptus argophloia* to seasonal conditions in subtropical Queensland. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 193, p. 141-156, 2004.

NOBEL, P.S. High productivity of certain agronomic CAM species. In: WINTER, K.; SMITH, J.A.C. (Ed.). **Crassulacean acid metabolism:** biochemistry, ecophysiology and evolution. Berlin: Springer-Verlag, 1996. p. 255–265.

OLSON, T.L.; WILLIAMS, J.C.; ALLEN, J.P. The three-dimensional structures of bacterial reaction centers. **Photosynthesis Research**, Boston, v. 120, p. 87-98, 2014.

OEY, M.; LOHSE, M.; KREIKEMEYER, B.; BOCK R. Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic. **The Plant Journal**, Oxford, v. 57, p. 436-445, 2009b.

OEY, M.; LOHSE, M.; SCHARFF, L.B.; KREIKEMEYER, B.; BOCK, R. Plastid production of protein antibiotics against pneumonia via a new strategy for high-level expression of antimicrobial proteins. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA,** Washington, v. 106, p. 6579–6584, 2009b.

OLSON, T.L.; WILLIAMS, J.C.; ALLEN, J.P. The three-dimensional structures of bacterial reaction centers. **Photosynthesis Research**, Boston, v. 120, p. 87-98, 2014.

OREN, R.; SPERRY, J.S.; KATUL, G.G.; PATAKI, D.E.; EWERS, B.E.; PHILLIPS, N.; SCHAFER, K.V.R. Survey and synthesis of intra- and interspecific variation in stomatal sensitivity to vapour pressure deficit. **Plant, Cell and Environmen**t, Oxford, v. 22, p. 1515-1526, 1999.

PARRY, M.A.J.; MADGWICK, P.J.; CARVALHO, J.F.C.; ANDRALOJC, P.J. Prospects for increasing photosynthesis by overcoming the limitations of Rubisco-citation. **Journal of Agricultural Sciences**, Urbana, v. 145, p. 31–43, 2007.

PETERSON, R.B. Estimation of photorespiration based on the initial rate of post illumination CO_2 release: II. Effects of O_2, CO_2, and temperature. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 73, p. 983-988, 1983.

_____. Quantitation of the O_2-dependent, CO_2-reversible component of the post illumination CO_2 exchange transient in tobacco and maize leaves. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 84, n. 3, p. 862-867, 1987.

PERANI, L.; ROMMENS, C.M.; HUMARA J.M.; YE, J.; YAN, H.; RICHAEL, C.; ZHANG, L.; PERRY, R.; SWORDS, K. Gene transfer methods of crop improvement: introduction of foreign DNA into plants, **Physiologia Plantarum**, Lancaster, v. 68, p. 566-570, 1986.

PETERHÄNSEL, C.; HORST, I.; NIESSEN, M.; BLUME, C.; KEBEISH, R.; KURKCUOGLUS, S.; KREUZALER, F. Photorespiration. **Arabidopsis Book**, Rockville, v. 8, e0130, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1655/ - http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>. Acesso em: 2015

PETERHÄNSEL, C.; MAURINO, V.G. Photorespiration redesigned. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 155, p. 49-55, 2011.

PIMENTEL, C. **Metabolismo de carbono na agricultura tropical.** Seropédica: Edur, 1998. 159 p.

PORTIS, A.R.; PARRY, M.A.J. Discoveries in Rubisco (ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase): a historical perspective. **Photosynthesis Research**. London, v. 94, p, 121-143, 2007.

RAINES C.A. Transgenic approaches to manipulate the environmental responses of the C_3 carbon fixation cycle. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 29, p. 331-339, 2006.

RAVEN, J.A. Rubisco: still the most abundant protein of earth? **New Phytologist**, London, v.198, p. 1-3, 2013.

RACHMILEVITCH, S.; COUSINS, A.B.; BLOOM, A.J. Nitrate assimilation in plant shoots depends on photorespiration. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA,** Washington, v. 101, p. 11506-11510, 2004.

RAINES, C.A. The Calvin cycle revisited. **Photosynthesis Research**, Hague, v. 75, p. 1–10, 2003.

_____. Increasing photosynthetic carbon assimilation in C_3 plants to improve crop yield: current and future strategies. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 155, p. 36-42, 2011.

RAWSON, H.M.; BEGG, J.E.; WOODWARD, R.G. The effect of atmospheric humidity on photosynthesis, transpiration, and water use efficiency of leaves of several plant species. **Planta**, Berlin, v. 134, n. 1, p. 5-10, 1977.

RODERMEL, S.R.; ABBOTT, M.S.; BOGORAD, L. Nuclear-organelle interactions: nuclear antisense gene inhibits Ribulose bisphosphate carboxylase enzyme levels in transformed tobacco plants, **Cell**, Cambridge, v. 55, p. 673-681, 1988.

ROGALSKI, M.; CARRER, H. Engineering plastid fatty acid biosynthesis to improve food quality and biofuel production in higher plants. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 9, p. 554–564, 2011.

ROGALSKI, M.; SCHÖTTLER, M.A.; THIELE, W.; SCHULZE, W.X.; BOCK, R. Rpl33, a nonessential plastid-encoded ribosomal protein in tobacco, is required under cold stress conditions. **Plant Cell**, Bethesda, v. 20, p. 2221– 2237, 2008.

ROTT, M.; MARTINS, N.F.; THIELE, W.; LEINA, W.; BOCK, R.; KRAMERB, D.M.; SCHÖTTLER, M.A. ATP synthase repression in tobacco restricts photosynthetic electron transport, CO_2 assimilation, and plant groTCh by over acidification of the thylakoid lumen. **The Plant Cell**, Oxford, v. 23 n. 1, p. 304-321, 2011.

RUF, S.; HERMANN, M.; BERGER, I.J.; CARRER, H.; BOCK, R. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. **Nature Biotechnology**, New York, v. 19, n. 9, p. 870-5, 2001.

RUMEAU, D.; BECUWE-LINKA, N.; BEYLY, A.; CARRIER P.; CUINE, S.; GENTY, B.; MEDGYESY, P.; HORVATH, E.; PELTIER, G. Increased zinc content in transplastomic tobacco plants expressing a polyhistidine-tagged Rubisco large subunit. **Plant Biotechnology Journal**, London, v. 2, p. 389-399 2004.

SAGE, R.F. The evolution of C_4 photosynthesis. **New Phytologist,** London, v.161, p. 341-370, 2004.

SASCHENBRECKER, S.; BRACHER, A.; RAO, K.V.; RAO, B.V.; HARTL, F.U.; HAYER-HARTL, M. Structure and function of RbcX, an assembly chaperone for hexadecameric Rubisco. **Cell**, Cambridge, v. 129, n. 6, p. 1189-1200, 2007.

SATAGOPAN, S.; STEPHANISCOTT S.S.; SMITH, T.G.; TABITA, F.R. A Rubisco mutant that confers growth under a normally "inhibitory" oxygen concentration. **Biochemistry**, Washington, v. 48, p. 9076-9083, 2009.

SCHMIDT, G.A.; R. RUEDY, R.L.; MILLER; LACIS, A.A. The attribution of the present-day total greenhouse effect. **Journal Geophysical Research**, Hoboken, v. 115, p. 1-6, 2010.

SHINOZAKI, K.; OHME, M.; TANAKA, M.; WAKASUGI, T.; HAYASHIDA, N.; MATSUBAYASHI, T.; ZAITA, N.; CHUNWONGSE, J.; OBOKATA, J.; YAM-AGUCHI-SHINOZAKI, K.; OHTO, C.; TORAZAWA, K.; MENG, B.Y.; SUGITA, M.; DENO, H.; KAMOGASHIRA, T.; YAMADA, K.; KUSUDA, J.; TAKAIWA, F.; KATO, A.; TOHDOH, N.; SHIMADA, H.; SUGIURA, M. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its organization and expression. **The EMBO Jornal**, London, v. 5, p. 2043-2049, 1986.

SILVA, F.A.S.E.; AZEVEDO, C.A.V. de. Principal components analysis in the software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN GRICULTURE, 7., 2009, Reno. **Proceedings…** Reno: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.p.123-143.

SIMPSON, J.; VAN MONTAGU, M.; HERRERA-ESTRELLA, L. Photosynthesis-associated gene families: differences in response to tissue-specific and environmental factors. **Science**, New York, v. 233, n. 4759, p. 34-38, 1986.

SINAGAWA-GARCÍA, S.R.; TUNGSUCHAT-HUANG, T.; PAREDES-LÓPEZ, O.; MALIGA, P. Next generation synthetic vectors for transformation of the plastid genome of higher plants. **Plant Molecular Biology,** Boston, v. 70, p. 487-498, 2009.

SINGH, S.K.; BADGUJAR G.; REDDY V.R.; FLEISHER D.H.; BUNCE J.A. Carbon dioxide diffusion across stomata and mesophyll and photo-biochemical process as affected by growth CO2 and phosphorus nutrion cotton. **Journal of plant physiology**, v. 170, p. 801-813, 2012.

SINGH, A.K.; VERMA, S.S.; BANSAL, K.C. Plastid transformation in eggplant (*Solanum melongena* L.). **Transgenic Research**, London, v. 19, p. 113–119, 2010.

SMITH, S.A.; TABITA; F.R. Positive and negative of mutant forms of prokaryotic (cyanobacterial) ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 331, p. 557–569, 2003.

SMITH, S.A.; TABITA, F.R. Glycine 176 affects catalytic properties and stability of the *Synechococcus* sp. strain PCC 6301 ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. The **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, n. 25, p.632–25 637, 2004.

SPREITZER, R.J.; SALVUCCI, M.E. Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, p. 449-475, Jan. 2002.

STINGACIU, L.-R.; O'NEILL, H.; LIBERTON, M.; URBAN, V.S.; PAKRASI, H.B.; OHL, M. Revealing the dynamics of thylakoid membranes in living cyanobacterial cells. **Nature Science Reports**, London, v. 6, p. 1-6, 2016.

STITT, M. Rising CO_2 levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. **Plant, Cell & Environment**, New York, v. 24, p. 229-238, 1991.

_____. Progress in understanding and engineering primary plant metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 3, p. 1319, 2012.

SUZUKI, Y.; MAKINO, A. Translational down regulation of RBCL is operative in the coordinated expression of Rubisco genes in senescent leaves in rice, **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 4, p. 1145-1152, 2013.

SVAB, Z.; MALIGA, P. Mutation proximal to the tRNA binding region of the Nicotiana plastid 16S rRNA confers resistance to spectinomycin. **Molecular & General Genetics,** Berlin, v. 228, p. 316-319, 1991.

SVAB, Z.; MALIGNA, P. High frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 90, p. 913-917, 1993.

SVAB, Z.; HAJDUKIEWITZ, P.T.J.; MALIGA, P. Stable transformation of plastids in higher plants. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 87, n. 21, p. 8526-8530, 1990.

TABITA, F.R. Microbial Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: a different perspective. **Photosynthesis Research**, Lausanne, v. 60, p. 1-28, 1999.

TABITA, F.R.; HANSON, T.E.; LI, H.; SATAGOPAN S; SINGH, J.; CHAN, S. Function, structure, and evolution of the RubisCO-like proteins and their RubisCO homologs. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 71, n. 4, p. 576–599, 2007.

TABITA, F.R.; SATAGOPAN, S.; HANSON, T.E.; KREEL, N.E.; SCOTT, S.S. Distinct form I, II, III, and IV Rubisco proteins from the three kingdoms of life provide clues about Rubisco evolution and structure/function relationships. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 7, p. 1515–1524, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 719p.

TAMOI, M.; NAGAOKA, M.; MIYAGAWA, Y.; SHIGEOKA, S. Contribution of fructose-1,6-bisphosphatase and sedoheptulose-1,7-bisphosphatase to the photosynthetic rate and carbon flow in the Calvin cycle in transgenic plants. **Plant Cell Physiology,** Tokyo, v. 47, n. 3, p. 380-390, 2006.

TANAKA, S.M. **Análise de homoplasmia de plantas transplastômicas de fumo via PCR em tempo real.** 2011. 68 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

TCHERKEZ, G.; FARQUHAR, G.D.; ANDREWS, T.J. Despite slow catalysis and confused substrate specificity, all ribulose bisphosphate carboxylases may be nearly perfectly optimized. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** Washington, v. 103, p. 7246–7251, 2006.

TING, I.P. Crassulacean acid metabolism. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 36, p. 595 22, 1985.

TOKUTSU, R.; KATO, N,; BUI, K.H.; ISHIKAWA, T.; MINAGAWA, J. Revisiting the supramolecular organization of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 287, n. 37, p. 31574-31581, Sept. 2012.

UBIERNA, N.; SUN, W.; COUSINS, A.B. The efficiency of C_4 photosynthesis under low light conditions: assumptions and calculations with CO_2 isotope discrimination. **Journal** of **Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 9, p. 3119-3134, 2011.

UEDA, T.; NOMOTO, N.; KOGA, M.; OGASA, H.; OGAWA, Y.; MATSUMOTO, M.; STAMPOULIS, P.; SODE, K.; TERASAWA, H.; SHIMADA, I. Structural basis of efficient electron transport between photosynthetic membrane proteins and plastocyanin in spinach revealed using nuclear magnetic resonance. **Plant Cell**, Rockville, v. 24, n. 10, p. 4173-4186, 2012.

VERHOUNIG, A.; KARCHER, D.; BOCK, R. Inducible gene expression from the plastid genome by a synthetic riboswitch. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 107, p. 6204–6209, 2010.

VOET, D.; VOET, J.G. **Biochemistry.** 3rd ed. London: WILEY, 2008. 901p.

WHITNEY, S.M.; ANDREWS, T.J. Plastome-encoded bacterial ribulose- 1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase (Rubisco) supports photosynthesis and growth in tobacco. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 98, p. 14738-14743, 2001a.

_____. The gene for the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase (Rubisco) small subunit relocated to the plastid genome of tobacco directs the synthesis of small subunits that assemble into Rubisco. **Plant Cell**, Rockville, v. 13, p. 193-205, 2001b.

WHITNEY, S.M.; HOUTZ, R.L.; ALONSO, H. Advancing our understanding and capacity to engineer nature's CO_2-sequestering enzyme, Rubisco. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 155, p. 27-35, 2011a.

WHITNEY, S.M.; BALDET, P.; HUDSON, G.S.; ANDREWS, T.J. Form I Rubiscos from non-green algae are expressed abundantly but not assembled in tobacco chloroplasts. **The Plant Journal**, London, v. 26, p. 535–547, 2001.

WHITNEY, S.M.; KANE, H.J.; HOUTZ, R.L.; SHARWOOD R.E. Rubisco oligomers composed of linked small and large subunits assemble in tobacco plastids and have higher affinities for CO_2 and O_2. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 149, p. 1887-1895, 2009.

WHITNEY, S.M.; von CAEMMERER, S.; HUDSON, G.S.; ANDREWS T.J. Directed mutation of the Rubisco large subunit of tobacco influences photorespiration and growth. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 121, p. 579–588, Oct. 1999.

WHITNEY, S.M.; SHARWOOD, R.E.; ORR, D.; WHITE, S.J.; ALONSO, H.; GALMÉS, J. Isoleucine 309 acts as a C_4 catalytic switch that increases ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) carboxylation rate in *Flaveria*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of** the **USA**, Washington, v. 108, p. 14688–14693, 2011b.

WILLEY, D.L.; GRAY, J.C. Synthesis and assembly of cytocrome *b6-f* complex in higher plants. In: GOVINDJEE, B.; BOHNERT, H.J.; BOTTOMLEY, W.; BRYANT, D.A.; MULLET, J. E.; OGREN, W. L.; PAKRASI, H.; SOMERVILLE, C.R. (Ed.). **Molecular biology of photosynthesis**. Oxford: Oxford University Press, 1998. chap. 15, p. 497-516.

WOSTRIKOFF, K.; STERN, D.B. Rubisco. In: HARRIS, E.H.; STERN, D.B.; WITMAN, G.B. (Ed.). **The Chlamydomonas sourcebook**. 2nd ed. London: Academic Press, 2009. p. 303–332.

YANG, H.; GRAY, B.N.; AHNER B.A.; HANSON M.R.; Bacteriophage 5' untranslated regions for control of plastid transgene expression. **Planta**, Berlin, v. 237, n. 2, p. 517-527, 2012.

YE, G.N.; HAJDUKIEWICZ, P.T.; BROYLES, D.; RODRIGUEZ, D.; XU, C.W.; NEHRA, N.; STAUB, J.M. Plastid-expressed 5-enolpyruvylshikimate- 3-phosphate synthase genes provide high level glyphosate tolerance in tobacco. **Plant Journal**, Oxford, v. 25, p. 261-270, 2001.

YODER, B.J.; RYAN, M.G.; WARING, R.H.; SCHOETTLE, A.W.; KAUFMANN, M.R. Evidence of reduced photosynthetic rates in old trees. **Forest Science**, Maryland, v. 40, p. 513-527, 1994.

ZHANG, N.; PORTIS, A.R. Jr. Mechanism of light regulation of Rubisco: a specific role for the larger Rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-f. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 96, p. 943-43, 1999.

ZHANG, X.H.; WEBB, J.; HUANG, Y.H.; LIN. L.; TANG, R.S.; LIU, A. Hybrid Rubisco of tomato large subunits and tobacco small subunits is functional in tobacco plants. **Plant Science**, Shannon, v. 180, p. 480-488, 2011.

ZHU, X.G.; LONG, S.P.; ORT, D.R. Improving photosynthetic efficiency for greater yield. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 61, p. 235-261, 2010.