MARIA SUSANA JORGE PEREIRA

ISOFORMAS DA GLUTAMINA SINTETASE EM *Solanum tuberosum* L.

Localização da expressão, caracterização bioquímica e molecular e papel das isoenzimas na eficiência de utilização de azoto em diferentes situações fisiológicas

Departamento de Botânica
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
1998

MARIA SUSANA JORGE PEREIRA
Assistente de Botânica da Faculdade de Ciências
Universidade do Porto

ISOFORMAS DA GLUTAMINA SINTETASE EM *Solanum tuberosum* L.

Localização da expressão, caracterização bioquímica e molecular e papel das isoenzimas na eficiência de utilização de azoto em diferentes situações fisiológicas

Dissertação submetida à Faculdade de Ciências da
Universidade do Porto para obtenção do grau de Doutor
(nº 1 do Art. 8º do Decreto-Lei 388/70, de 18 de Agosto)

Orientador - Prof. Doutor R. Salema, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto
Co-orientador - Prof. Doutor Cláudio Sunkel, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto. (Art. 4º - D.L. 388/70)

PORTO
1998

Este trabalho foi parcialmente subsidiado pela
Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica

Ao abrigo do disposto no nº 2 do Artigo 8º do Decreto-Lei 388/70 foram utilizados, na elaboração desta dissertação, resultados incluídos nos seguintes artigos:

Pereira S, Carvalho H , Sunkel C, Salema R, 1992. Immunocytolocalization of glutamine synthetase in mesophyll and phloem of leaves of *Solanum tuberosum* L. *Protoplasma* 167: 66-73.

Carvalho H, Pereira S, Sunkel C, Salema R, 1992. Detection of a cytosolic glutamine synthetase in leaves of *Nicotiana tabacum* L. by immunocytochemical methods. *Plant Physiology* 100: 1591-1594.

Pereira S, Pissarra J, Sunkel C, Salema R, 1996. Tissue-specific distribution of glutamine synthetase in potato tubers. *Annals of Botany* 77: 429-432.

Pereira S, Carvalho H, Sunkel C, Salema R, 1993. Glutamine sinthetase in etiolated and greening leaves of *Solanum tuberosum* L. Anais da Faculdade de Ciências, U.P. (em publicação).

e nas seguintes comunicações:

Carvalho H, Pereira S, Sunkel C, Salema R, 1990. Immunocytolocalization of glutamine synthetase in green leaves and callus tissue of *Solanum tuberosum* L. XXV Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Microscopia Electrónica, Porto.

Carvalho H, Pereira S, Sunkel C, Salema R, 1991. Cell-specific localization of chloroplast and cytosolic glutamine synthetase isoforms in leaves of *Solanum tuberosum* L. Colóquio Franco-Ibérico de Microscopia Electrónica, Barcelona.

Pereira S, Carvalho H, Sunkel C, Salema R, 1991.Characterization of glutamine synthetase from *S. tuberosum* leaves. "IV Portuguese-Spanish Bichemistry Congress", Póvoa de Varzim.

Carvalho H, Pereira S, Sunkel C, Salema R, 1992. Distribution of GS isoforms in leaves of *Nicotiana tabacum* L. 8th Congress of The Federation of European Societies of Plant Phisiology, Antwerpen. *Physiologia Plantarum* 85(3) Part 2: A38.

Pereira S, Carvalho H, Sunkel C, Salema R, 1993. Glutamina sintetase em *Solanum tuberosum* L.: localização em folhas estioladas e após reverdecimento. Jornadas de estrutura, metabolismo e desenvolvimento em plantas. Sociedade Portuguesa de Bioquímica, Centro de Citologia Experimental da U.P., Porto.

Pereira S, Sunkel C, Salema R, 1993. Glutamina sintetase em orgãos não verdes de *Solanum tuberosum* LXXVIII Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Microscopia Electrónica e Biologia Celular, Instituto Gulbenkian de Ciências, Oeiras.

Pereira S, Fernandes C, Pinto D, Figueira O, Paiva S, Salema R, 1994. Significance of glutamine synthetase in *Solanum tuberosum* L. tubers. 9th Congress of The Federation of European Societies of Plant Phisiology, Brno, Czech Republic. *Biologia Plantarum* 36 (supp): S218 (Abs).

Pereira S, Salema R, 1995. Glutamina sintetase em folha de batateira em condições de carência de azoto. IV Congresso Luso-Espanhol de Fisiologia Vegetal, Estoril.

Pereira S, Pissarra J, Salema R, 1996. Nitrogen stress induces marked alterations in glutamine synthetase in potato leaves. The 2nd Colmar Symposium for Biological Sciences - Plant Biology, Colmar-France, 2-3 May; Programme-Abstracts, p. 69.

Teixeira A J, Pereira S, Sunkel C, Salema R, 1996. Isolation and characterization of glutamine synthetase-related cDNA sequences from *Solanum tuberosum* L.; XXXI Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Microscopia Electrónica e Biologia Celular, Oeiras, 7-8 Outubro; Cell and Molecular Biology '96, pag 8.

Pereira S, Teixeira A J, Pissarra J, Sunkel C, Salema R, 1996. Isolation of glutamine synthetase cDNA sequences from *Solanum tuberosum* L. and expression of this enzyme in different organs of the plant. X Congresso Nacional de Bioquímica, Universidade do Minho, Braga, 31 de Outubro - 2 de Novembro; Programa e Resumos, P3-19.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Roberto Salema pelo apoio, estímulo e orientação prestados no desenvolvimento deste trabalho. Gostaria de agradecer particularmente seus ensinamentos como Professor e Investigador e a disponibilidade sempre demonstrada para ouvir e aconselhar, atendendo não só aos aspectos de trabalho, mas à Pessoa, o que motivou além de uma grande admiração, uma sincera estima. O Professor Roberto Salema sempre proporcionou a oportunidade para explorar novos caminhos e sempre procurou apoiar, mesmo em circunstâncias menos favoráveis, a continuidade do trabalho de investigação. A sua influência, e as ideias que sempre procurou transmitir de rigor e qualidade, na Investigação como na Docência, o espírito de equilíbrio e consenso que sempre procurou incentivar dentro do grupo que dirige, foram determinantes na formação de todos os que estão sob a sua supervisão.

Ao Professor Doutor Cláudio Sunkel, a oportunidade que proporcionou para a realização de parte deste trabalho, disponibilizando o Laboratório de Genética Molecular e as condições necessárias à aprendizagem e execução das técnicas de Biologia Molecular, abrindo assim as portas para a exploração de novos caminhos na investigação ligada à Biologia Vegetal.

À Professora Doutora Isabel Santos que, como Professora de Fisiologia Vegetal e de Seminário da Licenciatura em Biologia, influenciou o gosto pela Fisiologia Vegetal, e cuja tenacidade e determinação são um exemplo para quantos trabalham nesta área.

À Direcção do Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto e à Comissão Directiva do Instituto de Botânica "Dr. Gonçalo Sampaio" pelas facilidades e apoios concedidos.

A todos os colegas e investigadores do Departamento de Botânica pelo apoio e amizade que demonstraram ao longo destes anos de convivência.

A todos os colegas e investigadores do Laboratório de Genética Molecular, pela disponibilidade constante e pelas sugestões e ensinamentos oportunos.

A todos quantos trabalham no Centro de Citologia Experimental, muito particularmente à D. Andrea Costa pela paciência inesgotável e proficiência demonstrada no processamento fotográfico e à D. Isabel Guimarães, pelo apoio na manutenção das plantas e de culturas de tecidos. A ambas queria agradecer a disponibilidade e amizade que sempre demonstraram.

À minha Família, Amigos e especialmente ao meu Marido pela ajuda, estímulo e paciência nunca sonegados.

RESUMO

O azoto é um constituinte primordial de compostos essenciais à estrutura e função de todos os seres vivos. A incorporação de azoto inorgânico em compostos orgânicos, particularmente aminoácidos e proteínas, depende quase exclusivamente das plantas. A enzima glutamina sintetase (GS) representa aparentemente a única via, utilizada pelas plantas superiores, para a conversão de azoto inorgânico em compostos azotados, sendo considerada uma enzima-chave no metabolismo do azoto; esta enzima intervem, ainda, na reassimilação da amónia libertada em várias vias metabólicas na planta. Nas plantas, a GS existe sob a forma de múltiplas isoenzimas codificadas por uma família de genes nucleares que são diferencialmente expressos em diferentes tecidos e órgãos. O significado fisiológico desta expressão diferencial não está bem estabelecido mas pensa-se que existe, a nível genético, uma regulação da expressão em resposta a variáveis ambientais (por exemplo, luz, suprimento de compostos azotados) ou a necessidades específicas da planta em diferentes órgãos e estados de desenvolvimento e deste controlo resultaria uma eficiência máxima na economia de utilização de azoto pela planta.

Neste trabalho procedeu-se à localização da expressão, caracterização bioquímica e molecular e estudo do papel das isoenzimas da glutamina sintetase (GS) na eficiência de utilização de azoto em diferentes situações fisiológicas na batateira (*Solanum tuberosum* L.). A batateira é uma planta de interesse económico, onde ocorrem processos de interconversão metabólica de compostos azotados em diversas fases de desenvolvimento.

Na maioria das plantas superiores foram identificadas duas isoformas principais da GS, a GS1 localizada no citosol e a GS2 localizada nos cloroplastos. Nas folhas de várias Solanaceae apenas a GS2 tinha sido detectada. Contudo, neste trabalho, foram detectadas as duas isoformas da GS (citosólica e cloroplastidial) em folhas de batateira por várias técnicas nomeadamente "Western blotting", cromatografia de troca iónica e técnicas *in situ* que são particularmente sensíveis, como "tissue printing" e imunocitoquímica ultraestrutural.

A análise do padrão de polipeptídeos da GS permitiu concluir que as duas isoformas são diferencialmente expressas nos vários órgãos e tecidos da batateira sendo a GS cloroplastidial mais abundante nas folhas verdes. A GS1 predominava no tecido caloso e era a única forma detectada em tubérculos, raízes e brolhos. O padrão característico da quantidade relativa das duas isoformas da GS nas folhas podia ser invertido em situações particulares de desenvolvimento e nutrição.

Técnicas de imunocitoquímica ultraestrutural revelaram uma especificidade de localização das duas isoformas, GS1 e GS2, em tecidos da folha, aparecendo a GS2 nos cloroplastos das células do mesófilo e a GS1 no citosol de células de companhia do floema. Esta distribuição era semelhante em folhas de outras Solanaceae, como tabaco e tomateiro, e de girassol (Asteraceae). A localização da GS em tecidos e células específicos na folha destas plantas foi determinante para esclarecer os papéis fisiológicos desempenhados por estas isoformas no metabolismo do azoto e caracterizar metabolicamente o floema, e particularmente o floema interno, presente nas Solanaceae, como local de síntese de glutamina para transporte na planta.

A expressão de transcritos da GS em células de companhia do floema foi confirmada por hibridização *in situ* utilizando como sondas específicas sequências de cDNA de GS de batateira.

A localização da GS foi ainda estudada em diferentes tipos de células em folhas de plantas estioladas e em reverdecimento, em tecido caloso, em tubérculos e em microtubérculos *in vitro*.

A localização da GS1 nos tecidos vasculares sugeria que estaria envolvida na remobilização de compostos azotados e síntese de glutamina para transporte. Neste contexto, foi estudada a actividade e expressão das isoenzimas da GS em situações que envolvessem alterações na necessidade de remobilização de azoto da planta nomeadamente i) em diferentes graus de desenvolvimento de plantas submetidas a carência de azoto e ii) durante o abrolhamento dos tubérculos. Os resultados demonstraram que a carência de azoto afectava diferencialmente as duas isoformas nas folhas, levando a uma diminuição dos níveis de GS2 e uma manutenção ou aumento dos níveis de GS1, reforçando, assim, o papel importante desta isoforma na remobilização das reservas azotadas, particularmente em resposta a situações ambientais adversas, como carência de azoto.

Os níveis de GS aumentavam nos tubérculos nas fases iniciais de abrolhamento diminuindo após a plantação e desenvolvimento da planta. Contudo, a GS mantinha-se mais tempo activa no tubérculo após a plantação, se não fosse fornecida solução nutritiva à planta.

No seu conjunto, os resultados reforçaram a conclusão de que a GS citosólica, localizada em tecidos vasculares, pode estar envolvida na remobilização das reservas azotadas, respondendo a necessidades acrescidas de mobilização para órgãos em crescimento, particularmente em situações de carência de azoto.

No tubérculo, a GS localizava-se em dois tipos de tecidos, reflectindo possivelmente o envolvimento de uma, ou possivelmente mais formas da GS1, em diferentes vias de metabolismo do azoto: no floema interno onde possivelmente está envolvida na síntese de glutamina para transporte para as zonas de crescimento e tecidos meristemáticos, como os ápices dos brolhos, ou gomos dos "olhos", onde está possivelmente envolvida na utilização de azoto para síntese proteica. Em tubérculos em abrolhamento os transcritos da GS localizavam-se essencialmente nas zonas de crescimento onde ocorre síntese proteica intensa.

A fim de caracterizar a família de genes da GS em batateira e estudar a sua expressão, de modo a conhecer a sua implicação em diferentes processos fisiológicos, foi construída uma biblioteca de cDNA de folha, a partir da qual foram isolados e caracterizados dois clones de cDNA que codificam a subunidade cloroplastidial da GS, correspondendo ao gene *Gln*2. Estes clones foram utilizados como sondas específicas em análises do DNA genómico por "Southern blotting" e análise de transcritos da GS por "Northern blotting". Clones de cDNA de GS foram também isolados de uma biblioteca de cDNA de tubérculo permitindo no futuro estudar a expressão dos genes correspondentes em tecidos e condições fisiológicas específicas.

ABSTRACT

The assimilation of inorganic nitrogen into organic compounds particularly aminoacids and proteins depends largely on higher plants. The enzyme glutamine synthetase occupies a key position in the nitrogen metabolism of higher plants since all inorganic nitrogen sources are reduced to ammonium and assimilated by this enzyme. In addition GS also assimilates ammonium released from various metabolic reactions. Multiple isoforms of GS are encoded by a small family of highly conserved genes which are differentially expressed in various organs and are regulated differently by cell type, light and metabolites.

Two major isoforms located in the cytosol (GS1) or chloroplast (GS2) have been identified in most plant species, but for several Solanaceae it has been reported the presence of the chloroplast form.

In this work, the GS isoforms of *Solanum tuberosum* L. were characterized by biochemical and molecular techniques and localized in different tissues and organs of the plant, and the effect of various environmental and developmental conditions on GS isoforms was approached.

Two isoforms of GS (cytosolic and chloroplastic) have been detected in *S. tuberosum* leaves by means of Western blotting, ion-exchange chromatography, and very sensitive *in situ* techniques such as tissue-printing and immunoelectron microscopy. Western blotting analysis revealed that GS2 was the predominant form in the leaves while GS1 was most abundant in callus tissue and the only isoform detected in tubers, sprouts and roots. The pattern of GS polypeptides in the leaves could be inverted in different environmental and developmental conditions.

By immunogold electron-microscopy GS was detected in the chloroplasts of mesophyll cells and in the cytoplasm of phloem companion cells, revealing a differential localization of GS1 and GS2 in distinct leaf tissues. This differential localization was also observed in leaves of the Solanaceae tobacco and tomato, and in sunflower (*Helianthus annuus*) a non Solanaceae species. The transcription of GS genes was also detected in phloem companion cells of potato leaves by *in situ* hybridization with cDNA probes specific for GS of potato.

GS protein was also localized in callus tissue of *S. tuberosum* and *H. annuus* and in etiolated and greening leaves of *S. tuberosum*, in tubers and in "micro-tubers" produced *in vitro*.

The specificity of the GS2 and GS1 distribution implicated different physiological roles and an important one could be assigned to the phloem, particular the internal phloem of Solanaceae in the synthesis and transport of glutamine. The localization of GS1 in vascular bundles supported the notion that this GS isoenzyme plays a role in the remobilization of nitrogen and in generating glutamine for intercellular nitrogen transport. This notion fostered the study of GS isoforms as affected by different environmental and developmental conditions namely limited nitrogen supply and sprouting of tubers, when the need for remobilization of stored nitrogen for growth and reproduction is increased. In N-deficient plants GS2 was negatively affected whereas GS1 was less affected or even showed an increased level of protein.

In tubers the levels of GS increased in the onset of sprouting decreasing a few weeks after planting, although this decrease was slowed in N-deficient plants.

Together, this results supported the assertion that one (or more) vascular located cytosolic form of GS could be implicated in the remobilization of nitrogen and translocation for growing parts of the plant and it could play an important role in the response to nitrogen-stress conditions.

By immunological tissue printing GS was localized mainly in the internal phloem of tubers being also present in the basal region of sprouts and in meristematic areas such as buds and sprout apices suggesting that one or more forms of GS1 could be implicated in different nitrogen pathways. The localization of GS in the internal phloem agrees with the proposed role of this enzyme in the mobilization of tuber reserves and production of glutamine for transport for the growing parts of the plant; GS localization in primary meristematic areas suggested an involvement in the utilization of nitrogen in these actively growing areas for protein synthesis. GS transcripts were localized mainly at the periphery of tubers in the sproutig regions and sprout apices supporting the suggestion that GS gene expression could take place in this external, bud-containing tissues, were GS could be involved related to the production of aminoacids for protein synthesis.

Molecular approaches were used in order to characterize the GS gene family and their patterns of expression in order to address whether specific GS genes are expressed to meet specific physiological requirements. A cDNA library from *S. tuberosum* leaves was constructed and two cDNA clones were isolated. Sequencing analysis revealed that both clones are likely to encode for chloroplastic GS and correspond to the GS gene *Gln*2. These cDNA clones were used as specific probes in Southern analysis of genomic DNA and detection of GS transcripts in Northern blots.

cDNA clones encoding sequences related to GS were also isolated from a tuber cDNA library allowing the study of the expression of the corresponding genes in potato organs in specific physiological situations.

RESUMÉ

Chez les plantes, l'entrée principale d'azote a lieu grâce à l'assimilation de l'ammonium dans la matiére organique. La sytnthèse de glutamine, via glutamine sythétase (GS), constitue la voie majeure, et possiblement exclusive, de ce processus. Diverses reactions distrubutent l'azote de la glutamine à d'autres composés, incluant le transfert aux acides aminés et proteines. L'utilisation des formes de transport d'azote et aussi un nombre d'autres processus métaboliques impliquent la libération d'ammonium lequel doit être reassimilé par glutamine sythétase qui joue ansi un rôle trés important dans le métabolisme de l'azote. Chez les plantes supérieures des formes multiples de la glutamine synthétase on eté caractérisées et differents génes codent ces formes multiples de la GS qui s'expressent differenciellement dans différents organes de la plante.

Dans ce travail, on a cherché d'étudier les isoformes de la glutamine synthétase chez des plantes de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) aux niveaux physiologique, biochimique et moleculaire. La pomme de terre est très importante du point de vue ecónomique et plusieurs altérations du métabolisme de l'azote se vérifient dans ces organes ou cours de son cycle végetatif.

Chez les plantes supérieures la GS a eté identifié dans le cytoplasme (GS1) et dans les chloroplastes (GS2). Dans un groupe de plantes y compris les Solanaceae, la glutamine synthétase a eté localisée uniquement dans les chloroplastes. Cependent, dans ce travail, on a identifié une GS cytosolique et une GS chloroplastique dans les feuilles de la plante de pomme de terre en utilisant diverses techniques notamment "immunoblotting", la chromatographie d'exchange d'ions et techniques *in situ* comme "tissue printing" et localisation immunocyto-chimique.

Le "immunoblotting" a montré que les deux formes de la GS s'expressent differenciellement dans différents organes de la plante: la GS cytosolique est minoritaire dans les feuilles, alors qu' elle est le composant majeur dans le tissue calleux et est la seule forme detectable dans les tubercules, les racines et les germes.

La quantité rélative de les formes de la GS dans les feuilles pouvait être affecté par des conditions physiologiques particulières.

La localisation immunocytochimique a permis de vérifier que les formes GS1 et GS2 présentent une distribution différentielle dans les tissus foliaires: la GS2 etait localisée dans les chloroplastes des cellulues du mésophylle, alors que la GS1 etait localisée dans le cytoplasme des cellules du phloème. La distribution de la GS été pareille dans les tissus foliares d'autres solanacées comme le tabac et la tomate et encore le tournesol qui n'est pas une solanacée.

Cette localisation spécifique des deux formes de la GS dans la feuille, a été determinant pour comprendre les rôles possibles de ces formes de la GS dans le metabolisme de l'azote et caractériser metaboliquement le phloème, particulièrement le phloème interne des solanacées comme le site de synthèse et translocation de glutamine pour le transport d'azote dans la plante.

On a localisé, aussi des ARNm de GS dans des cellules de companhie du phloème avec des sondes specifiques de ADNc.

La localization de la GS a eté etudiée aussi dans les feullies des plantes grandies sous des conditiond d'obscurité et après l'exposition à la lumière, et aussi dans le tissue calleux, dans les tubercules et microtubercules produits *in vitro*.

La localisation de la GS1 dans les tissus vasculaires correspond bien avec un rôle possible de la GS dans la production de glutamine pour le transport vers les sites de croissance. Des études d'activité enzymatique et de détection imunochimique de les formes de la GS ont eté realizés en des conditions que entainaient une mobilization accelerée des reserves azotées notamment dans des plantes soumises à des conditions de carence d'azote et pendant la germination des tubercules.

Les résultats on montré que dans les plantes grandies sous des conditions de carence d'azote, les niveaux de GS1 n'étaient pas affectés au étaient même augmentés pendent que les nivaux de GS2 étaient affectés d'une façon négative.

On a verifié que les nivaux de GS1 aumengtaient dans les tubercules au debut de la germination et diminuaient progressivement avec le development de partie aérienne de la plante. Cependant, les nivaux de GS1 diminuaient plus lentement dans les tubercules des plantes gradies en absence d'azote dans la solution nutritive.

Ces resultats suggéraient que la GS1, possiblement celle localisée dans les tissus vasculaires, pouvait être impliquée dans la remobilization des reserves azoteés et syhtèse de formes de transport d'azote vers les sites de croissance et jouait possiblement un rôle particulièrement important dans les plantes soumises à des conditions de carence de azote.

Dans le tubercule la GS etait localisée dans le phloème interne et aussi en tissus méristematiques notamment dans les bourgeons e dans l'apex des germes. Cette localisation différentielle pouvait être relationée avec differents voies du metabolisme de l'azote. Dans les tubercules en germination on a localisé de l' ARNm de GS dans les sites de croissance comme les bourgeons oú l'azote des differents composés est utilisé dans la syntèse de protéines.

Pour caractériser la famille de génes codant les différentes formes de la GS une banque de ADNc de feuille a eté construite et le criblage de cette banque a permis de isoler et analyser des clones de ADNc codant la GS chloroplastique correspondant au gène *Gln*2. Ces clones ont été utilisées pour des analyses "Southern" de l'ADN génomique et analyse des ARNm de GS par "Northern blotting". Des clones de ADNc de GS ont eté isolés aussi par le criblage d'une banque de ADNc de tubercule. Ces résultats ouvrent la prespective d'une étude structural et biochimique de la protéine codée par les génes isolées et la détermination de son possible rôle dans des différentes voies du metabolisme de l'azote dans la plante.

ÍNDICE

ABREVIATURAS 1

INTRODUÇÃO 2
A ASSIMILAÇÃO DO AZOTO 3
Glutamina sintetase 5
Metabolismo da glutamina 7
Compostos de transporte de azoto 8
A formação da amónia 8
ISOENZIMAS DA GS 11
Localização das isoenzimas da GS nas plantas superiores 11
As isoenzimas da GS 11
Estudos de localização da GS por técnicas bioquímicas 12
As isoformas da GS e a sua localização 13
Localização da GS por técnicas de imunocitoquímica 15
- Folhas 15
- Nódulos 16
- Raízes 16
Estrutura das isoenzimas da GS 17
Base genética para a existência de isoenzimas 18
Localização da expressão individual de genes da GS através de fusões de promotores com o gene marcador GUS 19
Significado das isoenzimas da GS 21
Estudos em mutantes 21
Estudos moleculares 22
GS2 23
GS1 24
Níveis de regulação da GS 25
Parâmetros que afectam a GS 26
Luz 26
Azoto 27
Compostos adicionados exogenamente 28
"Stress" biótico e abiótico 29
A BATATEIRA 29
Parte aérea da planta 30
Parte subterrânea 31
O tubérculo 31
Morfologia do tubérculo 31
Anatomia do tubérculo 32
- Periderme 33
- Córtex 33
- Anel vascular 33
- Zona perimedular e medula 34
Desenvolvimento da batateira 35
Fases do ciclo de vida da planta 35
Zonas de crescimento da batateira 36
A transição "recebedor"-"fonte" 36
TÉCNICAS IN SITU PARA LOCALIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ENZIMAS NAS PLANTAS 39
Localização de proteínas nas plantas através de imunocitoquímica ultraestrutural 40
Anticorpos 41
Preparação da amostra 43
- Fixação 43
- Impregnação 45
Reacção imunológica em cortes de material impregnado 46
Detecção 47
- O ouro coloidal 47
- Nanogold 48

Controlos 49
Imunolocalização de proteínas e de RNA em impressões de tecido vegetais em membranas ("Tissue printing") 49
OBJECTIVOS 50

MATERIAL E MÉTODOS 53
Material vegetal e condições de cultura 54
Soluções nutritivas 54
Extracção da enzima e cromatografia de troca iónica 55
Extracção da enzima 55
Cromatografia de troca iónica 56
Extracção da enzima para determinação da actividade enzimática e análise electroforética . 56
Determinação da quantidade de proteínas solúveis presentes nos extractos 56
Determinação da actividade enzimática 56
Isolamento de cloroplastos e obtenção dos extractos cloroplastidiais 57
Electroforese em condições não desnaturantes 57
Obtenção de extractos 57
Preparação do gel 58
Determinação da actividade da GS em gel não desnaturante 58
Transferência de proteínas de gel não desnaturante para membrana de nitrocelulose 58
Focagem isoeléctrica em gel de poliacrilamida em camada fina 59
Transferência de proteínas de gel em camada fina para membrana de nitrocelulose 59
Focagem isoeléctrica em gel vertical de poliacrilamida 59
Transferência de proteínas após focagem isoeléctrica 60
Electroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 60
Coloração com azul de Coomassie R-250 de geles de poliacrilamida com SDS e de geles nativos após detecção da actividade 61
Electrotransferência das proteínas separadas por SDS-PAGE para nitrocelulose 61
Anticorpos utilizados na detecção da GS 61
Imunodetecção da GS em membranas de nitrocelulose ("Western blotting") 61
Detecção imunológica da GS em impressões de tecidos em nitrocelulose ("Tissue printing") 62
Imunocitoquímica ultraestrutural 62
Fixação 62
Desidratação e impregnação 63
Marcação imunocitoquímica de cortes ultrafinos 63
Contrastação 64
Microscopia óptica 64
Obtenção de microtubérculos *in vitro* 64
Electroforese de DNA e de RNA em gel de agarose 65
Quantificação de ácidos nucleicos 65
Extracção de RNA de folha 65
Extracção de RNA de tubérculo 66
Determinação da qualidade de RNA 66
Isolamento de mRNA (poli(A)$^+$) 66
Síntese de cDNA 67
Síntese da primeira cadeia de cDNA 67
Síntese da segunda cadeia de cDNA 68
Avaliação da eficiência da síntese das cadeias de cDNA 68
Avaliação da incorporação de nucleótidos por precipitação com TCA 68
Análise do cDNA por electroforese em gel de agarose 69
Ligação dos adaptadores de *Eco*RI ao cDNA 70
Ligação do cDNA ao vector 71
Empacotamento *in vitro* e propagação em *Escherichia coli* 71
Amplificação da biblioteca 73
Verificação da especificidade dos anticorpos anti-GS para rastreio da biblioteca 74
Obtenção da sonda específica de cDNA de GS para rastreio da biblioteca 74
Desenho dos iniciadores e amplificação do cDNA por PCR 74

Clonagem dos produtos de PCR....75
Transformação de estirpes de *Escherichia coli* 76
Certificação do produto de PCR e do cDNA clonado....77
"Southern blotting" do produto de PCR....77
Rastreio das clónias contendo plasmídeo recombinante....77
Minipreparação de DNA plasmídico e sequenciação 78
Rastreio da biblioteca com sonda radioactiva....79
Preparação de lisado de fago....80
"Dot blotting" de lisado de fago....80
Amplificação do fragmento de inserção por PCR....80
Preparação de DNA de fago 81
Excisão do fragmento de inserção do fago....82
Subclonagem do cDNA isolado de fago em plasmídeo pBluescript SKII....82
Subclonagem do cDNA isolado de fago em plasmídeo pGEM11f(+)....83
Sequenciação 83
Extracção de DNA genómico....84
"Southern blotting" do DNA genómico 84
"Northern blotting" 85
Hibridização *in situ* para microscopia electrónica....85
"Northern tissue printing"....86

RESULTADOS....87
CARACTERIZAÇÃO E LOCALIZAÇÃO DA GS EM FOLHA E TECIDO CALOSO DE *S. TUBEROSUM*....88
Polipeptídeos da GS....88
Separação das isoenzimas da GS por cromatografia de troca iónica....90
Detecção da GS nativa em gel não desnaturante 91
Focagem isoeléctrica 94
Localização da GS por impressão de tecidos em nitrocelulose ("tissue printing") e por imunocitoquímica....96
Localização da GS por "tissue printing"....96
Localização da GS por imunocitoquímica ultraestrutural.... 101
- Apuramento da técnica.... 101
- Localização da GS em folha de batateira.... 102
- Localização da GS em tecido caloso de batateira 106
Localização das isoformas da GS em folhas estioladas e em reverdecimento 112
ISOFORMAS DA GS EM FOLHAS DE OUTRAS SOLANACEAE.... 117
Tabaco 117
Tomateiro.... 118
LOCALIZAÇÃO DA GS EM FOLHAS E TECIDO CALOSO DE UMA NÃO SOLANACEAE (GIRASSOL).... 120
INFLUÊNCIA DA CARÊNCIA DE AZOTO NA ACTIVIDADE E PADRÃO DAS ISOFORMAS DA GS EM FOLHAS DE BATATEIRA.... 120
Actividade da GS 124
Proteínas solúveis 124
Análise das subunidades da GS.... 126
Análise por SDS-PAGE de polipeptídeos solúveis e da RuBisCO 128
Imunocitoquímica.... 128
ESTUDO DA GS EM ORGÃOS NÃO VERDES DE BATATEIRA.... 130
Detecção de polipeptídeos da GS em extractos de órgãos não verdes.... 130
Alterações da GS em tubérculos durante o abrolhamento e desenvolvimento da planta130
Com fornecimento de solução nutritiva.... 130
Sem fornecimento de solução nutritiva.... 134
Localização da GS nos tecidos de tubérculo e brolho 135
Distribuição da GS em tecidos de tubérculo dormente e de tubérculo em grau avançado de abrolhamento.... 137
Localização da GS em células de tecido vascular de tubérculo por imunocitoquímica ultraestrutural.... 140
Ensaios de retenção de antigenicidade da GS após fixação 140

Imunocitoquímica 141
Produção de tubérculos *in vitro* para posteriores estudos da GS 141
CONSTRUÇÃO E RASTREIO DE UMA BIBLIOTECA DE cDNA DE FOLHA DE BATATEIRA EM LAMBDA gt11 *Sfi-Not* 145
Extracção de RNA de folha 145
Isolamento de mRNA 146
Síntese e clonagem de cDNA 146
Empacotamento do fago e obtenção de bibliotecas 149
Amplificação da Biblioteca 1 152
Rastreio da biblioteca 152
Obtenção de sonda homóloga de cDNA de GS através de PCR 153
Desenho dos iniciadores 153
Clonagem dos produtos de PCR 155
Certificação do cDNA clonado 155
Rastreio da biblioteca de cDNA de folha 157
Isolamento e caracterização do fago λ14.A.1.2 157
Isolamento e caracterização do fago λJ9.A12.2 159
Sequenciação dos clones de cDNA de GS e análise de homologias 161
Análise da sequência de nucleotídeos 162
Análise da sequência de aminoácidos 168
ANÁLISE DO DNA GENÓMICO POR "SOUTHERN BLOTTING" 173
ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE mRNA DE GS EM ÓRGÃOS DE BATATEIRA 175
Análise de mRNA de GS por "Northern blotting" 175
Localização de transcritos da GS em folha por hibridização *in situ* a nível ultraestrutural 175
Localização de mRNA de GS em tecidos de tubérculo por "Northern tissue printing" 177
RASTREIO DE UMA BIBLIOTECA DE cDNA DE TUBÉRCULO CONSTRUÍDA EM FAGO LAMBDA ZAPII 177

DISCUSSÃO 180
A detecção de isoformas da GS em batateira e outras Solanaceae 181
Caracterização do padrão de isoformas da GS nos vários órgãos da batateira 182
Análise dos polipeptídeos da GS 183
Separação das actividades da GS1 e da GS2 184
Localização da GS em folhas de batateira e de outras plantas 186
Importância dos presentes resultados no esclarecimanto dos papeis das isoformas da GS no metabolismo do azoto 187
Confirmação de que existe expressão de genes da GS e acumulação de mRNA em células de companhia do floema 188
Contribuição para a caracterização funcional do floema interno 188
Caracterização metabólica das células de companhia 189
Comparação com a localização da GS em folhas de não Solanaceae 190
Modelo de expressão da GS citosólica nas folhas 191
- O modelo proposto 192
Localização da GS no tecido caloso 193
Estudo da localização das isoformas da GS em folhas estioladas e em reverdecimento .. 194
Presença da GS em estioplastos e na transição para cloroplastos com a exposição à luz 195
A presença da GS2 em estioplastos 196
A localização da GS1 em folhas estioladas 196
Relação dos resultados com o modelo proposto 197
A presença da GS em vários tipos de células 198
Expressão da GS em folhas de batateira submetida a carência de azoto 198
Carência de azoto e senescência foliar 200
O envolvimento da GS1 na senescência 201
Actividade global da GS 202
Resposta da GS2 203
GS1 e a localização no floema 203
Genes da GS induzidos pela senescência 204

Importância da GS1 no programa de recuperação de azoto armazenado 205
Relação entre as citocininas e a senescência em condiçõres de carência de azoto exógeno 205
Questões em aberto 207
GS e "stress" 208
Alterações na GS do tubérculo durante o abrolhamento 208
Localização da GS em tubérculos e brolhos 212
Papel do floema interno 213
A GS e os fluxos de azoto durante o abrolhamento 214
Distribuição da GS em tubérculos dormentes e tubérculos em avançado estado de abrolhamento 216
Localização da GS em tecido vascular de tubérculo por imunocitoquímica ultraestrutural 217
Construção de uma biblioteca de cDNA de folha de batateira em Lambda gt11 *Sfi-Not* . 217
Os clones isolados 219
Significado das homologias observadas 219
Estratégia para obtenção de clones completos a 5' 221
Estratégia para isolar o cDNA de GS1 de folha 222
Análise do DNA genómico por "Souther blotting" 222
Análise da acumulção de transcritos da GS em órgãos de batateira por "Northern blotting" e por técnicas *in situ* 223
Análise de transcritos da GS em órgãos de batateira por "Northern blotting" 223
Localização de transcritos da GS em tecido de tubérculo por "Northern tissue printing" 223
Localização de transcritos da GS em tecidos vasculares de folha por hibridização *in situ* 224
Abordagens futuras: a detecção de proteínas por marcação de epítopos ("epitoppe tagging") 226
Manipulação da expressão da GS 226
A importância da GS2 na protecção das plantas contra a fotooxidação 226
A importância da GS1 227

CONCLUSÕES 228

APÊNDICES 236
APÊNDICE 1: MEIOS DE CULTURA, ESTIRPES BACTERIANAS E VECTORES 237
1.1 Meios de cultura utilizados para crescimento de bactérias e de bacteriófagos 237
1.2 Estirpes de *E. coli* utilizadas 238
1.3 Vectores utilizados 241
APÊNDICE 2: BANCOS DE DADOS DE SEQUÊNCIAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS E PROTEÍNAS. BUSCA DE HOMOLOGIAS. OBTENÇÃO DE INFORMAÇÃO RELATIVA ÀS SEQUÊNCIAS CONTIDAS NOS BANCOS DE DADOS 247
2.1 Chave das abreviaturas de aminoácidos 247
2.2 Bancos de dados de sequências de ácidos nucleicos e proteinas 247
2.3 BLAST 248
2.4 Obtenção de sequências contidas nos bancos de dados e outras informações através de ENTREZ 254
2.5 O algorítmo FASTA 255
2.6 Sequências de GS obtidas pelo programa FASTA, por comparação com a sequência 14.A.1.2 256

BIBLIOGRAFIA 262

ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
APS	Persulfato de amónio
AS	Asparagina sintetase
ATP	Adenosina trifosfato
BAP	Benzilaminopurina
BSA	Albumina sérica bovina
CCC	Cloreto de clorocolina
cDNA	DNA complementar
CTAB	hexadeciltrimetilamónio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
GDH	Glutamato desidrogenase
GOGAT	Glutamato sintase
GS	Glutamina sintetase
GUS	ß-glucuronidase
IEF	Focagem isoeléctrica
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Isopropiltio-ß-D-galactosídeo
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propanesulfónico
mRNA	RNA mensageiro
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
Na_2EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético (sal dissódico)
NiR	Nitrito redutase
NP-40	Nonidet P-40
NR	Nitrato redutase
PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	("Polymerase chain reaction") reacção de polimerização em cadeia
PIPES	1,4-piperazina-bis (ácido etanosulfónico)
PMFS	Fenilmetilsulfonil fluoreto
PVP	Polivinilpirrolidona
RACE	("Rapid amplification of cDNA ends") amplificação rápida de extremidades de cDNA
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	("Polymerase chain reaction coupled reverse transcription") transcrição reversa acoplada a PCR)
RuBisCO	Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
Tricine	N-Tris (hidroximetil) metilglicina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-ß-D-galactosídeo

INTRODUÇÃO

A ASSIMILAÇÃO DO AZOTO

O azoto é o elemento limitante para a maioria das espécies vegetais. A aquisição e a assimilação de azoto é, a seguir à fotossíntese, o processo mais importante para o crescimento e desenvolvimento das plantas (Lea, 1993). Em termos de quantidade de biomassa nas plantas o azoto está em quarto lugar logo após C, O e H (Larcher, 1995). Existe uma correlação forte entre o fornecimento de azoto e o aumento de biomassa. A viabilidade das sementes e a germinação estão directamente relacionadas com o teor de azoto. A produção de alimento de alta qualidade e rico em proteínas está extremamente dependente da disponibilidade de azoto (Lea, 1993). O azoto é, assim, um nutriente crucial para as plantas e existe no ambiente sob várias formas inorgânicas. A assimilação de azoto inorgânico em estruturas de carbono tem efeitos marcados na produtividade vegetal, biomassa e produção de culturas de interesse económico (Lam et al, 1996).

A compreensão do modo como as plantas obtêm azoto do ambiente, o convertem numa forma orgânica e o transportam para os locais de crescimento rápido, é um problema fundamental da biologia vegetal.

Para a compreensão e eventualmente a optimização do metabolismo do azoto é necessário conhecer como as enzimas envolvidas na assimilação da amónia são reguladas, o que, por sua vez, necessita de um estudo fundamental sobre os genes que as codificam. Os estudos das enzimas envolvidas na assimilação do azoto têm um grande impacto tanto na investigação básica como aplicada (Lam et al, 1995). Estes estudos permitem esclarecer as via metabólicas e os mecanismos pelos quais as plantas regulam os genes envolvidos nessas vias. Por outro lado, como foi demonstrado que o azoto é o elemento limitante no crescimento das plantas (Larcher, 1995), poderá ser possível aumentar a produtividade ou a qualidade das culturas por manipulação molecular dos genes envolvidos na assimilação do azoto (Lam et al, 1995).

As plantas utilizam azoto inorgânico, sendo autotróficas relativamente ao azoto tal como relativamente ao carbono. No crescimento autotrófico das plantas a assimilação de azoto é o segundo maior fluxo metabólico a seguir à fixação de carbono (Joy, 1988). O azoto adquirido é incorporado em estruturas de carbono formando aminoácidos e amidas. Estes são compostos básicos para a síntese de proteínas, ácidos nucleicos e compostos azotados do metabolismo secundário. Todos estes compostos são essenciais para a produção de material celular. Assim, uma vez que o azoto é assimilado na matéria viva, é considerado um "bioelemento organogénico" (Larcher, 1995). O azoto é assim um constituinte de compostos comuns a todas as células vivas como aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos, mas também de outros composto particulares como clorofilas e poliaminas (Lea, 1993).

A maior parte dos animais não possui a capacidade de assimilar azoto inorgânico ou de sintetizar parte dos aminoácidos presentes nas proteínas, pelo que dependem do consumo de plantas para o fornecimento de azoto.

O azoto está presente na biosfera em várias formas. Na atmosfera, o azoto molecular (N_2) está presente em grande quantidade (78%) mas não pode ser directamente utilizado pelas plantas. As plantas adquirem o azoto principalmente do solo na forma de iões nitrato (NO_3^-) e amónio (NH_4^+). O ião amónio está presente em certos solos ácidos mas normalmente é rapidamente oxidado a nitrato pelas bactérias nitrificantes e assim o NO_3^- é a forma predominante de azoto disponível para as plantas no solo (Lea, 1993). Certas plantas, como por exemplo as leguminosas, podem obter amónia a partir do azoto atmosférico através da fixação de dinitrogénio por bactérias simbiontes, nos nódulos radiculares. De qualquer modo, nas plantas, todo o azoto inorgânico tem de ser reduzido a amónia (NH_4^+) antes antes de ser incorporado na forma orgânica (Lea, 1993).

Na maioria das plantas a aquisição de azoto inorgânico do exterior faz-se pela absorção de ião nitrato (NO_3^-) nas raízes (Joy, 1988). O nitrato é posteriormente reduzido a nitrito o qual é convertido em amónia (Fig. 1). Independentemente da fonte de azoto, somente a partir da amónia ocorre a "verdadeira assimilação", isto é, a conversão da amónia inorgânica em forma orgânica (Joy, 1988).

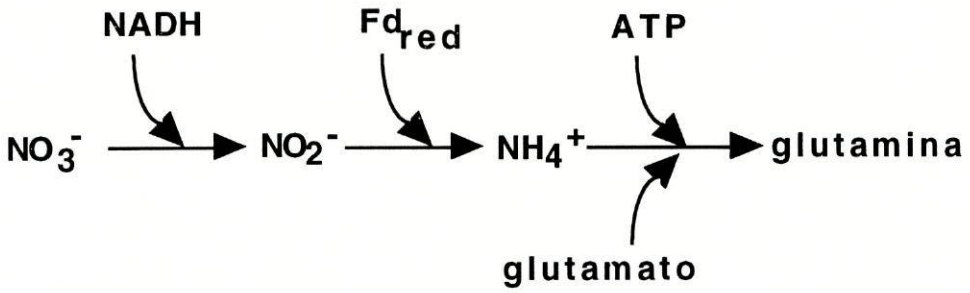


Fig.1. Reacções primárias na assimilação do nitrato. Fd_{red}, ferredoxina reduzida. Adaptado de Oaks (1994a).

A redução do nitrato a nitrito é catalisada pela enzima nitrato redutase (NR), que consiste num complexo enzimático presente no citosol. Como fonte de poder redutor pode usar $NADH_2$ proveniente da respiração ou, em células com cloroplastos, NADPH (Sechley, 1992). A nitrito redutase (NiR) é a enzima envolvida na redução de nitrito a NH_4^+. Esta enzima tem localização plastidial quer nas folhas quer nas raízes e utiliza ferredoxina como agente redutor (Sechley, 1992).

A redução e assimilação do azoto pode ocorrer nas raízes ou nas folhas (Joy, 1988). Tipicamente as leguminosas de climas temperados reduzem o NO_3^- nas raízes enquanto outras plantas, por exemplo os cereais, transferem grande parte do NO_3^- para os caules e folhas onde é reduzido (Sechley, 1992). O nitrato pode ser, assim, armazenado nos vacúolos ou transportado através do xilema mas a amónia, que é tóxica para a planta, tem de ser convertida numa forma orgânica. Em todas as plantas superiores a amónia é assimilada em glutamina numa reacção catalisada pela enzima glutamina sintetase (GS) (Lea et al, 1990). A conversão do azoto inorgânico numa forma orgânica para o transporte é crítica para o crescimento e

desenvolvimento da planta. Uma vez o azoto assimilado em glutamina, esta pode ser transportada e utilizada como dadora de azoto na biossíntese de essencialmente todos os aminoácidos, ácidos nucleicos e compostos azotados (Joy, 1988). A glutamina é essencial nos processos de assimilação, transporte e reassimilação de compostos azotados na planta de tal modo que se considera que este aminoácido ocupa um lugar-chave no fluxo de azoto na biosfera e que a GS representa no metabolismo do azoto um papel comparável ao da RuBisCO no metabolismo do carbono (Forde e Cullimore, 1989).

A glutamina sintetase

Inicialmente pensava-se que a conversão da amónia era catalisada pela enzima glutamato desidrogenase (GDH) (Joy, 1988) através da reacção

Alfa-cetoglutarato + NH_4^+ + NAD(P)H <---> glutamato + NAD(P) + H_2O

Contudo, esta enzima possui uma baixa afinidade para a amónia e estudos recentes sugerem que poderá estar envolvida no catabolismo do glutamato (Robinson et al, 1991).

A descrição das propriedades da enzima glutamina sintetase (GS), particularmente a sua elevada afinidade para a amónia, sugeriam um papel assimilatório desta enzima, sendo actualmente considerada praticamente a "única porta de entrada" da amónia em aminoácidos nas plantas superiores (Lea et al, 1990).

A GS catalisa a conversão dependente de ATP de glutamato em glutamina segundo a reacção (Miflin e Lea, 1976):

$$\text{L-glutamato} + NH_3 + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{L-glutamina} + \text{ADP} + \text{Pi}$$

Existem duas formas principais desta enzima: uma forma citosólica ocorrendo no citoplasma de células de folhas e órgãos não verdes e uma forma plastidial presente nos cloroplastos das folhas e nos plastídios das raízes (McNally e Hirel, 1983). Dado o seu papel central na assimilação de azoto, tem sido alvo de especial atenção. Embora fossem detectados níveis elevados de glutamina nos tecidos onde ocorria a assimilação da amónia, inicialmente não era claro como o azoto do grupo amida podia ser transferido para a posição alfa-amina para dar origem a aminoácidos. Este problema foi resolvido com a descoberta da enzima glutamato sintase (GOGAT) nas plantas (Lea e Miflin, 1974) que podia transferir o azoto do grupo amida da glutamina para a posição alfa-amina do 2-oxoglutarato (= alfa-cetoglutarato) originando duas moléculas de glutamato:

L-glutamina + 2-oxoglutarato + $2Fd_{red}$ (ou NADH) ----> 2L-glutamato + 2 Fed_{ox} (ou NAD)

O glutamato assim formado poderia ser utilizado quer como substrato para a GS, quer como dador de N para a síntese de aminoácidos e outros compostos azotados como alcalóides, ureídos e poliaminas (Lea,1993) (Fig. 2).

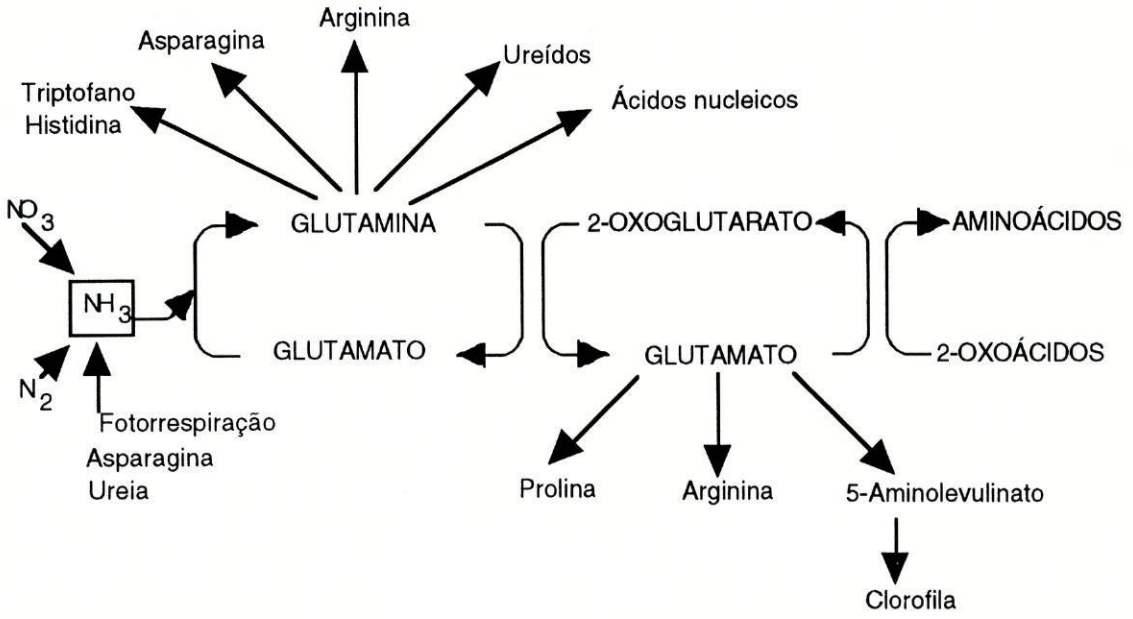


Fig. 2. Assimilação da amónia nas plantas superiores via ciclo glutamina sintetase/glutamato sintase. Adaptado de Lea (1993).

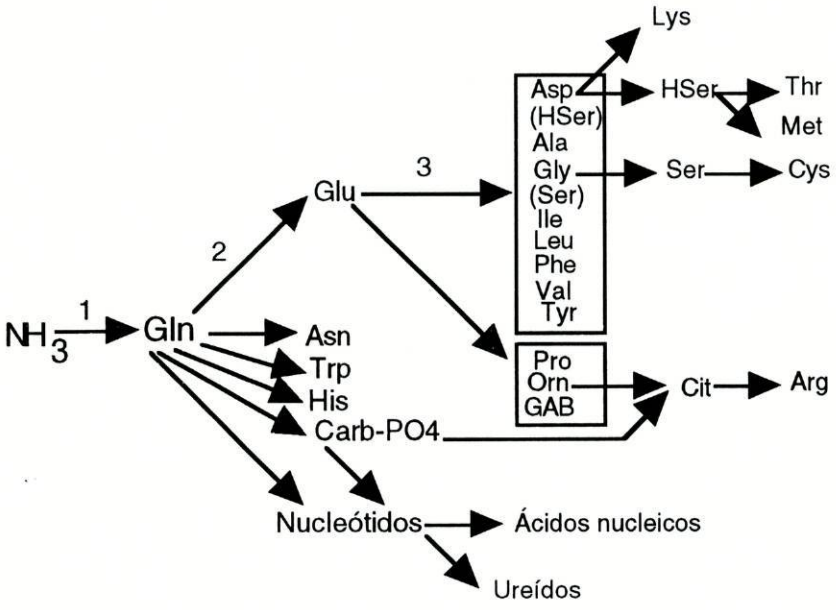


Fig. 3. Vias de assimilação da amónia e redistribuição de azoto a partir da glutamina. 1, glutamina sintetase; 2, glutamato sintase; 3, aminotransferases. Carb-PO4, carbamoíl-fosfato; GAB, ácido γ-aminobutírico; HSer, homoserina. Ala, alanina; Arg, arginina; Asn, asparagina; Asp, aspartato; Cit, citrulina; Cys, cisteína; Gln, glutamina; Glu, glutamato; Gly, glicina; His, histidina; Ile, isoleucina; Leu, leucina; Lys, lisina; Met, metionina; Orn, ornitina; Phe, fenilalanina; Pro, prolina; Ser, serina; Thr, treonina; Trp, triptofano; Tyr, tirosina; Val, valina. Adaptado de Joy (1988).

As reacções em que intervêm a GS e a GOGAT são colectivamente denominadas como o "ciclo GS/GOGAT" ou "via GS-GOGAT" que é actualmente considerada a via principal de assimilação primária de azoto (Miflin e Lea, 1980).

Os esqueletos de carbono necessários para a assimilação inicial de NH_4^+ são derivados dos ácidos tricarboxílicos alfa-cetoglutarato e oxaloacetato, e deste modo a assimilação de azoto está indissociavelmente relacionada com o metabolismo do carbono (Lea, 1993; Oaks, 1994).

Metabolismo da glutamina

Como já foi referido, a glutamina pode ser utilizada em várias reacções enzimáticas que permitem a transferência do azoto da glutamina para outros compostos (Joy, 1988). A glutamina pode ser utilizada como substrato em reacções de transamidação (por exemplo, pela GOGAT, asparagina sintetase (AS), carbamoíl-fosfato sintase (CPS) e 5-fosforribosil pirofosfato amidotransferase que está envolvida na síntese de ureídos) (Sechley, 1992). Nestas reacções o glutamato é regenerado. A glutamina pode ser utilizada na síntese de proteínas e pode ser, ainda, usada como composto de transporte de azoto e carbono para outras partes da planta (Fig. 3).

O glutamato é um importante dador de grupo amina e é substrato em reacções catalisadas por aminotransferases. As aminotransferases catalisam a transferência de um grupo amina da posição 2 de um aminoácido para um 2-oxoácido de forma a produzir um novo aminoácido e outro oxo-ácido. Duas importantes reacções são a síntese de aspartato pela a aspartato amino transferase (AspAT) e a síntese de alanina pela alanina amino transferase. Ambas as reacções libertam 2-oxoglutarato o qual pode voltar a entrar no ciclo GS/GOGAT:

glutamato + oxaloacetato <----> 2-oxoglutarato + aspartato

glutamato + piruvato <----> 2-oxoglutarato + alanina

Nas plantas foram detectadas aminotransferases que podem sintetizar todos os amino ácidos (excepto prolina) desde que esteja presente o oxo-ácido precursor adequado. Assim, o azoto é rapidamente distribuido a partir do glutamato, via aspartato e alanina, para todos os aminoácidos.

Particular importância recebeu também a síntese de asparagina, catalisada a partir da glutamina pela asparagina sintetase, segundo a reacção (Joy, 1988):

aspartato + glutamina + ATP ----> asparagina + glutamato + AMP + PPi

A asparagina tem um importante papel como forma de armazenamento e transporte de azoto na maioria das plantas. Pensa-se que a sua importância como composto de transporte se deve à sua estabilidade e a uma elevada razão azoto:carbono (Joy, 1988).

Em suma, a glutamina e o glutamato constituem compostos de transporte de azoto e dadores de azoto para a biossíntese de inúmeros compostos azotados incluindo todos os aminoácidos, ácidos nucleicos, clorofilas, etc. O azoto pode ser transferido da glutamina e do glutamato para

asparagina (pela asparagina sintetase) e para aspartato (pela aspartato aminotransferase). Os quatro compostos transportadores de azoto assim formados, glutamina, glutamato, asparagina e aspartato são os aminoácidos predominantes na maioria das plantas superiores constituindo os componentes principais do reservatório de aminoácidos livres totais em leguminosas e não leguminosas (Lea e Miflin, 1980).

Compostos de transporte de azoto

As amidas glutamina e asparagina possuem um átomo de azoto extra no grupo amida das suas cadeias laterais e como tal têm um papel fundamental como transportadores de azoto na planta (Lea e Miflin, 1980). Contudo, a asparagina pode ser o composto de transporte preferencial (Sieciechowicz et al, 1988) pois é mais solúvel e menos reactiva do que a glutamina e possui uma razão mais elevada N:C, principalmente em situações em que a disponibilidade de carbono é limitada. Exemplos em que existe a necessidade de transportar azoto de um órgão para outro e em que a disponibilidade de carbono é geralmente baixa são (Lea, 1993):

1- dos nódulos fixadores de azoto para as folhas e frutos;

2- das folhas senescentes para as folhas mais jovens e frutos;

3- das cotilédones das sementes em germinação para o caule em crescimento e para os ápices radiculares.

Os cotilédones das sementes em germinação são a principal fonte de asparagina sintetase. A asparagina é também o composto azotado principal exportado dos nódulos de muitas leguminosas (Lea e Miflin, 1980; Sieciechowicz et al, 1988).

Nos nódulos de muitas leguminosas, a glutamina, que é o produto de assimilação da amónia proveniente da fixação de azoto atmosférico, não é o principal produto encontrado no xilema. Muitas leguminosas com nódulos tendem a exportar asparagina, como foi referido, ou ureídos que são compostos relacionados com a ureia tais como citrulina, alantoína e ácido alantoico. Os ureídos são sintetizados pela oxidação de purinas as quais derivam de glutamina. Os ureídos possuem 4 átomos de azoto por molécula (C:N = 1:1) possuindo assim vantagens sobre a asparagina (C:N = 2:1) em termos de eficiência de utilzação do carbono (Peoples e Gifford, 1997).

A formação da amónia

Como foi descrito anteriormente, a assimilação primária de amónia é um processo eficiente devido principalmente à elevada afinidade da glutamina sintetase pela amónia. Apesar de ser um processo em que há dispêndio de energia, a remoção imediata da amónia é uma necessidade para a planta, dada a sua natureza tóxica (Joy, 1988).

Um aspecto que tem emergido dos estudos do metabolismo das plantas é que a amónia está constantemente a ser formada em vários processos metabólicos (Fig. 4), principalmente (Joy, 1988):

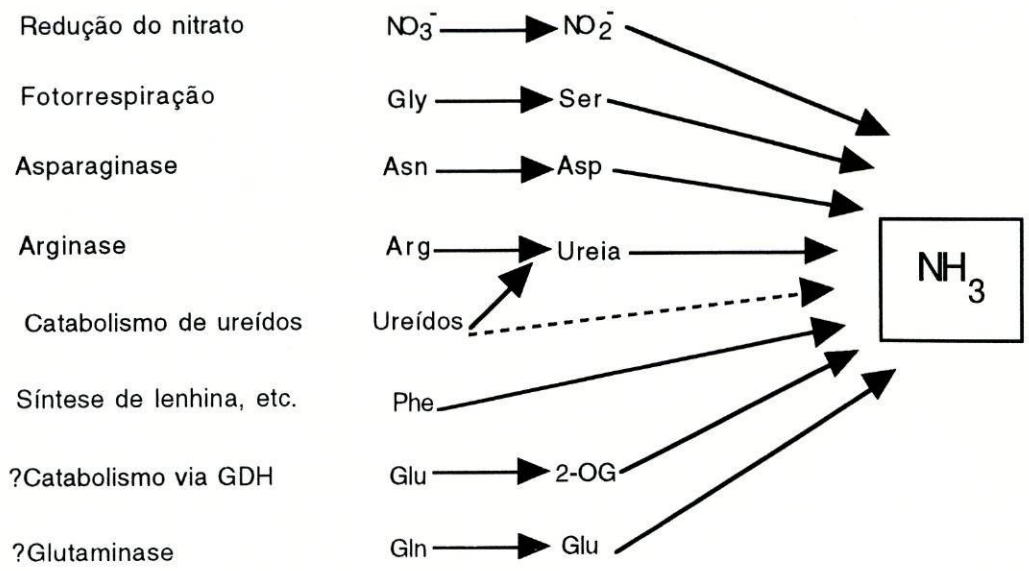


Fig. 4. Reacções metabólicas que produzem amónia nas plantas. GDH, glutamato desidrogenase; 2-OG, 2-oxoglutarato. Para abreviaturas de aminoácidos, ver fig. 3. Adaptado de Joy (1988).

1) Assimilação primária de azoto, em que, como foi descrito, a amónia é o produto da redução do nitrato ou da fixação de azoto atmosférico. Na maioria das plantas, o nitrato absorvido do solo é transportado para as folhas onde é reduzido nos plastídios a amónia. Na assimilação primária da amónia nos cloroplastos foi implicada uma forma da GS cloroplastidial (ver à frente) e a GOGAT dependente de ferredoxina (Fd-GOGAT), também localizada nos plastídios.

2) Fotorrespiração, em que a amónia é libertada em grande quantidade durante a conversão da glicina a serina nas mitocôndrias. Nas plantas C3 a amónia libertada pela fotorrespiração pode exceder em 10 vezes a amónia resultante da assimilação primária (Keys et al, 1978). Desta forma, para sobreviver, a planta necessita de reassimilar esta amónia em glutamina ou glutamato. Através de estudos com mutantes deficientes em GS cloroplastidial ou Fd-GOGAT, foi possível provar o envolvimento destas enzimas na reassimilação da amónia proveniente da fotorrespiração (Lea et al, 1988).

3) Assimilação de azoto reciclado. A amónia é libertada em processos bioquímicos como utilização dos compostos de transporte, catabolismo de proteínas, desaminação de aminoácidos e em algumas reacções biossintéticas específicas como as que envolvem a metionina, isoleucina, e a síntese de fenilpropanoides e de lenhina (Joy, 1988; Lea, 1993; Sechley et al, 1992). Para uma eficiente utilização de azoto proveniente do solo pela planta, esta deve ser capaz de reciclar o azoto libertado durante aqueles processos (Lam et al, 1996).

i) *Metabolismo dos compostos de transporte.* A amónia é libertada nas reacções de catabolismo da asparagina, arginina e ureídos (Joy, 1988). A asparagina, o principal composto azotado de transporte, é utilizado em locais de crescimento de modo a fornecer os compostos

necessários para síntese de vários compostos azotados (Lea e Miflin, 1980; Sieciechowicz et al 1988). A utilização da asparagina pode fazer-se através da enzima asparaginase que catalisa a conversão da asparagina em aspartato com libertação de amónia. Esta enzima está presente em folhas jovens em expansão e a amónia libertada é reassimilada pela glutamina sintetase e glutamato sintase (Joy, 1988; Lea, 1993).

ii) *Metabolismo fenilpropanoide*. A fenilalanina é um composto interveniente na biossíntese de lenhina, flavonóides e vários produtos secundários (Hahlbrock e Grisebach, 1979). A fenilalanina amónia-liase (PAL) catalisa a desaminação de fenilalanina produzindo ácido cinâmico e amónia numa reacção inicial do metabolismo fenilpropanoide. Esta via conduz à formação de lenhina, suberina e outros compostos fenólicos, (Sechley, 1992). Como tal, a actividade desta enzima é importante durante o desenvolvimento de cotilédones e das folhas e também na síntese de produtos secundários, por exemplo, na infecção por agentes patogénicos. A libertação de amónia derivada da acção da PAL pode ser extremamente significativa durante estes processos em zonas localizadas. Aí deverão ocorrer igualmente níveis elevados de glutamina sintetase para reassimilar a amónia libertada (Sechley, 1992).

iii) *Catabolismo de proteínas*. Como já mencionado, durante a germinação, ou durante a senescência foliar, ocorre uma significativa hidrólise de proteínas e exportação de aminoácidos. Embora possa ocorrer um transporte directo dos aminoácidos individuais, existe uma conversão em amidas que são compostos de transporte mais eficientes (Joy, 1988).

Por acção de aminoácido-oxidases ou desidrogenases, o grupo amina é libertado na forma de amónia que é por sua vez utilizada na síntese de amidas. A enzima glutamato desidrogenase tem sido particularmente envolvida neste processo de libertação de amónia anterior à síntese de compostos de transporte, através da reacção de catabolismo do glutamato:

$$\text{glutamato} + \text{NAD} + H_2O \text{ <----> 2-oxoglutarato} + NH_3 + \text{NADH} + H^+$$

Os grupos amina de todos os outros aminoácidos podem ser metabolizados via glutamato, originando oxoácidos que podem ser metabolizados para produção de energia (Lea, 1993).

A reciclagem da amónia ocorre continuamente na planta mas há contextos que requerem uma reassimilação significativa de amónia para transporte, por exemplo durante a germinação quando as proteinas de reserva das sementes são catabolizadas e o azoto é transportado na forma de glutamina para a plântula em crescimento (Lea e Miflin, 1980) e nas folhas senescentes quando as proteínas são degradadas e o azoto é reassimilado em glutamina e transportado para os órgãos de reprodução (Miflin e Lea, 1976). O aumento de actividades da NADH-GOGAT, GDH e de uma forma citosólica da GS sugerem o envolvimento destas enzimas nestes processos (Lam et al, 1996).

Em resumo, durante a vida da planta, após a entrada de azoto na forma de nitrato nas raízes, a amónia pode ser libertada em inúmeros processos na planta antes de ser finalmente assimilada e armazenada na forma de proteínas de reserva, normalmente na semente. A amónia libertada é sempre rapidamente reassimilada, sendo incorporada em glutamina pela glutamina sintetase,

que parece existir em todos os órgãos da planta (ver à frente). O azoto do grupo amida pode ser utilizado directamente mas na maior parte é transferido para outros aminoácidos via glutamato (Lea, 1993).

As principais enzimas envolvidas na assimilação do azoto têm sido alvo de inúmeros estudos bioquímicos e fisiológicos, mas ainda não estão completamente esclarecidos os factores que controlam este processo. A existência de múltiplas isoenzimas em cada passo de assimilação do azoto dificultou os processos bioquímicos de purificação. As funções relativas das várias isoenzimas presentes em diferentes compartimentos subcelulares são difíceis de avaliar devido a um fraccionamento inadequado dos componentes citoplasmáticos e dos organelos, a padrões de actividade sobreponíveis e a reacções cruzadas dos anticorpos contra as várias isoformas (Lam et al, 1996).

Recentemente, os estudos moleculares demonstraram que os genes envolvidos na assimilação do azoto são altamente regulados por factores como o tipo de célula, luz e metabolitos. O conjunto de dados bioquímicos, genéticos e moleculares que se tem vindo a acumular tem permitido começar a definir o papel desempenhado *in vivo* pelas enzimas envolvidas na assimilação do azoto e esclarecer os mecanismos que regulam este processo (Lam et al, 1996).

Como foi referido, o azoto é um elemento limitante no crescimento das plantas. Contudo, não parece haver limitações na capacidade das plantas absorverem e reduzirem o nitrato (Crawford, 1995), mas sim na capacidade de incorporação de azoto em proteínas. É provável que a GS represente o ponto crítico desta limitação uma vez que catalisa o passo principal de conversão do azoto inorgânico numa forma orgânica utilizável para crescimento e desenvolvimento (Lam et al, 1995) .

A GS é a principal enzima responsável pela assimilação do azoto em forma orgânica. Dado que possui um papel central no metabolismo do azoto e é diferencialmente regulada em diferentes plantas e órgãos, tem sido alvo de particular atenção, quer a nível bioquímico, quer mais recentemente a nível molecular. Contudo, a natureza dos factores externos e internos que controlam esta enzima e os genes que a codificam permanece por esclarecer (Hirel et al, 1993).

ISOENZIMAS DA GS

Localização das isoenzimas GS nas plantas superiores

As isoenzimas da GS

Uma característica distintivas da GS nas plantas superiores é a sua existência sob a forma de múltiplas isoenzimas associadas a diferentes órgãos e compartimentos subcelulares (McNally e Hirel, 1983; Miflin e Lea, 1980; Stewart et al, 1980) provindo as evidências sobre a localização da acumulação de GS principalmente de estudos de origem bioquímica e, em menor proporção, de estudos de imunohistoquímica e imunocitoquímica

As isoenzimas da GS dividem-se em duas classes, identificadas por cromatografia de troca iónica, respectivamente, GS1, localizadas no citosol e GS2, localizadas no cloroplasto (McNally e Hirel, 1983). Embora existam múltiplas formas da GS citosólica todas elas são referidas como GS1 para simplicidade (Lam et al, 1996). Além desta dualidade de localização, as proporções relativas das duas GSs variam com o órgão ou o tipo de planta (Mc Nally e Hirel, 1983; McNally et al, 1983). Os papéis fisiológicos da GS1 e GS2 foram deduzidos da distribuição que apresentavam, específica para determinados órgãos (Lam et al, 1996): a GS2 predomina nas folhas e foi implicada na reassimilação da amónia proveniente da fotorrespiração e/ou na assimilação primária da amónia; a GS1 predomina nas raízes e aí funcionaria na assimilação primária de azoto.

As isoformas são octâmeros, constituídas por polipeptídeos de peso molecular semelhante (Stewart et al, 1980) e estudos moleculares mostraram que, em todas as plantas até agora estudadas, as subunidades da GS são codificadas por uma pequena família de genes nucleares. Em cada espécie, aparentemente um único gene codifica a forma cloroplastidial GS2, enquanto que múltiplos genes codificam a forma citosólica GS1 (Lam et al, 1996 e referências). A distribuição da GS na planta teria, assim, como base a expressão diferencial dos diversos genes da GS durante o desenvolvimento da planta (Forde e Cullimore, 1989). Daí, que o conhecimento detalhado da localização celular/subcelular dos produtos génicos se tenha revelado essencial para a compreensão da função das diferentes isoenzimas.

Estudos de localização da GS por técnicas bioquímicas

A actividade da GS foi detectada em todos os órgãos das plantas tal como folhas, raízes, nódulos radiculares, sementes, e frutos (McNally e Hirel, 1983 e referências; Stewart, 1980 e referências). A actividade específica da GS era normalmente maior nas folhas do que na raiz mas podia ocorrer o contrário em casos em que assimilação de azoto fosse efectuada em grande parte na raiz (Stewart, 1980). Em trabalhos iniciais O'Neal e Joy (1973) sugeriram que as plântulas da ervilheira deveriam conter uma GS diferente da GS presente nas sementes uma vez que a enzima das sementes se encontrava principalmente nos cotilédones que são órgãos especializados de reserva, enquanto que os caules em crescimento representavam uma situação metabólica e um estado de desenvolvimento diferente. Posteriormente, a presença da GS nos vários órgãos foi relacionada com diferentes situações fisiológicas que dão origem a amónia:

- nas raízes, a GS assimilaria a amónia derivada das fontes primárias do solo (Oaks e Hirel, 1985);
- nos nódulos, estaria envolvida na assimilação da amónia derivada da fixação de azoto pelo *Rhizobium* (Cullimore et al, 1983);
- nos cotilédones, estaria envolvida na reassimilação das reservas nitrogenadas durante a germinação (Miflin e Lea, 1980);
- nas folhas, a GS assimilaria a amónia proveniente da fotorrespiração (Keys, 1978).

A localização intracelular das isoformas da GS foi inicialmente investigada por técnicas clássicas de fraccionamento celular em meios aquosos e não aquosos.

A presença de actividade de GS em cloroplastos isolados por centrifugação diferencial foi demonstrada em vários trabalhos (Haystead, 1973; O'Neal and Joy, 1973). Estudos posteriores de centrifugação contra gradiente sugeriram que só parte da actividade estava restrita à fracção cloroplastidial (Miflin, 1974; Wallsgrove, 1979), podendo estar até 40% na fracção extracloroplastidial (Wallsgrove, 1979). Em plantas C4, que possuem dois tipos de células fotossintéticas, as células do mesófilo e as células da bainha perivascular, a GS parecia estar principalmente localizada nos plastídios em geral e, na sua maior parte, nas células do mesófilo, juntamente com a maior parte da actividades da nitrato e nitrito redutases e da glutamato sintase (Rathnam e Edwards, 1976); Harel (1977), pelo contrário, demonstrou nas mesmas espécies, actividade da glutamina sintetase e da glutamato sintase nos dois tipos de células, com predominância nas células da bainha perivascular. Ainda outros trabalhos, utilizando vários métodos de fraccionamento celular tais como preparação de protoplastos ou homogeneização sequencial, demonstraram que a GS1 e a GS2 estão igualmente activas nas células do mesófilo e da bainha perivascular em milho (Yamaya and Oaks, 1988) e em sorgo (Hirel e Gadal, 1982).

Estes resultados, por vezes contraditórios, exemplificam a dificuldade em avaliar a presença de diferentes GS em diferentes tipos de células e diferentes compartimentos subcelulares por técnicas bioquímicas clássicas, em que as diferentes técnicas usadas no fraccionamento celular podem dar origem a artefícios.

Nas raízes a GS foi inicialmente detectada na fracção plastidial (Miflin, 1974; Emes e Fowler, 1979) mas, em estudos posteriores, apenas a GS citosólica foi detectada (Hirel e Gadal, 1980; Suzuki et al, 1981). Mais tarde, foi observado que cerca 50% de actividade GS se localizava nos plastídios de raízes de ervilheira tratadas com NO_3^- (Vezina e Langlois, 1989). A localização da GS nas raízes parece variar em função da espécie e até da variedade, sendo principalmente plastidial em certas variedades da ervilheira e citsólica em milho (Sechley, 1992). Estas observações sugeriam que nas plantas essencialmente exportadoras de asparagina (por exemplo, ervilheira) a GS estaria localizada nos plastídios, enquanto que nas plantas essencialmente exportadoras de NO_3^-, mas que também exportam glutamina (por exemplo, milho, arroz), a GS estaria localizada principalmente no citosol (Sechley, 1992).

As isoformas da GS e a sua localização

Em 1979, por meio de cromatografia de troca iónica, foi possível resolver a actividade da GS, de caules e folhas das plantas superiores, em duas isoformas distintas designadas GS1 e GS2 (pela ordem de eluição) (Guiz et al, 1979; Mann, 1979). Estudos de fraccionamento celular associados à separação por cromatografia, demonstraram que a GS1 estava presente no citosol e a GS2 nos cloroplastos (Hirel et Gadal, 1980; Hirel et Gadal, 1981; Mann, 1979). Foi também demonstrado que as proporções relativas da duas isoformas eram influenciadas por factores como o estado de desenvolvimento (Tobin et al, 1985), variando, ainda, com o órgão

ou a planta em estudo (Mc Nally e Hirel, 1983; McNally et al, 1983). Folhas estioladas continham apenas GS1 (Guiz, 1979; Mann, 1979; Tobin et al, 1985) aparecendo a GS2 com a exposição à luz. Um só pico de actividade, também coincidente com GS1, foi encontrado em raízes e sementes (Mann, 1979; Hirel e Gadal, 1980).

Nas folhas, a GS não só se encontrava em diferentes compartimentos subcelulares como as duas formas, cloroplastidial e citosólica, se mostraram bioquimicamente diferentes (Mc Nally e Hirel, 1983). Depois da descoberta das duas isoformas vários estudos incidiram na caracterização das suas características cinéticas e regulatórias, principalmente a nível das folhas, com vista à elucidação dos papéis fisiológicos desempenhados no metabolismo do azoto no cloroplasto e no citosol.

De uma maneira geral a GS1 tem um pH óptimo mais baixo que a GS2. O Km da GS2 para o glutamato é dez vezes maior do que o da forma citosólica, tendo portanto uma afinidade mais baixa para este substrato, mas as afinidades para outros substratos como ATP, NH_2OH (hidroxilamina, um substrato utilizado *in vitro*) e NH_4^+ eram semelhantes (Mc Nally e Hirel, 1983). A GS2 mostrou-se menos termoestável do que a GS1 mas a estabilidade da GS2 a 30°C poderia ser obtida pela adição de ião magnésio, glutamato e ditiotreitol (Mc Nally e Hirel, 1983).

Uma caracterização do padrão de isoformas de GS em folhas de várias espécies de plantas (McNally et al, 1983), permitiu demonstrar diferenças no conteúdo e proporção relativa das duas isoformas nas diferentes plantas estudadas, que foram divididas em quatro grupos: o primeiro, caracterizado por possuir apenas GS citosólica (GS1) incluía plantas parasitas; no segundo, apenas a GS2 (cloroplastidial) estava representada e incluía entre outras, espécies da família das Solanaceae, várias halófitas e gramínias; no terceiro grupo, onde se encontrava a maioria das plantas C3, a proporção de GS1 (menos de 30% do total) era inferior à de GS2; o quarto grupo que englobava plantas C4 e CAM, apresentava actividade igualmente elevada das duas isoformas ou mais elevada (até 80% do total) de GS1.

A ausência da GS citosólica nas folhas de várias plantas já tinha sido descrita em vários trabalhos com espinafre (Hirel et al, 1982a) e trabalhos iniciais, utilizando gel de amido, também pareciam apontar para a existência de uma única forma da GS em folhas de algumas plantas como tabaco e tomateiro (Barrat, 1980).

A presença de GS citosólica nas folhas parecia apresentar uma correlação com o tipo de fotossíntese C3 ou C4 (Hirel et al, 1993). A maioria das plantas C3, com elevado metabolismo fotorrespiratório, apresentava níveis muito baixos ou mesmo ausência de GS citosólica nas folhas, enquanto esta era abundante no citosol das folhas das plantas C4, que possuem um reduzido metabolismo fotorrespiratório (Hirel et al, 1993).

Em virtude da sua localização no citosol, tinha sido sugerido que a GS1 estaria envolvida na reassimilação de amónia formada na fotorrespiração (Keys, 1978), enquanto a GS2 cloroplastidial seria responsável principalmente pela assimilação primária de azoto. Contudo, a não detecção da GS1 em folhas de várias plantas levou à sugestão que a GS cloroplastidial

(GS2) estaria também envolvida na reassimilação da amónia libertada pela fotorrespiração (McNally e Hirel,1983; McNally et al, 1983). No entanto, a evidência de que é a GS cloroplastidial a responsável pela assimilação da amónia proveniente da fotorrespiração, proveio de estudos com mutantes de cevada deficientes em GS2 (ver à frente). Contudo, os papéis relativos da GS1 e da GS2 nas folhas permaneciam pouco claros, tendo sido sugerido que a actividade da GS1 citosólica poderia ser responsável pela assimilação da amónia em condições de obscuridade uma vez que era a enzima mais abundante em folhas estioladas de várias plantas (Hirel et al, 1993). De um modo geral, foi considerado que a localização da GS nos plastídios e no citosol se correlacionava, em termos globais, respectivamente com tecidos fotossintéticos e não fotossintéticos (Hirel et al, 1993).

Um facto aparentemente discrepante foi a descoberta de mRNA de GS citosólica em folhas de plantas que não evidenciavam actividade de GS1 (Tingey e Coruzzi, 1987), o que foi considerado "um enigma" (Hirel et al, 1993). Este facto foi justificado por um possível controlo sobre a tradução mas também por níveis demasiado baixos de mRNA ou instabilidade do polipeptídeo (Hirel et al, 1993).

Localização da GS por técnicas de imunocitoquímica

É geralmente reconhecido (Robinson et al, 1994) que uma parte importante da compreensão da função de várias isoenzimas consiste na determinação da sua localização celular. Contudo, a interpretaçao dos estudos de fraccionamento subcelular, que pode conduzir a "possíveis artifícios experimentais", deve ser cautelosa, enquanto que a imunocitoquímica ultarestrutural com ouro coloidal permite a observação *in situ* da compartimentação das isoenzimas (Robinson et al, 1994).

Embora tenha sido produzida uma grande quantidade de estudos bioquímicos sobre a GS, os estudos de imunocitoquímica são relativamente escassos. Contudo, os estudos bioquímicos envolvendo necessariamente a ruptura das células reflectiam normalmente a actividade média da enzima em extractos totais de órgãos. Daí a necessidade de abordar por outros métodos a localização da GS em diferentes tipos de células e compartimentos subcelulares, para melhor avaliar a intervenção da GS em vias metabólicas específicas ocorrendo em tipos de células envolvidas em diferentes aspectos do metabolismo do azoto.

- Folhas

Por imunofluorescência, a GS foi detectada apenas em cloroplastos de folhas de espinafre o que concordava com os resultados obtidos por cromatografia de troca iónica em que somente a GS2 era detectada (Hirel et al, 1982a).

Estudos, anteriormente referidos, de cromatografia de troca iónica para caracterização do padrão de isoformas de GS nas folhas (McNally et al, 1983), apontavam para a existência de apenas a forma cloroplastidial em várias espécies de plantas, incluindo o espinafre, algumas gramínias e espécies pertencentes às Solanaceae. Também por meio de electroforese

descontínua em gel de agarose, foi descrita a existência de apenas uma isoforma (GS2) em todas as Solanacae estudadas, com excepção de *Mandragora autumnalis*, em que foram detectadas a GS1 e GS2 (Botella et al, 1986). Este grupo confirmou a presença de GS exclusivamente nos cloroplastos de folhas de tomateiro, através de técnicas de imunocitoquímica ultraestrutural, mas utilizou apenas anticorpos contra GS2 (Botella et al, 1988). Contudo, na Leguminosae *Glycine max*, em que foi descrita GS cloroplastidial e citosólica nas folhas, (Hirel et al, 1987) a enzima foi localizada, também por imunocitoquímica ultraestrutural, apenas nos cloroplastos, utilizando anticorpos quer contra a forma cloroplastidial quer citosólica, o que levou os autores a concluir pela ausência de GS citosólica nos tecidos da folha e a considerar esta ausência "um enigma" (Brangeon et al, 1989).

Estudos também de imunocitoquímca ultarestrutural em outra leguminosa, o feijoeiro, referem, "marcação substancial no cloroplasto", que mostrava "maior densidade de marcação por unidade de área do que o citoplasma" (Datta et al, 1991).

- Nódulos

Os nódulos radiculares das leguminosas são uma das fontes mais ricas em GS nas plantas superiores e embora estudados em pormenor a nível bioquímico (Forde e Cullimore, 1989), são escassos os estudos de localização imunocitoquímica. Em nódulos de leguminosas, foi encontrada uma maior percentagem de actividade da GS no citosol do que nos extractos de bacteroides dos nódulos (Stewart et al, 1980).

Por técnicas de imunocitoquímica ultraestrutural, a GS foi localizada no citoplasma da célula infectada em nódulos radiculares de soja (Verma et al, 1986) e, noutro trabalho também em soja, nos plastídios e citosol de células não infectadas e infectadas e nestas, na membrana peribacteroidal (Brangeon et al, 1989). Contudo, estas observações foram criticadas e consideradas "artefactos do procedimento de marcação" pelo facto de os anticorpos utilizados apresentarem reacção cruzada com os bacteroides (Datta et al, 1991). Usando anticorpos purificados por afinidade, sem reacção cruzada com extractos de *Rhizobium*, Datta et al (1991) observaram uma marcação no citosol de células não infectadas e infectadas (sendo significativamente maior nestas) e uma ausência de marcação nos bacteroides, membrana dos bacteroides, espaço peribacteroidal ou membrana peribacteroidal.

- Raízes

Dois estudos de imunocitoquímica ultrestrutural em raiz de leguminosas incidiram sobre tecidos diferentes: Brangeon et al (1989) estudaram a zona de parênquima cortical tendo detectado marcação, em baixa densidade, apenas no citoplasma; Datta et al (1991) detectaram GS no citoplasma das células dos ápices radiculares não observando marcação nos plastídios imaturos aí existentes.

Estrutura das isoenzimas da GS

Na literatura, vários artigos de revisão abordaram a purificação e propriedades da GS, (McNally e Hirel, 1983; Lea et al, 1990; Stewart et al,1980) e, ainda, os aspectos moleculares (Forde e Cullimore, 1989; Hirel et al, 1993; Lam et al, 1995; Lam et al, 1996). A GS das plantas superiores possui um peso molecular nativo de 350-400 kDa (Stewart et al, 1980) e é composta por oito subunidades muito semelhantes (Stewart et al, 1980) mas que variam em tamanho e carga (Bennet e Cullimore, 1989; Lara et al, 1984; Tingey e Coruzzi, 1987).

Por técnicas de electroforese foi possível separar as subunidades da GS1 e da GS2 e verificar que as subunidades cloroplastidiais são maiores (43-45 kDa) do que as subunidades citosólicas (37-43 kDa) (Cullimore e Bennet, 1988; Tingey et al, 1987); estudos moleculares demontraram que a GS1 e a GS2 eram especificadas por genes nucleares independentes (Tingey et al, 1988; Lightfoot et al, 1988). Foi também demonstrado que o produto da tradução *in vitro* da GS2 é maior (49 kDa) do que a GS2 isolada de cloroplastos (44 kDa) ocorrendo a clivagem de um péptido-sinal na transferência através da membrana cloroplastidial (Tingey e Coruzzi, 1987).

Foi demonstrado que GS citosólica de nódulos radiculares de feijoeiro podia ser separada, por cromatografia de troca iónica, em duas isoenzimas GSn1 e GSn2, sendo a última muito semelhante à forma citosólica da raiz (GSr) (Lara et al, 1983). A análise posterior das subunidades individuais GS de raiz, folhas e nódulos de *P. vulgaris*, permitiu a identificação de diferentes polipeptídeos (designados α, β e γ) com pesos moleculares semelhantes (43 kDa) mas com diferentes pontos isoeléctricos (Lara et al, 1984). A GSn1 era constituida por subunidades β e γ, enquanto que a GSn2 continha essencialmente subunidades β. Estes e outros trabalhos, nomeadamente electroforese em gel nativo (Robert e Wong, 1986), sugeriam a possibilidade de as subunidades se agruparem em diferentes proporções para produzir diferentes formas hetero-octaméricas, o que foi confirmado por Bennet e Cullimore (1989). Estes autores separaram a GS citosólica de nódulos de feijoeiro em três picos de actividade por meio de cromatografia de troca iónica de alta eficácia (HPLC). Dois deste picos continham subunidades β e γ, em diferentes proporções enquanto que o terceiro era composto quase inteiramente por unidades β. As isoenzimas citosólicas da raiz e da folha mostraram ser compostas pelas mesmas subunidades (α e β) (Lara et al, 1984). A forma cloroplastidial é composta unicamente por um tipo de subunidade denominada δ (Forde e Cullimore, 1989).

Já a nível molecular, estudos de transcrição e tradução *in vitro* demonstraram que este polipeptídio é sintetizado nos ribossomas do citoplasma na forma de um precursor, pré-δ, que é maior do que o polipeptídeo cloroplastidial nativo em 3-4 kDa; este precursor possui uma pré-sequência na extremidade N-terminal (Lightfoot 1988) necessária para o direccionamento da GS2 para o cloroplasto e que é clivada no processo de transporte para este organelo (Forde e Cullimore, 1989).

Diferentes polipeptídeos para a GS citosólica foram observados em nódulos de outras plantas, além do feijoeiro, mas não foi feita a correspondência entre estas subunidades e a composição das isoenzimas presentes nos nódulos (Forde e Cullimore, 1989).

Base genética para a existência de isoenzimas

As subunidades que compõem as isoenzimas da GS são codificadas por uma família de genes, em todas as plantas estudadas (por exemplo, Cock et al, 1991; Li et al, 1993; Peterman e Goodman, 1991; Sakakibara et al, 1992a).

Para o feijoeiro foi proposto um modelo, bastante citado, que explica, a nível genético, a heterogeneidade das isoenzimas e das suas subunidades, nas folhas, raízes e nódulos daquela planta (Forde e Cullimore, 1989) (Fig. 5). Assim, as diferentes subunidades citosólicas seriam codificadas por três genes diferentes designados gln-α, gln-β, gln-γ e a subunidade cloroplastidial por um único gene, gln-δ (um quinto gene, gln-ε, teria função desconhecida). Os genes para a GS citosólica codificam proteínas que apresentam homologias da ordem dos 80-90% mas apresentam divergências significativas nas regiões 3' e 5' não traduzidas (Forde e Cullimore, 1989).

A GS citosólica das folhas envolve a expressão dos três genes, principalmente o gln-α, enquanto que o gln-β é expresso preferencialmente nas raízes e o gln-γ nos nódulos. Pensou-se que este gene seria expresso exclusivamento nos nódulos mas mRNAs do gln-γ têm sido detectados noutros órgãos (Forde e Cullimore, 1989).

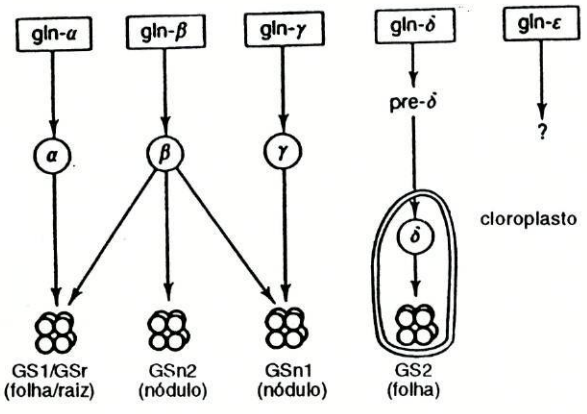


Fig. 5. Controlo genético das isoenzimas da glutamina sintetase (GS) em *Phaseolus vulgaris*. O diagrama ilustra o modelo actualmente aceite para a biossíntese das isoenzimas octaméricas da GS em raízes, folhas e nódulos. Adaptado de Forde e Cullimore (1989).

O isolamento de clones genómicos para gln-β e gln-γ, permitiu um estudo mais preciso da regulação e localização da expressão da GS (ver abaixo). A expressão espacial destes e de outros genes da GS tem sido investigada em plantas transgénicas usando fusões entre os promotores dos genes da GS e o gene marcador da β-glucuronidase (GUS).

Localização da expressão individual de genes da GS através de fusões de promotores com o gene maracador GUS

Através de fusões entre os promotores dos genes em estudo e um gene marcador, é possível estudar a regulação temporal e espacial dos genes clonados em plantas transgénicas e assim resolver padrões característicos de uma expressão específica para determinados tecidos e/ou regulada pelo estado de desenvolvimento. Apesar de esta abordagem ter sido recentemente considerada insuficiente para avaliar a expressão génica, devido a erros de interpretação e artefactos que produz (Taylor, 1997), permitiu elucidar diferenças entre os membros individuais das famílias de genes (Edwards e Coruzzi, 1990) e estabelecer as sequências responsáveis pela regulação da expressão específica de determinadas células.

O gene marcador mais utilizado é o gene *uidA* de *Escherichia coli*, que codifica a enzima ß-glucuronidase, GUS (Jefferson et al, 1987). Utilizando substratos cromogénicos, a actividade desta enzima pode ser avaliada em extractos de plantas por espectrofotometria ou fluorimetria e localizada histoquímicamente nos tecidos e células (Jefferson et al, 1987).

Estudos com genes quiméricos obtidos pela fusão de promotores de genes da GS com o gene GUS contribuiram para elucidar os papéis fisiológicos das várias isoenzimas da GS no metabolismo do azoto nas plantas (Forde et al, 1989; Edwards et al, 1990; Miao et al, 1991).

Estudos com fusões de promotores dos genes de feijoeiro gln-γ e gln-β com GUS expressos em *Lotus corniculatus* (Forde et al, 1989), demonstraram que actividade do promotor do glnγ era fortemente aumentada nos nódulos e localizada especificamente nas células infectadas, o que era consistente com a função primária da GS nos nódulos na assimilação rápida de amónia excretada pelos bacteroides; por sua vez o promotor do gln-β mostrava actividade nas raízes e nos nódulos e nestes o padrão de expressão era regulado pelo desenvolvimento, ficando restringida aos tecidos vasculares à medida que iam ficando maduros (padrão de expressão regulada pelo grau de desenvolvimento). Contudo os autores (Forde et al, 1989) consideram que a pouca resolução das técnicas histoquímicas usadas nesta abordagem, não permitia relacionar o aparecimento da actividade GUS com alterações morfológicas do nódulo em desenvolvimento, sugerindo a utilização de técnicas de imunocitoquímica ou hibridização *in situ* do mRNA para complementar os resultados.

O promotor do gene gln-δ, que codifica a glutamina sintetase plastidial de feijoeiro, dirigia a expressão de GUS nas células clorofilinas de folhas e caules e ainda nos meristemas da raiz em tabaco transgénico (Cock et al, 1992).

Estudos com genes da GS de ervilheira demonstraram que os genes da GS cloroplastidial e da GS citosólica se expressam em diferentes tipos de células em plantas de tabaco transgénicas (Edwards et al, 1990). Em ervilheira estão descritos quatro genes nucleares, um codificando a isoforma cloroplastidial e três codificando forma citosólica (Tingey et al, 1987; Tingey et al, 1988). O gene GS3A na ervilheira expressa-se preferencialmente nos nódulos radiculares e nos cotilédones (Walker e Coruzzi, 1989). Em tabaco transgénico o promotor de uma GS citosólica (gene GS3A) dirigia a expressão do GUS especificamente no floema de folhas, caules, raízes e

nos cotilédones, enquanto que o promotor da GS cloroplastidial (GS2) dirigia a expressão do GUS em tecidos fotossintéticos da folha, caule e cotilédones (Edwards et al, 1990). Este padrão de expressão sugeria que os dois genes codificam isoformas da GS com papéis fisiológicos diferentes e não sobreponíveis no metabolismo do azoto: a expressão da GS2 era consistente com a sua função na reassimilação da amónia proveniente da fotorrespiração e a actividade do promotor da GS3A sugeria o envolvimento da GS citosólica localizada no floema, na síntese de glutamina para transporte. É, contudo, de referir que que este gene é expresso especificamente em raízes e nódulos radiculares num contexto homólogo (ervilheira) não existindo evidências da localização da enzima ou do respectivo mRNA na vasculatura da planta nativa.

O promotor do gene GS3A de ervilheira mostrava uma actividade elevada em nódulos de plantas transgénicas de *Medicago varia* , sendo a actividade de GUS localizada nos primórdios dos nódulos, meristema, zona simbiótica e vasculatura de nódulos maduros (Brears et al, 1991).

A localização espacial da actividade de GUS dirigida por um promotor de um gene de soja com expressão preferencial nos nódulos, GS15, demonstrou que em raízes de plantas transgénicas de tabaco e de *Lotus corniculatus* a actividade estava primariamente localizada nos ápices radiculares, estando também presente nos feixes vasculares da raiz madura, nos ápices das raízes laterais e nos locais de emergência das raízes laterais e nódulos antes de qualquer demarcação morfológica na superfície da raiz. Contudo, o tratamento com amónia induzia uma actividade GUS uniformemente distribuida por toda a raiz. A presença da GS nos ápices radiculares, onde a nitrato redutase também está localizada (Weber et al, 1990), indicava que estaria implicada na assimilação primária da amónia proveniente da redução de nitrato e nitrito que aí ocorre (Emes e Fowler, 1979) e que esta região consistia numa "fonte" de azoto. Por outro lado, os primórdios das raízes laterais seriam "recebedores" activos onde a GS actuaria na assimilação de amónia proveniente de outros tecidos. Nos nódulos de plantas transgénicas de *Lotus corniculatus*, a actividade deste promotor localizava-se na zona de infecção, incluindo células infectadas e não infectadas, e no cortex interno, estando também presente nos feixes vasculares aí localizados (Miao et al, 1991). A observação que GS-GUS ocorria no cortex interno dos nódulos, onde existe um fluxo de amónia, e não no córtex externo, sugeria que a endoderme poderia actuar como uma barreira contra a difusão da amónia. É importante notar que, em tabaco, a actividade do transgene GS-GUS não era estimulada pela amónia, embora mantivesse uma expressão específica na raiz, revelando-se a indutibilidade do gene pela amónia só na leguminosa. Este facto foi determinante para evidenciar a cautela necessária na interpretação dos dados provenientes de estudos com fusões de promotores de diferentes genes e o gene marcador GUS, cuja expressão difere com a planta transgénica utilizada e pode não reflectir o padrão de expressão na planta nativa. Os autores admitem que a presença de actividade GS-GUS nos feixes vasculares das raízes e nódulos de *Lotus corniculatus* possa indicar uma participação na assimilação de amónia para transporte em plantas produtoras de

amidas (como *Lotus corniculatus*) e que a situação possa ser diferente em leguminosas produtoras de ureídos, como a soja.

Apesar da grande quantidade de dados acumulados, a utilização de fusões entre promotores e um gene marcador como único método para análise do padrão e grau de expressão, foi recentemente considerada insuficiente (Taylor, 1997) devendo ser confirmada por outros métodos. As propriedades bioquímicas das proteínas marcadoras, nomedamente a longa semi-vida exibida pelo GUS, assim como artefactos produzidos, podem interferir com a correcta interpretação dos dados. Hirel et al (1993) afirmam mesmo que falta determinar se a transcrição avaliada pela actividade do gene marcador em tecidos de plantas transgénicas indica uma actividade funcional da enzima GS nesses tecidos.

Significado das isoenzimas da GS

Os possíveis papéis fisiológicos que as diferentes isoformas desempenham têm sido discutidos de acordo com a sua distribuição na célula e nos diferentes órgãos (Hirel et al, 1993). Em função da localização em diferentes tipos de células, as diferentes isoformas da GS assimilam ou reassimilam amónio derivado de diferentes processos metabólicos (Hirel et al, 1993). Diferentes tecidos têm diferentes necessidades de assimilação de amónia e por outro lado o azoto do grupo amida da glutamina pode ser utilizado em diversas vias metabólicas (Sechley et al, 1992).

Os estudos bioquímicos forneceram uma quantidade apreciável de dados sobre os papéis da GS nos vários órgãos e sobre a sua regulação, mas a interpretação das análises bioquímicas foi dificultados pela existência de múltiplas enzimas em diferentes, ou até nos mesmos orgãos ou tecidos (Lam et al, 1996; McGrath e Coruzzi, 1991). As funções relativas da GS2 e das múltiplas formas da GS1 eram difíceis de determinar devido a fraccionamentos celulares inadequados, perfis de actividade sobreponíveis, reacções cruzadas dos anticorpos com diferentes formas (Coruzzi, 1991).

Os papéis exactos desempenhados *in vivo* pelas isoenzimas da GS não estão ainda completamente esclarecidos, mas um contributo importante para a sua elucidação proveio de estudos com mutantes da GS2 e dos estudos moleculares que se têm vindo a acumular (Lam et al, 1996). Os estudos moleculares demonstraram que os membros das famílias de genes da GS são diferencialmente regulados pelo tipo de célula, além de luz e metabolitos (Lam et al, 1996).

Estudos em mutantes

Estudos com mutantes de cevada incapazes de sobreviver em condições que favorecem a fotorrespiração, levaram ao isolamento de mutantes deficientes em GS2 (Somerville e Ogren, 1980; Wallsgrove et al, 1987). Estes mutantes não possuíam a capacidade de reassimilar a amónia proveniente da fotorrespiração e assim morriam devido à depleção do azoto. Uma vez que a amónia perdida durante a fotorrespiração é dez vezes superior à assimilação primária de azoto (Keys, 1978) a capacidade de reassimilar aquela amónia é essencial para a sobrevivência

das plantas. Estes estudos permitiram concluir que a GS cloroplastidial, e não a GS citosólica como havia sido sugerido, era a responsável pela assimilação de amónia da fotorrespiração, permitindo assim definir *in vivo* papel desempenhado por essa isoenzima. Uma vez que a amónia proveniente da fotorrespiração é libertada na mitocôndria, estudos anteriores tinham sugerido que seria a GS citoplasmática ou a GDH a responsável pela reassimilação dessa amónia (Keys, 1978; Yamaya et al 1984). O facto de os mutantes deficientes em GS2 serem letais era aparentemente contraditório com o facto de possuírem níveis normais de GS1 no citosol (Wallsgrove et al, 1987); historicamente, era assumido que uma isoforma podia substituir funcionalmente outra, mesmo que não estivessem no mesmo compartimento subcelular (Oaks, 1994b). Mais tarde, através de estudos moleculares, a constatação de que um promotor da GS2 dirigia a expressão de GUS no mesófilo de plantas transgénicas, onde a fotorrespiração ocorre, enquanto que o promotor de uma GS1 mostrava actividade nos tecidos vasculares de plantas transgénicas, sugeria que, na planta nativa, talvez as enzimas funcionais GS2 e GS1 não se localizassem no mesmo tipo de célula e assim a GS1 não poderia compensar a deficiência em GS2.

Estudos moleculares

A caracterização molecular dos genes que codificam a GS aumentou as possibilidades de destrinçar os papéis das diferentes isoformas da GS em diferentes tipos de células e órgãos. Já foram clonados cDNAs de GS para um grande diversidade de espécies de plantas, por exemplo *P. vulgaris* (Cullimore et al, 1984; Gebhardt et al, 1986; Lightfoot et al, 1988), *P. sativum* (Tingey et al, 1987), *M. sativa* (Donn et al, 1984), *G. max* (Hirel et al, 1987) *Z. mays* (Snustad et al, 1988), *N. plumbaginifolia* (Tingey e Coruzzi, 1987), e muitos outros se lhes seguiram.

Nas plantas estudadas, apenas um gene codifica a GS cloroplastidial (Lightfoot et al, 1988; Stanford et al, 1993; Snustad et al, 1988; Tingey et al, 1987) mas vários genes codificam as subunidades da GS citosólica (Li et al, 1993; Peterman e Goodman, 1991; Sakakibara et al, 1992a; Stanford et al, 1993; Tingey e Coruzzi, 1987). Através de análise de acumulação dos respectivos mRNAs por "Northern blot" em tabaco, feijoeiro, ervilheira, luzerna e soja, chegou-se à conclusão que a expressão destes genes era diferencialmente regulada e apresentava uma correlação com as actividades da GS previamente descritas e com diferentes contextos de assimilação do azoto (Brears e Coruzzi, 1991).

Com o uso de cDNAs vários clones genómicos puderam ser isolados, o que o permitiu estudar a regulação da sua expressão através de fusões dos respectivos promotores com genes marcadores. Como já referido anteriormente, em particular avaliar a expressão dos genes individuais em certos tipos de tecidos. Segundo Edwards e Coruzzi (1990) "a expressão específica da GS em determinadas células forneceu, em certos casos, uma explicação para a existência de múltiplas isoenzimas nas plantas".

GS2

Como já referido, em todas as plantas estudadas até agora, a forma cloroplastidial parece ser codificada por um único gene nuclear cujo produto é importado para o cloroplasto após a tradução (Lightfoot et al, 1988; Tingey et al, 1988).

Análises do mRNA de GS2 demonstraram que se expressa predominantemente nas folhas e que essa expressão é dependente da luz (Tingey et al, 1987; Tingey et al, 1988). A indução pela luz da transcrição do gene da GS2 é, pelo menos em parte, mediada pelo fitocromo (Edwards e Coruzzi, 1989). A expressão do gene da GS2 é também afectada pelo metabolismo do cloroplasto, em particular por condições que favorecem a fotorrespiração (Edwards e Coruzzi, 1989). Este padrão de expressão da GS2 estava de acordo com os resultados obtidos em mutantes de cevada (Wallsgrove et al, 1987) que evidenciavam o papel da GS2 na assimilação da amónia proveniente da fotorrespiração. Em apoio destes dados estava, como já mencionado anteriormente, a observação que o promotor da GS2 de ervilheira dirigia a expressão de GUS em células fotossintéticas de tabaco transgénico, incluindo as dos cotilédones. De notar que a GS2 de ervilheira não se expressa em cotilédones da própria ervilheira, que não são fotossintéticos, sugerindo que a expressão da GS2 está mais correlacionada com a função - necessidade de assimilar amónia - do que com o tipo de célula ou órgão (Brears e Coruzzi, 1991). Contudo, promotores de GS2 também dirigiam a expressão de GUS nas raízes, o que estava de acordo com dados anteriores que evidenciavam a actividade da GS em plastídios da raiz (Miflin, 1974) e com outros trabalhos que evidenciavam a presença de GS2 em nódulos radiculares, que são igualmente estruturas não fotossintéticas (Tingey et al, 1987). O significado fisiológico da actividade da GS2 em células não fotossintéticas deve-se provavelmente à actividade da NiR nos plastídios que dá origem à formação de amónia proveniente da redução do nitrato (Brears e Coruzzi, 1991).

Um caso especial em que a compartimentação espacial parece corresponder a uma divisão de trabalho foi proposto para as plantas C4 (Oaks, 1994a; Oaks, 1994b). Plantas com fotossíntese C4 possuem, além de uma capacidade superior para capturar o CO_2 da atmosfera, uma maior eficiência na utilização de azoto[1]. Nestas plantas, parece existir uma divisão de trabalho, a GS2 das células do mesófilo é induzida por NO_3^- o que levou a inferir que estaria envolvida na assimilação primária de azoto, enquanto que a GS2 da bainha perivascular é induzida pela luz e estaria envolvida na assimilação de azoto produzido pela fotorrespiração neste tipo de células (Sakakibara et al, 1992b). Sabe-se que a acumulação de NO_3^- é mais significativa nas plantas C3 do que nas C4 pelo que a separação espacial das reacções envolvidas na assimilação primária de azoto e na reassimilação da amónia poderia levar a uma maior eficiência na utilização do azoto (Oaks, 1994b).

[1] ganho em matéria seca (g) por mg azoto utilizado

GS1

A expressão da GS citosólica foi mais intensamente estudada nas leguminosas. Sabia-se que a actividade da GS aumentava significativamente durante a nodulação e é geralmente aceite que a GS é activamente sintetetizada nos nódulos para assimilar o fornecimento extra de amónia produzida pelos bacteroides (Marsolier e Hirel, 1993).

Inicialmente, a expressão da GS citosólica foi estudada em leguminosas como feijoeiro (Cullimore et al, 1984), soja (Hirel et al, 1987), ervilheira (Tingey et al, 1987), e *Medicago truncatula* (Stanford et al, 1993). Em todos os casos foram detectados múltiplos genes para a GS citosólica e alguns deles pareciam ter uma actividade específica, ou preferencialmente aumentada nos nódulos.

Tem sido sugerido que a amónia é um indutor metabólico da expressão genética da GS. Aparentemente um gene citosólico de soja é induzido pela amónia em raízes e nódulos de soja (Hirel et al, 1987) e em *Lotus corniculatus* transformado (Miao et al, 1991). Contudo, noutras plantas, o aumento da expressão de genes da GS nos nódulos era independente da fixação de azoto (Cock et al, 1990; Walker e Coruzzi, 1989) e foi sugerido que, na maioria das leguminosas estudadas, a expressão aumentada de genes específicos nos nódulos seria regulada pelo grau de desenvolvimento do nódulo e não pelo fornecimento de amónia (Cock et al, 1990; Walker e Coruzzi, 1989; Dunn et al, 1988; Stanford et al, 1993).

Em secção anterior, já foi referido que os promotores de dois genes de GS citosólica de feijoeiro gln-ß, e gln-γ dirigiam a expressão de GUS em diferentes tecidos dos nódulos de *Lotus corniculatus* transgénico, o que sugeria papéis diferentes para as respectivas isoenzimas durante o desenvolvimento do nódulo (Forde et al, 1989).

A existência de múltiplos genes da GS1, tem sido justificada nas leguminosas pelas necessidades específicas de GS expressas "especificamente" ou "preferencialmente" nos nódulos (Lam et al, 1996). Contudo, o facto de ter sido verificado em *Arabidopsis* (não-leguminosa) a existência de pelo menos três genes para a GS1 (Peterman et Goodman, 1991) sugeria que a família de genes da GS evoluiu independentemente do seu papel no processo de fixação de azoto nas leguminosas (Lam et al, 1995; Lam et al, 1996). Dois destes genes da GS citosólica são expressos em níveis elevados em sementes em germinação o que sugeria um envolvimento na mobilização das reservas dos cotilédones para o crescimento da planta.

Estes dados, juntamente com estudos que demonstravam uma expressão predominante da GS1 durante a senescência de cotilédones de rabanete (Kawakami e Watanabe, 1988) sugeriam que esta forma citosólica estaria envolvida na reassimilação do azoto libertado durante o catabolismo de proteínas e na produção de glutamina para transporte intercelular, possuindo assim um importante papel fisiológico na mobilização de azoto para translocação e/ou armazenamento.

Apesar destes resultados, as bases moleculares da regulação da expressão da GS1 não estão esclarecidas. Admite-se, contudo, que a existência de múltiplos genes para a GS1 i) facilitaria a regulação diferencial da síntese da GS em diferentes tecidos em resposta a diferentes

necessidades de assimilação de amónia; ii) fornece suporte à hipótese de que pelo menos algumas das isoenzimas estão envolvidas em diferentes aspectos do metabolismo do azoto, uma vez que o azoto do grupo amida da glutamina pode ser utilizado em diversas vias metabólicas (Sukania et al, 1994).

Apesar do contributo importante dos estudos moleculares sobre o significado da existência das várias isoformas da GS, Lam et al (1995) consideram que a única maneira de saber sem dúvida qual o papel desempenhado por uma isoenzima da GS *in vivo* consiste na determinação do fenótipo de plantas especificamente deficientes numa única isoenzima. Por exemplo, uma vez que a GS2 e a Fd GOGAT são predominantes nos plastídios das folhas pensa-se que são importantes na assimilação primária de azoto nestes órgãos enquanto que nas raízes, onde predominam GS1 e a NADH-GOGAT, seriam estas isoenzimas responsáveis pela assimilação primária de azoto nestes órgãos (Miflin e Lea, 1980). Ora, os mutantes deficientes em GS2 ou Fd-GOGAT parecem ser competentes na assimilação primária de azoto, mostrando apenas incapacidade para reassimilar a amónia proveniente da fotorrespiração. Contudo, não existem mutantes deficientes em GS1 ou NADH-GOGAT que possam indicar se estão de facto envolvidas na assimilação primária de azoto nas folhas e/ou raízes (Lam et al, 1996).

Níveis de regulação da GS

Apesar de as características das subunidades da GS estarem largamente conservadas nas plantas superiores, o mesmo não se verifica no que diz respeito aos processos da sua regulação (Sechley et al, 1992). Foi proposto que a actividade da GS nas células vegetais poderia ser regulada a vários níveis, como transcrição da família de genes, processamento e estabilidade do mRNA, tradução, localização subcelular e processamento dos polipeptídeos primários da GS, agrupamento das formas octaméricas, modulação da actividade das holoenzimas e degradação da enzima (Forde e Cullimore, 1989).

Na sua maioria, os estudos sobre a GS incidiram sobre as alterações da actividade das diferentes isoenzimas, ou na abundância dos diferentes polipeptídeos da GS, ou dos seus mRNAs. Pensa-se que todos estes estudos possam reflectir directa ou indirectamente alterações nos níveis de mRNA e que a regulação da transcrição deve ser o principal ponto de controlo na regulação de alterações na actividade da GS (Forde e Cullimore, 1989). Este pressuposto está na base de muitos estudos moleculares anteriormente descritos.

Embora não se conheça suficientemente o significado biológico ou adaptativo da existência das isoformas da GS, parece que a estratégia adoptada pela plantas superiores no sentido de optimização da assimilação da amónia gerada em diferentes órgãos e possivelmente por vias metabólicas distintas, consiste na expressão diferencial de genes nucleares distintos mas relacionados entre si (Forde e Cullimore, 1989).

Cullimore and Bennett (1988) propuseram que diferentes isoenzimas com propriedades regulatórias diferentes (por exemplo, susceptibilidade a diferentes metabolitos) poderiam ser necessárias para assimilar amónia eficientemente em diferentes tipos de células, ou

compartimentos subcelulares; contudo, o controlo da transcrição, e não da enzima propriamente dita, poderia ter maior importância na regulação da actividade da GS nas plantas, pois seria mais fácil regular os genes separadamente em diferentes tipos de células do que impôr múltiplos controlos a um só gene. Esses facto justificaria a existência de múltiplos genes da GS diferencialmente expressos em diferentes tecidos e diferencialmente regulados por factores como desenvolvimento, luz e metabolitos.

Parece, também, provável que as diferentes subunidades da GS se possam associar numa variedade de isoenzimas hetero-octaméricas o que justificaria as diferentes propriedades (por exmplo termoestabilidade) apresentadas por enzimas isoladas de diferentes tecidos e poderia ter implicações na função da enzima (Forde e Cullimore, 1989). O tipo de associação de várias subunidades ou polieptídeos parece ser específico de determinado órgão ou tecido e poderia estar relacionado com a actividade óptima adequada ao ambiente fisiológico desse tecido. Contudo as bases moleculares dessa associação não têm sido esclarecidas.

Segundo Hirel et al (1993), uma expressão diferencial de diferentes genes, associada à capacidade dos polipeptídeos da GS de formar homo ou hetero-octâmeros, teria como resultado diferentes níveis de actividade necessários num determinado órgão ou tecido da planta

O significado fisiológico da diversidade da regulação genética não está ainda completamente esclarecido (Marsolier e Hirel, 1993). Em muitos casos, a relação exacta entre a actividade de transcrição e a actividade final da enzima não é demonstrada. Apesar disso, existe o conceito geral que as plantas superiores desenvolveram, em resposta à necessidade de assimilar azoto inorgânico em contextos fisiológicos diferentes (catabólico ou anabólico) ou em diferentes estados de desenvolvimento, mecanismos complexos de controlo molecular (Marsolier e Hirel, 1993).

Parâmetros que afectam a GS

Pelo que ficou dito anteriormente, admite-se que a GS está sujeita a um controlo complexo, por factores internos e externos. A GS expressa-se em diferentes órgãos e tecidos e em diferentes graus de desenvolvimento e esta expressão diferencial parece estar sob controlo genético e tem sido correlacionada com diferentes papéis fisiológicos das isoformas da GS.

O efeito de vários parâmetros ambientais sobre a GS tem sido avaliado quer a nível de actividade, quer a nível de acumulação de polipeptídeos, ou de mRNAs. Dos parâmetros mais estudados destacam-se a luz e o fornecimento de azoto.

Luz

Estudos iniciais das propriedades regulatórias das diferentes isoenzimas sugeriam que a actividade da GS2 era controlada pela luz, enquanto que a actividade da GS1 parecia ser independente da luz (McNally e Hirel, 1983). Em várias plantas foi demonstrado que a luz induzia um aumento do nível da GS2 relativamente à GS1 e este efeito foi atribuido à síntese *de novo* da proteína (Mc Nally e Hirel, 1983). Trabalhos já referidos em ervilheira demonstraram a

acumulação de mRNA de GS2 com a exposição à luz e que este efeito era pelo menos parcialmente mediado pelo fitocromo (Edwards e Coruzzi, 1989; Tingey et al, 1988). Em várias plantas estudadas, os genes da GS2 são regulados pela luz estando os mRNAs presentes em níveis muito baixos em plantas estioladas (Becker et al 1992; Cock et al, 1991; Peterman e Goodman, 1991; Sakakibara et al, 1992a).

A luz parece não ter efeito na acumulação de proteínas da GS1 e seus transcritos (Edwards e Coruzzi, 1989; Hirel et al, 1982b; Tingey et al, 1988) que foram detectados em níveis relativamente elevados em tecidos estiolados (Hayakawa et al, 1992; Oaks e Hirel, 1985). Contudo, Sakamoto et al (1990) demonstraram a activação de um gene de GS citosólica mediada pelo fitocromo durante a embebição de sementes de alface, em várias condições de luz (Sakamoto et al 1990).

Azoto

O efeito de diferentes níveis externos de nitrato e amónia na expressão da GS é ainda incerto e parece variar com o tipo de planta estudada ou com a isoforma ou gene individual da GS estudada.

A actividade total da GS aumentava em resposta ao nível de azoto fornecido em *Kalanchoe* (Santos e Salema, 1992) e em resposta ao fornecimento de NH_4^+ em milho (Sugiharto e Sugiyama, 1992).

Em alguns casos, tanto o nitrato como a amónia afectavam quer a actividade quer a acumulação de transcritos da GS (Kozaki et al, 1991; Stanford et al, 1993; Sukanya et al, 1994). Noutros casos, apenas a amónia (Sugiharto e Sugiyama, 1992) ou o nitrato (Redinbaugh e Campbell, 1993; Sakakibara et al, 1992b; Vezina e Langlois, 1989) afectavam a GS.

Como referido anteriormente, Hirel et al (1987) demonstraram que em soja a amónia produzida durante a fixação de azoto nos nódulos por simbiontes ou fornecida exogenamente a raízes não infectadas estimulava a expressão de genes da GS citosólica. Foi concluído que o aumento da expressão da GS de soja se devia a um efeito directo da amónia sobre a transcrição do mRNA da GS (Miao et al, 1991). Contudo, este efeito não foi verificado em outras leguminosas.

Cock et al (1990) demonstraram que a adição de amónia não tinha qualquer efeito no nível de transcritos dos quatro genes de GS normalmente expressos em raízes de *Phaseolus vulgaris* e concluiram que estes genes não são directa ou indirectamente induzidos pelo substrato. Contudo, Hoelzle et al (1992) mostraram que actividade da GS era induzida pelo tratamento com nitrato e amónia em raízes não noduladas de soja, feijoeiro e ervilheira, justificando a aparente discrepância relativamente aos resultados de Cock et al (1990) com a possível existência de uma regulação pós-tradução da GS.

Em *Medicago truncatula* (Stanford et al, 1993) a adição de nitrato conduzia a um pequeno aumento nos níveis mRNAs de dois genes citosólicos da GS na raiz, mas adição de amónia só

induzia o mRNA de um deles; contudo o azoto não foi considerado pelos autores um elemento chave na indução da GS que mostrava uma expressão elevada, independentemente da fonte de azoto.

Destes estudos em leguminosas descritos anteriormente emerge a ideia de que não existe consenso relativo à regulação dos genes da GS pela amónia.

Os estudos moleculares demonstraram que existe uma resposta diferencial dos diferentes genes da GS citosólica ao tratamento com nitrato ou amónia.

Em milho, (Sukanya et al, 1994) o tratamento com amónia ou com nitrato aumentava os níveis de mRNA de uma GS1 (GS1-1) apenas nas raízes e outra (GS1-2) nas folhas e uma terceira forma citosólica (GS1-3) não era afectada.

Em rabanete, (Watanabe et al, 1994) demonstraram que um gene citosólico da GS (Gln1;1) era induzido por azoto inorgânico, enquanto outro (Gln1;3) era reprimido.

Estes e outros trabalhos demonstravam que as diferentes isoformas da GS não apresentavam uma resposta uniforme às adições de azoto, o que sugeria que as regiões promotoras responsáveis para detectar os sinais ambientais são exclusivos de cada isoforma e da cada tipo de célula (Oaks, 1994b).

Apesar das aparentes discrepâncias, no conjunto os resultados demonstram que várias formas de azoto, quer fornecidas exogenamente quer produzidas na planta pela fixação de azoto, pela redução do nitrato ou pela fotorrespiração, têm influência marcada na expressão da GS. No entanto, é ainda necessário estudar se é um efeito específico nos genes da GS responsáveis pelo processamento posterior do azoto e sua assimilação ou se é resultado de uma resposta mais global do estado metabólico da célula (Forde e Cullimore, 1989).

Uma abordagem directa a este problema consiste em determinar qual a sequência que, nos promotores dos vários genes, é responsável pela resposta a NO_3^- ou NH_4^+ (Oaks, 1994b).

Compostos adicionados exogenamente

Estudos com tecido caloso de *Sedum telephium* mostraram que a adição de penicilina ao meio de cultura induzia níveis mais elevados de actividade de GS (e de outras enzimas envolvidas no metabolismo do azoto) durante os primeiros dias de cultura (Santos e Salema, 1989). Este resultado foi relacionado com a estimulação de certos aspectos do metabolismo nos tecidos tratados, nomeadamente na síntese proteica.

Sakamoto et al (1990) notaram um efeito de giberelinas no aumento de mRNA de GS citosólica em sementes de alface durante a embebição; sugeriram, ainda, uma promoção da germinação de sementes de alface na obscuridade pelo GA através da actividade da GS.

A aplicação de etileno, usado como um estimulante da produção de latex, em *Havea brasiliensis* (Pujade-Renaud et al, 1994) provocou um aumento da actividade da GS citosólica e uma correspondente acumulação do respectivo mRNA. Esta indução seria directa ou através de NH_4^+ cujos níveis aumentam com a aplicação de etileno.

"Stress" biótico e abiótico

Em tomateiro infectado por *Pseudomonas syringae* (Pérez-García et al, 1995), foi verificado um aumento de um polipeptídeo correspondente à GS1 em relação à GS2, sugerindo os autores que esta forma poderia ser induzida especificamente pela infecção e que poderia ser considerada uma proteína de defesa durante o "stress" induzido pela patogénese. Os autores sugerem que o gene da GS poderia ser induzido pela amónia que se acumula em consequência da infecção.

Outras situações desfavoráveis têm mostrado influenciar a GS, nomeadamente o "stress salino" (Misra e Dwivedi, 1990; Cordovilla et al, 1994, Cordovilla et al, 1996), a poluição atmosférica (Duball e Wild, 1988; Mandercheid e Jager, 1993), o ozono (Manderscheid et al, 1992) e a deficiência hídrica (Manderscheid e Jager, 1993).

A actividade da GS aumentava na presença de NaCl (Misra e Dwivedi, 1990) em raízes e plantulas de *Phaseolus aureus* em germinação. Contudo em nódulos de *Vivia faba* a salinidade reduzia significativamente a actividade da GS (Cordovilla et al, 1994).

Duball e Wild (1988) investigaram o metabolismo do azoto em folhas de *Picea abies* em áreas onde a floresta demonstrava sintomas de alterações devido possivelmente a poluição (dióxido de enxofre, ozono, etc). As plantas mais danificadas mostravam um aumento significativo da actividade da GS, o que foi considerado pelos autores uma "reacção de defesa" tendo ainda sugerido que a activação da GS podia ser considerado um sintoma de "stress" assumindo um papel relevante na modificação do metabolismo do azoto nomeadamente no "turnover" de proteínas.

Estudos em folhas de herbáceas não mostraram um aumento da actividade da GS em resposta ao ozono (embora fosse verificado um aumento no nível de glutamina e outros aminoácidos) (Manderscheid et al, 1991). Contudo, o ozono mostrou ter um efeito marcado no metabolismo do azoto em *Pinus taeda* (Mandercheid et al, 1992) tendo sido observado um aumento marcado das actividades da GS e da GDH simultaneamente com um aumento dos aminoácidos derivados da via GS/GOGAT (glutamato e glutamina) e dos derivados da transaminação do glutamato (aspartato e alanina).

Também em *Picea abies* foi demonstrado uma aumento da GS em condições de "stress" hídrico (Mandercheid e Jager, 1993). Os parâmetros do metabolismo do azoto, nomedamente a actividade da GS foram também considerados por estes autores indicadores de "stress". Em ambos os casos os autores consideraram que os factores de "stress" desencadearam uma senescência acelerada das folhas e uma retranslocação de nutrientes das folhas em senescência, o que se reflectiria no metabolismo do azoto, nomeadamente num aumento da actividade da GS.

A BATATEIRA

A batateira comum (*Solanum tuberosum* L.) é tetraploide e pertence à família das Solanaceae. É a dicotiledónea mais importante como fonte de alimentação humana, ocupando o

quinto lugar a seguir ao trigo, arroz, milho e centeio (Hooker, 1986). O seu interesse económico advém da produção de caules subterrâneos, ou tubérculos, importantes órgãos de reserva da planta, que são aproveitados na alimentação humana. A batateira é uma planta herbácea, que pode multiplicar-se vegetativamente através de tubérculos subterrâneos sendo por isso considerada vivaz, embora seja cultivada habitualmente como anual. O aspecto morfológico da planta e o ciclo de vida estão esquematizados na Fig. 6.

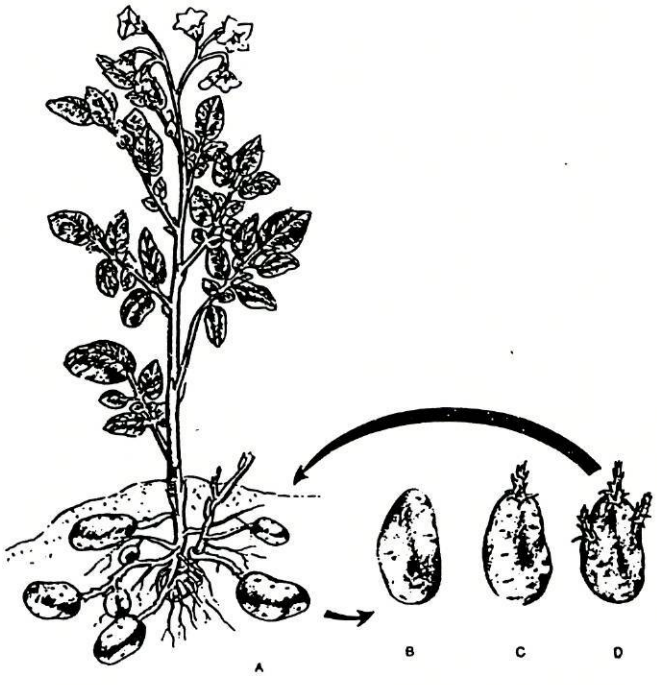


Fig. 6. A batateira propaga-se normalmente por multiplicação vegetativa a partir de tubérculos que têm origem no engrossamento da extremedidade de ramos subterrâneos modificados, os rizomas (A). Uma vez recolhidos os tubérculos entram na fase de dormência (B). Durante o armazenamento, processos de evolução fisiológica interna conduzem ao desenvolvimento dos gomos situados nos "olhos" do tubérculo, e que dão origem aos "brolhos" (C e D) que são caules rudimentares (Adaptado de Ducreux et al, 1986).

Parte aérea da planta

A parte aérea da planta compreende:

i) caules herbáceos, simples ou ramificados e erectos nas primeiras fases de crescimento mas podendo tornar-se prostrados (Burton, 1989);

ii) folhas compostas, imparipinuladas geralmente com um número variável de pares de folíolos primários mais um folíolo terminal e podendo possuir folíolos secundários, mais pequenos entre os folíos primários (Burton, 1989);

iii) flores pentâmeras com corola branca, rosada ou violácea, normalmente agrupadas em cimeiras possuem um ovário súpero bilocular, um estilelete e um estigma bilobado (Cutter, 1992);

iv) frutos, bagas com 1-3 cm de diâmetro, possuindo dois compartimentos e podendo conter 200-300 sementes (Hooker, 1986); as sementes não são usadas para reprodução mas para

estudos de melhoramento genético (Cutter, 1992); algumas variedades não chegam a frutificar, ou os frutos podem não possuir sementes (Hooker, 1986).

Parte subterrânea

A partir da parte subterrânea dos caules desenvolvem-se raízes adventícias que se ramificam com abundância dando origem a um sistema radicular fibroso que inicialmente é superficial mas que pode atingir alguma profundidade.

A parte subterrânea do caule possui folhas rudimentares escamiformes e a partir dos seus gomos axilares originam-se caules secundários (rizomas); na extremidade sub-apical destes formam-se os tubérculos. A formação dos tubérculos envolve o crescimento radial da região correspondente a um entre-nó mas posteriormente outros entre-nós localizados acropetamente iniciam o crescimento radial sendo incorporados no tubérculo em formação (Peterson et al, 1985). Após o início da tuberização, a actividade mitótica do meristema apical do rizoma é muito baixa, pensando-se que não se formam mais gomos nem mais entre-nós; o desenvolvimento do tubérculo depende, maioritariamente, da expansão dos entre-nós pré-existentes no gomo apical (Cutter, 1992). Assim, a tuberização prossegue acropotemante, envolvendo alguma extensão longitudinal mas acima de tudo uma considerável expansão transversal de sucessivos entre-nós (Cutter, 1992).

A extensão logitudinal é mais limitada nos entre-nós mais apicais, de modo que estes são mais curtos na direcção da *coroa* (região apical do tubérculo), o que se evidencia pela presença de numerosos "olhos" muito próximos na região apical do tubérculo maduro (Cutter, 1992; Peterson et al, 1985).

O tubérculo

Morfologia do tubérculo

O tubérculo é um caule modificado com entre-nós muito curtos e distendidos no plano radial, possuindo folhas rudimentares escamiformes dispostas helicoidalmente (Cutter, 1992). Cada folha possui um gomo axilar com a sua própria sequência espiral de primórdios foliares. O conjunto da folhas e dos gomos axilares associados denominam-se "olhos". Cada "olho" consiste na folha escamiforme espandida tangencialmente, o seu gomo axilar, e ainda os gomos axilares de segunda ordem formados nas axilas dos dois primeiros primórdios foliares formados pelo gomo principal (Fig. 7).

A região basal do tubérculo, onde se pode encontrar restos do rizoma denomina-se *hilo* e o polo oposto, onde se localiza o gomo apical do rizoma, por *coroa* (Amaral, 1955) (Fig. 8).

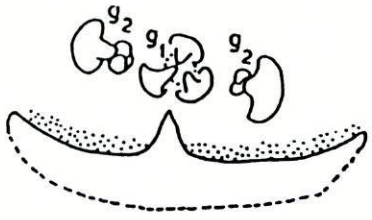


Fig. 7. Esquema de um olho de um tubérculo evidenciando a folha escamiforme tangencialmente expandida e o seu gomo axilar (g1). As duas primeiras folhas deste gomo axilar encontram-se à esquerda e à direita, tangencialmente afastadas, e elas prórias possuem os seus gomos axilares (g2). Adaptado de Cutter (1992).

Anatomia do tubérculo

Descrições detalhadas da anatomia do tubérculo, com revisão e discussão de trabalhos iniciais sobre o assunto podem ser encontradas em Peterson et al (1985) e Cutter (1992).

Na Tabela 1 estão descritas as principais zonas do tubérculo maduro e os diferentes tecidos que as compõem; na Fig. 8 estão, também, esquematizadas as principais zonas que compõem o tubérculo.

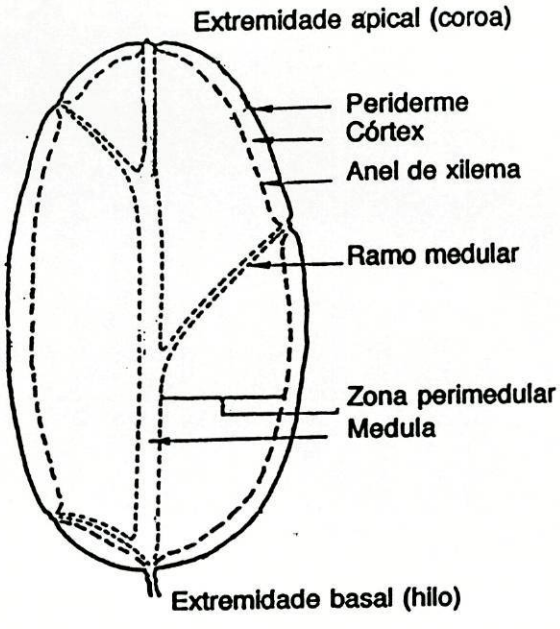


Fig. 8. Esquema ilustrativo de uma secção longitudinal de tubérculo com as principais zonas que o compõem. (Adaptado de Reeve et al, 1970).

TABELA 1. Principais zonas do tubérculo e tecidos que as compõem (adaptado de Reeve el al, 1969).

Zona	**Tecidos**
Periderme	Felema Felogénio (Feloderme)
Córtex	Parênquima cortical
"Anel" vascular	Protofloema externo e parênquima associado; protoxilema e parênquima associado; algum proto-floema interno e parênquima associado e outros tecidos primários floémicos e xilémicos
Zona perimedular	Floema interno e parênquima associado Raios medulares
Medula	Parênquima medular

- Periderme

A epiderme dos tubérculos jovens é substituida por células suberificadas do felema que são formadas por um meristema lateral, o felogénio que é iniciado na epiderme e assentada subepidérmica. A periderme compreende o felogénio e felema; o felema consiste em 6-10 camadas de células de forma paralelipipédica sem espaços intercelulares; aparentemente não se forma feloderme (Peterson et al, 1995). A periderme é uma estrutura especializada de protecção que impede a perda de água pelos tecidos e o ataque por patogénios. Na periderme formam-se lentículas que substituem os estomas originais e que são os únicos locais de trocas gasosas (Cutter, 1992).

- Córtex

As células do parênquima cortical são bastante uniformes no que diz respeito ao tamanho e conteúdo em amido. Possuem mais grãos por célula do que qualquer outro tecido. As células corticais externas podem diferenciar-se em braquiescleroides ou ideoblastos contendo pequenos cristais (Peterson et al, 1995).

- Anel vascular

O anel vascular também chamado "anel de xilema", consiste essencialmente em floema e xilema primários (Reeve et al, 1969).

No tubérculo maduro, a proporção de xilema é pequena (Cutter, 1992). O protoxilema separa-se gradualmente do metaxilema.

A batata possui floema externo e interno que constituem uma grande proporção do tecido vascular (Peterson et al, 1995). O floema interno é característico das Solanaecae e de outras

famílias de dicotiledóneas. Assim, diferenciam-se células de floema externamente e internamente em relação ao xilema. Como resultado do alargamento do tubérculo, e em resultado de divisões celulares, a vasculatura fica fragmentada em numerosos feixes separados por células de parênquima (Peterson et al, 1995) (Fig. 9).

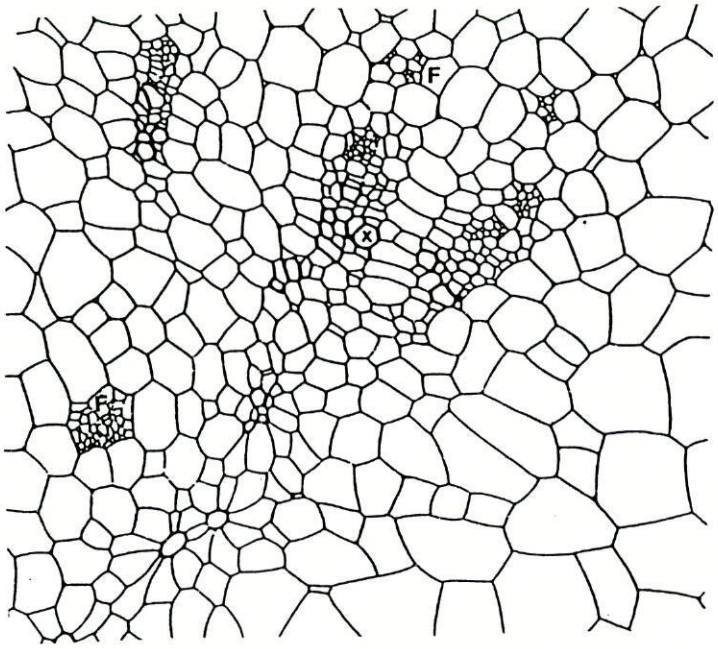


Fig. 9. Esquema de secção transversal de tubérculo maduro, evidenciando os tecidos vasculares (F, floema; x, xilema). Adaptado de Cutter (1992).

- Zona perimedular e medula

Foi observado que as células da medula sofriam divisões celulares e que as células de parênquima da zona entre protoxilema e o floema também se dividiam activamente tendo como resultado a separação do floema em numerosos feixes dispersos no parênquima (Cutter, 1992). Contudo, de acordo com Reeve et al (1973), as divisões na região perimedular (também considerda por Reeve a região do floema interno) são mais importantes do que na medula. Segundo este autor, esta região compreenderia três quartos do total de tecidos do tubérculo. Nesta região os feixes de floema ficam separados por parênquima e pode ocorrer anastomose entre eles. Alguns autores consideram ainda que, concomitantemente com o alargamento do tubérculo, novos feixos de floema se podem originar por actividade de células de parênquima que, não permanecendo meristemáticas, retêm a potencialidade de se dividir (Cutter, 1992).

Segundo Reeve et al (1969) a zona perimedular deve ser distinguida da medula. Na zona perimedular as células de floema interno aparecem em pequenos grupos rodeadas de células de parênquima floémico mais pequenas do que as restantes células de parênquima de reserva e contendo grãos de amido de reduzidas dimensões.

Estudos do floema interno da variedade "Irish Cobbler" de batateira (Peterson et al, 1981) demonstraram que o floema interno consistia em grupos discretos de elementos de tubo crivoso e células de companhia rodeados por células de parênquima. A nível ultraestrutural as células de companhia possuiam citoplasma denso, com numerosas mitocôndrias e plastídios, normalmente sem amido. As células que rodeavam os elementos de tubo crivoso e células de companhia, denominadas "células especializadas de parênquima" possuiam inclusões proteicas e plastídios sem amido ou com pequenos grânulos, em contraste com as células de parênquima de reserva que possuiam amiloplastos com grandes grãos de amido (Peterson et al, 1981).

Em tubérculos maduros a medula consiste em células poliédricas com baixo teor de amido. A medula está em continuidade com os gomos axilares dos "olhos" através de ramificações (Reeve et al, 1969).

Desenvolvimento da batateira

O desenvolvimento da planta ocorre em consequência da interacção entre o potencial genético da planta e o ambiente, mas o padrão de organização e da resposta morfogénica e fisiológica ao ambiente é bastante conservado em vários cultivares (Moreno, 1985).

Fases dos ciclo de vida da planta

O ciclo vegetativo anual da batateira pode dividir-se em quatro fases, a partir da plantação do tubérculo em germinação (Soltner, 1980).

1- Fase de crescimento até ao início da formação do tubérculo que pode coincidir com a diferenciação floral. Verifica-se o crescimento dos rizomas e das ramificações aéreas.

2- Fase de tuberização em que nas extremedidades dos rizomas se desenvolvem os tubérculos que continuam o processo de maturação simultaneamente com o aumento da extensão foliar. A indução da tuberização é controlada pelo fotoperíodo e o estímulo é percebido pelas folhas. A resposta ao fotoperíodo interactua com outros estímulos ambientais como temperatura, intensidade luminosa e nível de fertilização azotada. Factores genéticos são também determinantes, assim com o estado fisiológico do tubérculo-semente (Ewing, 1985).

3 - Fase de dormência, na qual os tubérculo não germinam mesmo colocados em condições óptimas (luz, tempertatura, humidade); há autores que denominam esta fase "período de repouso", isto é, em que os gomos do tubérculo maduro não se desenvolvem devido a causas endógenas (Hemberg, 1985). Findo o período de repouso, os gomos possuem capacidade de crescimento, mas tal geralmente não se verifica, devido a condições desvaforáveis como temperatura e fotoperíodo, ficando então quiescentes, ou no "estado dormente", por falta de condições externas propícias ao desenvolvimento (Hemberg, 1985). Esta terminologia tem sido discutida, considerando Hemberg (1985) que dormência é todo o período em que os gomos não abrolham, quer por causas internas quer externas, restringindo o termo "repouso" ao estado em que o crescimento está inibido por causas internas. Há autores que consideram que não há um veradeiro período de "repouso" mas uma actividade metabólica contínua cujo equilíbrio com as

condições ambientais determinam o crescimento (Burton, 1989). Contudo, e como a distinção entre os dois tipos de factores pode ter utilidade prática, Burton (1989) propõe que se use "dormência" quando não há crescimento por qualquer razão e "endodormência" quando a falta de crescimento visível ocorre em condições favoráveis, portanto devido a factores endógenos.

4- Fase de "germinação" em que se verifica o abrolhamento dos tubérculos, desde que colocados em condições favoráveis; os gomos crescem dando origem a brolhos que são na realidade caules rudimentares (Burton, 1989) com entre-nós curtos e folhas atrofiadas, mas que se desenvolvem dando origem à parte aérea da planta e, na base, às raízes adventícias e rizomas.

Zonas de crescimento da batateira

As zonas de crescimento da batateira são o ápice caulinar, os ápices dos gomos axilares e dos ramos, ápices apicais dos rizomas, os gomos dos "olhos" e os ápices dos brolhos (Moreno, 1985). Os diferentes pontos de crescimento, embora estruturalmente semelhantes, respondem de modo diferente em termos de organogénese e morfogénese e essa resposta é condicionada não só por sinais endógenos mas, também, por estímulos ambientais. Manipulando as condições ambientais é, por exemplo, possível induzir a tuberização em gomos axilares de segmentos caulinares.

As folhas são os órgãos determinantes para percepção dos estímulos ambientais e indução de respostas morfogénicas. Além de locais de percepção de estímulos, as folhas ("fontes") fornecem nutrientes para o crescimento dos tubérculos e da parte aérea ("recebedores").

Durante o crescimento dos tubérculos ocorre um transporte activo de nutrientes das folhas para o tubérculo. Este acumula carbohidratos, proteínas, azoto não proteico, minerais, etc. Dos componentes azotados não proteicos acumulados fazem parte, essencialmente, aminoácidos livres e amidas (Steward et al, 1981).

A transição "recebedor"-"fonte"

Os órgãos das plantas podem ser classificados em dois grupos de acordo com a capacidade de exportação de assimilados - "fontes" - ou importação a partir de outros órgãos - "recebedores". Os órgãos importadores podem ser "recebedores" metabólicos, onde os assimilados importados são utilizados essencialmente para o crescimento dos meristemas ou das raízes, ou "recebedores" de reserva como os tubérculos ou as sementes (Frommer e Sonnewald, 1995). Os órgãos exportadores são por exemplo as folhas maduras e, durante a germinação, as sementes, os cotilédones e os tubérculos que funcionam como fontes de carbohidratos e de azoto.

O desenvolvimento da planta produz altrações que se traduzem na capacidadade dos órgãos em exportar ou importar nutrientes; enquanto alguns são "recebedores" irreversíveis, como as raízes outros sofrem transições de "recebedores" para "fontes".

Na batateira foram descritas quatro transições "recebedor"-"fonte" (Frommer e Sonnewald, 1995):

i) durante o desenvovimento do brolho estiolado em caule verde;

ii) durante a maturação das folhas;

iii) nas sementes;

iv) nos tubérculos.

Os tubérculos são "recebedores" muito fortes durante o seu desenvolvimento; depois de separados da planta e após a fase de dormência constituem importantes "fontes" para os brolhos em desenvolvimento. Estas transições são acompanhadas por alterações na expressão de vários genes e na composição proteica dos tubérculos. Os tubérculos acumulam carbohidratos, proteínas, compostos azotados não-proteicos, minerais, etc. Os compostos azotados não proteicos são essencialmente aminoácidos livres e amidas (Steward et al, 1981). A proporção de aminoácidos livres compreende cerca de 40-60 % do azoto total do tubérculo e é composta essencialmente pelas amidas glutamina e asparagina (Desborough, 1985). A predominância destas amidas no tubérculo sugere que estas são as formas de transporte de azoto das folhas para os tubérculos (Burton, 1989). Estas amidas, juntamente com os aminoácidos derivados das formas translocadas são consideradas um reservatório de azoto a partir dos quais são sintetizadas as proteínas e outros compostos azotados. Os compostos de transporte podem ser utilizados directamente mas normalmente sofrem interconversões fornecendo grupos amina para a síntese de aminoácidos e transaminação para posterior síntese proteica.

Quando o fornecimento pela folha excede o consumo a proporção de aminoácidos livres aumenta, diminuindo quando o fornecimento é limitado (Burton, 1989). O aumento da fertilização azotada também se reflecte num aumento do teor de amidas do tubérculo.

As plantas absorvem o nitrato do solo e a maior parte é translocado via xilema na forma inorgânica para as folhas e ápices caulinares onde é assimilado. O nitrato pode ser também acumulado na maior parte das plantas nos vacúolos das células das raízes e das partes mais velhas dos caules. Na batateira verificou-se que NO_3^- era acumulado nos caules e nas folhas das posições inferiores (Millard e MacKerron, 1986) e este azoto podia ser posteriormente redistribuído para os ramos laterais e para o tubérculo em crescimento. Na maioria das plantas anuais a maior parte do azoto é absorvido durante a fase vegetativa e é posteriormente reutilizado na fase reprodutiva. O azoto absorvido em excesso pode ser acumulado sob a forma de NO_3^- ou proteína, principalmente a RuBisCO (Millard e Catt, 1988). Foi demonstrado que uma maior proporção de azoto era acumulado na forma de RuBisCO do que de nitrato e que enquanto que o nitrato se acumulava nas folhas mais velhas a RuBisCO acumulava-se nas folhas mais jovens (Millard e Catt, 1988). Durante o crescimento do tubérculo verificava-se uma exportação de nitrato (particularmente das plantas sujeitas a excesso de fornecimento de azoto) e de azoto proveniente de RuBisCO. Já tinha sido demonstrado que esta enzima sofria uma degradação mais rápida do que outras enzimas durante a senescência foliar e que o N

proveniente da degradação da RuBisCO contribuia para o crescimento de outro órgãos nomeadamente de reprodução (Millard, 1988).

Millard e Catt (1988) concluiram que *S. tuberosum* apresentava uma capacidade de utilização preferencial da RuBisCO durante a senescência foliar superior às outras espécies e que o azoto proveniente da RuBisCO correspondia a uma percentagem significativa do azoto total encontrado nos tubérculos quer nas plantas com suprimento excessivo de N quer nas submetidas a deficência de N. Isto levou à conclusão importante de que as plantas submetidas a deficiência de N tinham capacidade de utilizar azoto da RuBisCO como fonte de N para o crescimento dos órgãos vegetativos de reprodução (tubérculos) a um nível comparável às plantas crescidas sem carência de azoto. Aqueles autores salientaram que a capacidade de armazenamento de azoto nas folhas e a sua re-utilização para o crescimento do tubérculo é um importante processo quer para as plantas deficientes em azoto quer para as plantas às quais é fornecido excesso de azoto. Este conceito é corroborado por Millard (1988) que discrimina entre "acumulação" de N que ocorre quando o fornecimento de N excede as necessidades e "armazenamento" de N o que implica que o N de um tecido pode ser utilizado para crescimento e manutenção de outro; deste modo o "armazenamento" pode ocorrer em plantes submetidas a deficiência de N, mas não a "acumulação". Como já descrito, as formas de armazenamento são o nitrato e as proteínas, particularmente a RuBisCO, mas embora o armazenamento de nitrato envolva menores custos energéticos para a planta o armazenamento em forma de proteína oferece vantagens como maximizar a assimilação de carbono, evitar problemas com variação da turgescência, permitir a redução de nitrato e síntese proteica nas folhas mais jovens e mais iluminadas durante a fotossíntese e subsequente mobilização de N das folhas mais velhas (Millard, 1988). A reciclagem interna de azoto tem sido descrita como importante em condições de baixo suprimento de azoto e a senescência foliar tem sido associada com deficiência de N, como consequência da remobilização de N para o crescimento reprodutivo (Thomas e Stoddart, 1980). Contudo Millard (1988) observou que, embora a deficiência de N cause senescência foliar devido à remobilização de N, existe em qualquer circunstância uma senescência foliar programada como uma estratégia para evitar ou reduzir o "stress". Assim, a forma de armazenamento de azoto em proteínas metabolicamente activas parece ser particularmente importante para o crescimento de estruturas reprodutoras, particularmente em plantas submetidas a deficiência de azoto onde não se verifica "acumulação" de N. Contudo, a senescência seguida de transferência para os órgãos reprodutivos parece ser vital na economia de azoto da planta quer em situações de deficiência quer em situações de excesso de suprimento de N (Millard, 1988).

A análise dos exsudados de floema demonstrou que as principais formas de azoto exportadas pelas folhas são as amidas (Stoddart e Thomas, 1982). Contudo, estas não reflectem a composição em aminoácidos da RuBisCO o que implica que além da proteólise, na utilização de N armazenado, estão envolvidos processos de interconversão metabólica de aminoácidos a amidas antes da exportação da folha (Thomas e Stoddart, 1982). *O estudo das enzimas*

envolvidas nestas interconversões e redireccionamento de fluxos de N parece ser assim de particular importância, particularmente em órgãos onde ocorrem fases cruciais de transição "recebedor"-"fonte".

TÉCNICAS *IN SITU* PARA LOCALIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ENZIMAS NAS PLANTAS

A visualização dos padrões temporais e espaciais de acumulação de proteínas específicas tem vindo a adquirir uma importância crescente pois permite, em associação com outras técnicas bioquímicas e fisiológicas, ampliar a compreensão de processos variados, como:

- a localização de determinada proteína em células (ou compartimentos subcelulares, no caso da microscopia electrónica), tecidos ou órgãos específicos, pode permitir obter indicações sobre a função dessa proteína;
- a expressão diferencial em determinadas células ("cell-specific expression") de diferentes isoenzimas da mesma família tem fornecido dados importantes para explicar a existência de múltiplas isoenzimas nas plantas;
- a localização de enzimas de função conhecida permite uma caracterização mais rigorosa da função de tecidos e células; permite mapear e relacionar diferentes vias metabólicas;
- a identificação de tipos de células pode fazer-se pela expressão de proteínas marcadoras conhecidas - por vezes tecidos aparentemente homogénios são, na realidade compostos por diferentes tipos de células;
- permite a ilustração de padrões espaciais de distribuição de proteínas específicas em processos como diferenciação celular e desenvolvimento;
- o padrão de expressão de proteínas marcadoras pode constituir um diagnóstico valioso de determinadas situações - por exemplo a presença de uma proteína cujo gene foi introduzido numa planta transgénica.

A localização de proteínas, em conjunto com técnicas moleculares, como a localização de mRNA, pode ser usada para determinar padrões de regulação de expressão génica. Com a divulgação de técnicas de transformação de plantas e de utilização de genes marcadores ("reporter genes") associados aos promotores de genes de determinadas proteínas, é possível estudar a maneira como esses promotores dirigem a expressão dos genes marcadores em determinadas células, permitindo caracterizar a regulação da expressão de genes individuais em células específicas e, assim, caracterizar estas, a nível molecular, relativamente aos genes que expressam (Edwards e Coruzzi, 1990).

Localização de proteínas nas plantas através de imunocitoquímica ultraestrutural

O uso de anticorpos para visualizar a localização de moléculas específicas em células e tecidos é uma abordagem bem estabelecida e extremamente poderosa (Hawes, 1988).

As proteínas, glicoproteínas e outros compostos de plantas são poderosos antigénios, o que permite a produção em animais de anticorpos específicos contra essas moléculas purificadas (Benhamou e Asselin, 1993). Esses anticorpos constituem intrumentos preciosos, utilizados em técnicas imunológicas em geral e imunocitoquímicas, em particular. As técnicas imunohistoquímicas e imunocitoquímicas puderam desenvolver-se (principalmente a partir dos anos 80) graças à disponibilidade crescente de anticorpos quer policlonais, quer monoclonais.

Resumidamente, o processo de imunolocalização, quer para microscopia óptica quer para electrónica, requer: produção de anticorpos específicos, preparação do material biológico (fixação, impregnação, obtenção de cortes), incubação do material com os anticorpos específicos, remoção dos anticorpos ligados inespecificamente à amostra e detecção, a qual envolve um marcador que permita visualizar a localização das imunoglobulinas. O marcador de eleição no caso da microscopia electrónica é o ouro coloidal (Salema e Santos, 1992).

Este processo de imunolocalização, quando associado ao microscópio electrónico, permite a uma inequívoca identificação do tipo de célula ou da compartimento subcelular onde se localizam os antigénios de interesse.

O sucesso desta técnica depende de (Benhamou e Asselin, 1993):

- elevada especificidade dos anticorpos;
- preservação da antigenicidade das proteínas;
- preservação da estrutura celular;
- grau mínimo de interacção não específica entre os anticorpos e o tecido incluido em resina.

Um ponto crucial nesta técnica é o equilíbrio entre a preservação ultraestrutural e a retenção da antigenicidade das moléculas às quais os anticorpos se ligam (Herman, 1988).

A resolução deste problema passa basicamente por três abordagens diferentes (Moore, 1995; Salema e Santos, 1992):

- uma técnica mais generalizada e aqui considerada em mais detalhe, consiste em incubar com os anticorpos o material, fixado e *após impregnação* com resina, já nos cortes ultrafinos; embora a fixação e a impregnação necessárias para uma boa preservação sejam processos prejudiciais à retenção da antigenicidade é, geralmente, possível encontrar as condições que permitem a obtenção de resultados positivos (Moore, 1995).

- outra, consiste na aplicação de anticorpos *antes da impregnação* e envolve uma fixação fraca e uma permeabilização dos tecidos para permitir o acesso dos anticorpos aos locais de ligação; a antigenicidade é assim preservada mas, além de uma preservação morfológica deficiente, a difusão de moléculas grandes (como os anticorpos) no tecido é muito dificultada

pela parede celular, apresentando esta técnica vantagens apenas quando se trata de antigénios na superfície celular (Moore, 1995).

- uma terceira abordagem, que tem como objectivo preservar a antigenicidade, é a aplicação de anticorpos a cortes ultrafinos de material congelado (Tokuyasu, 1986) obtidos por crio-ultramicrotomia em que o material não é submetido a desidratação nem impregnação antes da imunoreacção. Os cortes são descongelados antes da reacção imunológica e deste modo a acessibilidade dos anticorpos aos antigénios é maior do que no caso de tecido impregnado (Tokuyasu, 1986). Contudo, esta técnica requer material especializado e dispendioso e, particularmente no caso das plantas, não permite obter cortes com boa qualidade (Herman, 1988; Moore, 1995).

Anticorpos

Os anticorpos são proteínas, as imunoglobulinas, produzidas no organismo dos animais em resposta à presença de moléculas estranhas. Estruturalmente são compostas por uma ou várias unidades em forma de **Y** sendo cada uma dessas unidades constituída por quatro polipeptídeos: duas cadeias pesadas e duas leves ligadas por pontes de dissulfureto (Harlow e Lane, 1988) (Fig. 10).

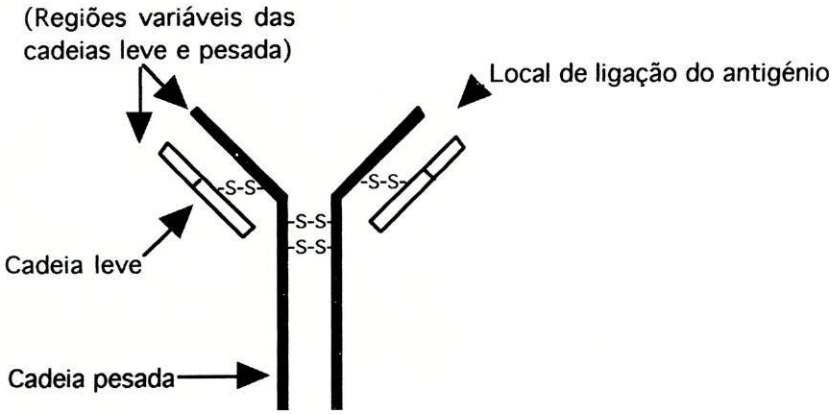


Fig. 10. Esquema ilustrativo da estrutura de uma molécula de anticorpo típica. Adaptado de Harlow e Lane (1988).

Quer as cadeias leves quer as pesadas compreendem regiões variáveis e regiões constantes. As regiões variáveis de uma cadeia leve e de uma cadeia pesada constituem o local de ligação ao antigénio e a heterogeneidade destas regiões variáveis é que constitui um reportório imenso de locais diferentes que permitem uma resposta imunitária efectiva (Harlow e Lane, 1988).

As IgMs e principalmente as IgGs (que são as imunoglobulinas mais abundantes no soro) e os seus fragmentos, são os elementos mais utilizados em imunolocalização (Harris, 1994).

Cada imunoglobulina (IgG) é composta por uma única unidade estrutural em forma de **Y** a qual possui três domínios proteicos. Os braços do **Y** constituem dois domínios idênticos e o

terceiro é a base do **Y**. Cada braço possui um local de ligação ao antigénio sendo, assim, cada IgG uma molécula bivalente. A digestão com papeína de uma imunoglobulina dá origem a dois fragmentos monovalentes idênticos (fragmentos Fab) correspondentes aos braços do **Y**, cada um com um local de ligação ao antigénio, e um fragmento cristalizável (Fc) correspondente à cauda do **Y**. A digestão com pepsina dá origem a um fragmento bivalente F(ab')2 que corresponde a dois fragmentos Fab ligados covalentemente, e a subfragmentos Fc (Harlow e Lane, 1988).

Em estudos de imunocitoquímica em plantas têm sido utilizados quer anticorpos policlonais[1] quer monoclonais[2] existindo em ambos os casos vantagens e desvantagens relativas. Como os anticorpos policlonais são uma população heterogénea dirigida contra uma variedade de epítopos no antigénio, existe uma elevada probabilidade de o antisoro reter a reactividade, mesmo após os vários processo de preparação a que é submetido o material para observação ao microscópio (Hawes, 1988). Contudo, é preciso ter em conta que que um soro policlonal contem múltiplos anticorpos de especificidade desconhecida. Mesmo o soro do animal não imunizado dá origem a uma marcação generalizada, quando em elevadas concentrações. Isto pode ser devido a ligação não específica às células mas também pode ser devido a interacções específicas ocasionais (Harlow e Lane, 1988).

Para resolver este problema foi proposto (Harlow e Lane, 1988):

1- Baixar as concentrações destes anticorpos para valores inferiors aos níveis de detecção por titulação cuidadosa.

2- Purificar os anticorpos por imuno-afinidade

Os anticorpos policlonais, uma vez que reagem com uma grande variedade de epítopos no antigénio, incluindo epítopos resistentes à desnaturação, dão geralmente bons resultados com tecidos fixados com aldeídos (Harlow e Lane, 1988).

No caso dos monoclonais, obtem-se uma família de anticorpos em que cada membro é dirigido contra um único epítopo. Mas, geralmente, os monoclonais não dão bons resultados em imunocitoquímica porque o epítopo que reconhecem fica muitas vezes inacessível na estrutura celular, ou é destruído durante a fixação (Harlow e Lane, 1988). Além disso, a especificidade de marcação com estes anticorpos pode ser reduzida, se o epítopo que reconhecem ocorrer também noutras macromoléculas existentes na célula (Harlow e Lane, 1988; Hawes, 1988). Contudo, podem ser testados bioquimicamente ou citoquimicamente contra o antigénio de interesse sendo possível obter um anticorpo que reaja com o material

---

[1] Anticorpos policlonais
São obtidos por imunização de animais como coelho, cabra, carneiro, etc e podem ser usados no soro, após remoção das células sanguíneas, ou purificados por vários métodos. Consistem numa população heterogénea de anticorpos originados por células diferentes e reagem com um grande número de determinantes antigénicos, presentes na molécula antigénica (Harris, 1994).

[2] Anticorpos monoclonais
São produzidos por linhagens imortais de células, originadas pela fusão de células secretoras de anticorpos com células de mieloma, não secretoras. As células secretoras são linfócitos B de baço, ou de nódulos linfáticos de animais imunizados (normalmente ratos). Os hibridomas são mantidos em cultura constituindo uma fonte inesgotável de anticorpos. Cada hibridoma produz um anticorpo monoclonal, que reage apenas com um único determinante antigénico, ou seja, reconhece apenas um epítopo (Harris, 1994).

depois de tratado para microscopia. Quando cuidadosamente escolhidos, o seu uso pode significar um aumento muito grande no sinal obtido, para um determinado antigénio, se a sua ligação não sofrer competição (Harlow e Lane, 1988) e esse aumento de sinal pode ser determinante para a detecção. Podem também possuir um grau muito elevado de especificidade (com baixos níveis de marcação inespecífica) (Harlow e Lane, 1988).

Fragmentos de anticorpos de vários tipos têm vindo a ser crescentemente utilizados sendo os mais comuns os fragmentos Fab, conjugados com ouro coloidal. A utilização de fragmentos de anticorpos, pelas suas dimensões mais reduzidas, vai ao encontro das necessidades de uma maior precisão na localização e de uma melhor penetração dos anticorpos na amostra (Ribrioux et al, 1996).

Alguns fragmentos de anticorpos têm sido clonados e modificados por engenharia genética produzindo-se assim quantidades ilimitadas de fragmentos recombinantes em *Escherichia coli* que, para além de intensamente usados em terapia tumural, tem recentemente sido aplicados na visualização de biomoléculas em microscopia (Ribrioux et al, 1996). Os fragmentos de menores dimensões até hoje utilizados são os Fv que consistem na associação não covalente apenas das regiões variáveis da cadeia leve (V_L) e da cadeia pesada (V_H) das moléculas de anticorpos e são os menores fragmentos que retêm ligação monovalente ao antigénio. Estes fragmentos podem ser detectados por anticorpos secundários marcados, mas, recentemente, têm sido directamente marcados com nanopartículas de ouro ("Nanogold", ver à fente) ou fluorocromos, permitindo reduzir o número de passos na imunocitoquímica e as dimensões dos complexos usados na detecção, com concomitante aumento da resolução e capacidade de penetração (Ribrioux et al, 1996).

Preparação da amostra

Têm sido descritos numerosos tipos de fixação assim como de meios de inclusão para imunocitoquímica ultraestrutural. Estes métodos procuram o difícil equilíbrio entre a preservação da ultraestrutura e a melhor retenção da antigenicidade.

- Fixação

A fixação em imunocitoquímica tem como objectivos principais (Salema e Santos, 1992):

1- preservar a estrutura da célula tão próximo quanto possível da sua condição *in vivo*, mantendo a morfologia original, e evitando deslocamento, ou perda de moléculas;

2- manter a possibilidade de o anticorpo reconhecer o antigénio.

O melhor protocolo para equilibrar estes dois objectivos depende em larga medida do sistema a ser estudado e deve ser determinado empiricamente em cada caso (Moore, 1995).

A fixação pode ser feita por métodos químicos ou físicos como o arrefecimento rápido da amostra (Salema e Santos, 1992). Os métodos químicos são os mais utilizados, uma vez que a criofixação pode não permitir uma retenção da integridade estrutural em células altamente vacuolizadas (Harris, 1994). A grande vantagem desta técnica seria a manutenção nos seus

lugares das moléculas solúveis, facilmente deslocadas ou extraídas com outros tratamentos (Moore, 1995; Salema e Santos, 1992).

Uma técnica recentemente generalizada parece ser a criossubstituição, em que o tecido é submetido a uma fixação extremamente rápida pelo frio (actualmente com técnicas de congelação a alta pressão) estabilizando todos os componentes celulares simultaneamente (Moore, 1995); após a congelação o gelo é removido por metanol, ou acetona, a -80°C e as amostras são posteriormente impregnadas em resina, sendo a incubação com os anticorpos feita em cortes do material impregnado.

Na fixação química utilizam-se geralmente aldeídos em solução tampão, sendo os mais utilizados o dialdeído glutaraldeído e o monoaldeído formaldeído (Salema e Santos, 1992).

O glutaraldeído é um dialdeído (possui dois grupos reactivos) muito utilizado em microscopia electrónica convencional que, permitindo facilmente o estabelecimento de reacções cruzadas entre as moléculas proteicas, tem como resultado uma boa preservação ultreaestrutural (Salema e Santos, 1992). Contudo, o estabelecimento desta malha reduz a penetração de reagentes nos tecidos (e consequentemente dos anticorpos) (Salema e Santos, 1992). Além disso, pode produzir severas alterações no antigénio que têm como resultado uma perda de antigenicidade, pensando-se que se perdem cerca de metade dos locais antigénicos em relação à fixação com formaldeído (Herman, 1988). Deste modo, utiliza-se normalmente em imunocitoquímica em baixas concentrações e por reduzido período de tempo (Salema e Santos, 1992). Contudo, alguns anticorpos reagem do mesmo modo com o antigénio fixado com glutaraldeído (Moore, 1995). Com anticorpos policlonais, particularmente, existe a probabilidade de uma parte deles reconhecer epítopos no antigénio fixado. Um bom método de prever a antigenicidade do tecido fixado consiste em testar a reactividade do anticorpo em antigénios imobilizados em nitrocelulose (Moore, 1995).

O formaldeído é menos eficaz na preservação das estruturas celulares (Salema e Santos, 1992) e a fixação com este aldeído é reversível (Herman, 1988) mas penetra rapidamente nos tecido (Hawes, 1994) e é menos agressivo relativamente à perda de antigenicidade (Salema e Santos, 1992). Normalmente utiliza-se uma mistura de formaldeído e glutaraldeído em concentrações baixas, que na maior parte dos casos permite a retenção da antigenicidade suficiente para permitir a imunoreacção, com preservação razoável da ultraestrutura celular (Salema e Santos, 1992). O formaldeído usa-se geralmente a 2,5-4% e o glutaraldeído a 0,5-1,5%, em tampão a pH adequado, geralmente 6,8 a 7,4 (Harris, 1994; Salema e Santos, 1992).

Tem sido utilizada uma grande variedade de tampões nomeadamente o tampão fosfato e o Tris (Harris, 1994). Porém, em material vegetal, o tampão PIPES provou ser o que melhor contribuía para uma menor perda de clorofilas e proteínas (Salema e Brandão, 1973) pelo que o seu uso se generalizou quer em microscopia convencional quer em imunocitoquímica (Hawes, 1988).

A pós-fixação com tetróxido de ósmio é geralmente desaconselhada em imunocitoquímica, pois liga-se covalentemente às proteínas, alterando a sua conformação e bloqueando os locais de ligação do anticorpo (Erickson et al, 1993).

A imersão de um tecido fixado por aldeídos em acetato de uranilo, antes ou durante a desidratação (contrastação *en bloc*) é usada para aumentar o contraste (Erickson et al, 1993). O acetato de uranilo, usado deste modo, apresenta também propriedades fixadoras (Silva et al, 1971) que assentam em interacções electrostáticas e não covalentes obviando, portanto, ao problema das alterações conformacionais (Erickson et al, 1993). É, por isso, por vezes usado como um fixador secundário, após a fixação por aldeídos, para obtenção de uma melhor preservação morfológica do tecido permitindo concomitantemente a imunomarcação de várias proteínas (Erickson et al, 1993).

- Impregnação

Após fixação, o material é sujeito a desidratação e impregnado com resinas (Salema e Santos, 1992) e posteriormente é seccionado. Contudo, somente os locais antigénicos à superfície do corte estão disponíveis para a reacção com os anticorpos e não em toda a sua espessura (Erickson et al, 1993). A resolução e a integridade são geralmente boas, mas o número de locais antigénicos é baixo e consequentemente a densidade de marcação também (Erickson et al, 1993).

Em estudos de imunocitoquímica têm sido utilizadas quer resinas epoxi quer acrílicas (Harris, 1994). Estas últimas mais hidrofílicas, são utilizadas com maior frequência pois permitem uma maior retenção da antigenicidade (Salema e Santos, 1992) e são mais permeáveis a soluções aquosas. As mais generalizadas são a Lowicryl K4M (Agar, Polyscience), LR White (London Resin Company) e mais recentemente a Unicryl (British Biocell). A Lowicryl K4M necessita de UV para polimerizar mas, como esta reacção de polimerização é exotérmica, deve ser efectuada em câmara fria. Esta resina não é considerada a mais adequada para material vegetal (Harris, 1994), tendo-se generalizado o uso da LR White (Newman, 1987). Esta última resina não é tóxica e possui uma baixa viscosidade, o que facilita a infiltração dos tecidos vegetais. Teoricamente permite uma desidratação mais fraca, podendo parar-se na solução de álcool a 70%, o que contribui para manter o estado nativo das moléculas, mas tipicamente o tecido vegetal necessita de um maior grau de desidratação para que se verifique uma impregnação eficiente (Moore, 1995). A impregnação pode ser feita a baixas temperaturas ou à temperatura ambiente e pode polimerizar em estufa à temperatura relativamente baixa de 50° C ou, submetida a vácuo, a 37°C o que pode ser necessário em certos casos para preservar a antigenicidade.

Recentemente a resina Unicryl foi apresentada (Scala et al, 1992) (com a denominação Bioacryl) como possuindo características únicas de corte, de tal modo que componentes celulares como proteínas e ácidos nucleicos ficariam expostos na superfície de corte e, assim, acessíveis a anticorpos ou a sondas de ácidos nucleicos. A polimerização pode realizar-se por

acção dos UV, no frio (4°C) ou em estufa a 55°C. Estudos recentes com esta resina descrevem uma melhor preservação ultraestrutural e uma maior eficiência na imunodetecção (Goping et al, 1996).

Reacção imunológica em cortes de material impregnado

A marcação com anticorpos de cortes ultrafinos do material já impregnado em resina é o método mais utilizado (Moore, 1995) embora a impregnação possa tornar potenciais alvos reactivos inacessíveis aos anticorpos.

A *especificidade* e a *reactividade* do anticorpo determinam o sucesso do resultado. A especificidade dos anticorpos deve ser determinada, no mínimo, por "western blot" de gel de electroforese nativo ou com SDS (Herman, 1988).

O grau de imunomarcação depende do *título* e da *diluição* do anticorpo e, ainda, do *período de tempo* e da *temperatura* de incubação existindo uma relação inversa entre o tempo de incubação necessário e o título do anticorpo (Harris, 1994).

A reacção imunológica e a sua visualização pode ser efectuada por técnicas muito variadas envolvendo apenas o anticorpo primário (processo directo) ou sistemas, mais ou menos complexos, aos quais é necessário acoplar um "marcador" que torne possível a localização dos anticorpos especificamente ligados aos locais antigénicos (processos indirectos) (Harris, 1994; Salema e Santos, 1992).

Nos processos directos os anticorpos primários são conjugados com um marcador que pode ser uma enzima, metaloproteína, ouro coloidal ou marcador radioactivo (Salema e Santos, 1992). Este método é rápido e apresenta um baixo nível de reacções inespecíficas que dependem largamente da qualidade do anticorpo (Harris, 1994). Contudo, não é sensível e não permite amplificação do sinal. Além disso é laborioso pois requer a marcação de cada anticorpo primário, pelo que este não é um processo muito utilizado. Contudo, o uso de anticorpos marcados directamente (ou os seus fragmentos) favorece a *resolução* da marcação, dadas as menores dimensões do complexo a detectar (Ribrioux et al, 1996).

Muito mais correntes são os processos indirectos em que o anticorpo primário não marcado, que se liga especificamene ao antigénio, é detectado por um anticorpo secundário marcado ou por proteína-A conjugada com um macador. Este processo é mais versátil e permite uma amplificação do sinal (Harris, 1994) uma vez que o anticorpo possui vários determinantes antigénicos aos quais so pode ligar o anticorpo secundário marcado permitindo aumentar a sensibilidade do método (Knox et al, 1980).

O anticorpo secundário é obtido num animal diferente daquele em que se obteve o anticorpo primário por hiperimunização com gamaglobulinas deste (Salema e Santos, 1992). É possível, assim, obter comercialmente anticorpos secundários já conjugados com marcadores contra uma variedade de IgGs de vários animais. Assim, inúmeros anticorpos primários produzidos, por exemplo, em coelho podem ser detectados com o mesmo anticorpo secundário produzido noutro animal (por exemplo, cabra) imunizado contra IgGs de coelho (Salema e Santos, 1992).

A proteína A, da parede celular de *Staphylococcus,* liga-se a imunoglobulinas de várias espécies e pode ser conjugada com um marcador podendo substituir o anticorpo secundário (Harris, 1994).

Existem ainda métodos indirectos baseados na afinidade específica que existe entre a biotina e a avidina, ou estreptavidina. Nestes casos, um anticorpo secundário biotinilado é reconhecido por avidina, ou estreptavidina, conjugadas com um marcador (Harris, 1994).

Um problema importante na imunoreacção é a ligação inespecífica quer do anticorpo primário quer do secundário. A marcação inespecífica pode ser geral, por todo o corte, ou pode ser resultado de interacções hidrofóbicas ou iónicas dos anticorpos com algumas estruturas celulares (Harris, 1994). Para obviar a este problema devem ser tomadas medidas que abrangem dois aspectos (Hawes, 1988):

1- Determinar empiricamente qual a concentração óptima de anticorpo. Uma concentração demasiado elevada (>1mg/ml) conduz a uma marcação inespecífica excessiva ("background" ou "ruído de fundo") sem aumentar a marcação do antigénio. Para aumentar a marcação específica é por vezes preferível incubar o material com anticorpos muito diluídos durante longos períodos de tempo (por exemplo, durante a noite ou mais) do que incubar por pouco tempo com elevadas concentrações de anticorpos

2- Os cortes devem ser tratados com uma solução que bloqueie os locais de ligação inespecífica dos anticorpos. Este passo de *bloqueio* e subsequente *lavagem* na mesma solução, são determinantes para o resultado final. Como agentes de bloqueio usa-se geralmente (BSA 1-3%) mas também ovalbumina 1%, soro fetal de vitela 5%, ou gelatina 0,1%. A solução bloqueadora deve conter ainda NaCl pois contribui para diminuir as interações inespecíficas de natureza iónica e um detergente, normalmente o Tween-20 que evita ligações inespecíficas de anticorpos e contribui para a sua remoção durante os passos de lavagem (Hawes, 1988).

Detecção

- O ouro coloidal

Em imunocitoquímica ultraestrutural têm sido utilizados vários marcadores que permitem visualizar o complexo antigénio-anticorpo. Contudo, o ouro coloidal é o marcador de eleição para a imunomarcação em cortes ultrafinos (Salema e Santos, 1992). Apresenta vantagens em relação a outros métodos usados em imunocitoquímica, nomeadamente: as partículas são perfeitamente esféricas e altamente electronodensas, destinguindo-se, assim, de estruturas biológicas, mesmo a baixas ampliações; o sinal resultante é permanente e não existe interferência com enzimas endógenas.

As esferas de ouro coloidal, normalmente de 1 a 40 nm de diâmetro, são conjugadas por interacções electrostáticas (Herman, 1988) com macromoléculas de interesse, geralmente imunuglobulinas, proteína-A e estreptavidina. Existem disponíveis comercialmente (BioCell, Amersham) em coloides monodispersivos com variações muito diminutas no diâmetro das

partículas (o que é essencial quando se pretende detectar simultaneamente dois antigénios diferentes com ouro coloidal de diferentes diâmetros).

A escolha do tamanho das partículas depende do nível de ampliação a que se examina amostra: em microscopia electrónica, dependendo do equipamento, partículas de diâmetro superior a 5 nm podem ser observadas directamente, sendo os diâmetros de 10 e 15 nm os mais correntemente utilizados. Para visualizar as partículas de diâmetro inferior (1-5 nm) é necessário que as suas dimensões sejam aumentadas através depósitos de prata ("silver enhancement"), posteriormente à reacção de marcação (Salema e Santos, 1992). Esta técnica permite a visualização de partículas pequenas quer em microscopia óptica quer em electrónica.

A *resolução* da detecção depende da soma dos erros acumulados resultantes das dimensões físicas de todos os componentes do sistema (Herman, 1988). Por exemplo, utilizando na detecção um anticorpo secundário conjugado com ouro de 10 nm o erro total acumulado será de 2 x 15 nm (para as duas camadas de anticorpos) + 10 nm para a partícula de ouro, num total de 40 nm. O significado deste erro depende do tamanho do objecto a examinar e da resolução necessária para definir a localização (Herman, 1988).

A *sensibilidade da imunoreacção* é, geralmente, expressa pelo número de partículas de ouro por unidade de antigénio, após a reacção. Ora, um conjugado de anticorpos com partículas de 5 nm constitui um complexo de grandes dimensões em que a partícula de ouro está recoberta por várias moléculas de anticorpos ("Immunogold detection from Amersham International", Amersham). Conjugados com partículas mais pequenas são constituidos por imunoglobulinas cobertas com uma ou mais partículas de ouro. Para os mesmos determinantes antigénicos, estes conjugados permitem a visualização um maior número de partículas. Assim, a *eficiência* da marcação aumenta na razão inversa do tamanho da partícula de ouro, enquanto que a *sensibilidade da detecção* (visualização) aumenta na razão directa do tamanho. O uso de partículas de dimensões muito pequenas (por exemplo, AuroProbe One, Amersham) durante a incubação, permitiria uma melhor penetração dos anticorpos conjugados, uma maior densidade de marcação para o mesmo número de locais antigénicos e uma melhor resolução com consequente aumento na precisão da localização. O tratamento posterior com prata permite a vizualização destas partículas ("Immunogold detection from Amersham International", Amersham).

- Nanogold®

Recentemente foi desenvolvido um marcador baseado num composto de ouro (não coloidal). O Nanogold® é um pequeno agregado de ouro (1,4 nm) com uma camada exterior orgânica e um braço funcional monoreactivo que permite a ligação covalente (e portanto mais estável que a ligação não-covalente do ouro coloidal) a polipeptídeos nomeadamente anticorpos ou os seus fragmentos (Nanoprobes).

A partícula é ligada a locais específicos em IgGs ou Fab' constituindo este último o sistema de menores dimensões disponível comercialmente. A estequiometria do número de partículas

em relação às IgG é de um para um, ao contrário dos conjugados com ouro coloidal em que pode variar de 0,2 a 10 partículas por IgG.

Controlos

Os anticorpos utilizados devem estar previamente caracterizados (Erickson et al, 1993). Assim, deve ser feita:

a caracterização do anticorpo produzido e do antigénio - os anticorpos devem ser bem caracterizados no que diz respeito à especificidade para o antigénio;

a caracterização do anticorpo em relação ao tecido com que é utilizado - extractos brutos dos tecidos a utilizar nos estudos de imunocitoquímca devem ser submetidos a electroforese e transferência para membrana de nitrocelulose que é incubada com o anticorpo ("immunoblot" ou "Western blot") o qual deve reconhecer somente a proteína de interesse.

Controlos da reacção de imunomarcação devem ser executados em paralelo com a reacção. Mediante estes controlos é possível assegurar que a marcação é devida apenas à ligação específica do anticorpo primário (Erickson et al, 1993). Os controlos consistem em:

1- Substituir o anticorpo primário por soro pré-imune, ou IgG pré-imunes. Este soro, ou fracção de IgG, provêm do mesmo coelho onde foi obtido o anticorpo, antes da sua imunização. Isto permite confirmar que não existiam anticorpos no soro do animal, antes da imunização, que marcassem as células em estudo.

2- Na impossibilidade de usar soro pré-imune, deve pré-absorver-se o soro imune primário com o antigénio, o que permite igualmente verificar se outros elementos do soro reagem com o tecido (Moore, 1995).

3- Utilizar soro não-imune como alternativa; provem da mesma espécie (por exemplo, coelho) mas não do mesmo indivíduo.

4- Substituir o anticorpo primário pelo tampão no qual o anticorpo primário é diluído mas sem o anticorpo. Isto permite testar a reactividade que os anticorpos secundários (ou proteína A, ou até o ouro) possam apresentar com o tecido em estudo.

5- Controlo negativo - utiliza-se soro do animal imunizado contra um antigénio que não exista no tecido a ser estudado.

5 - Controlo positivo - utiliza-se um anticorpo para um antigénio presente no tecido e que se sabe que dá resultados positivos com esse tecido; este controlo permite avaliar a perda de antigenicidade.

Imunolocalização de proteínas e RNA em impressões de tecidos vegetais em membrana de nitrocelulose ("Tissue printing")

Esta é uma técnica relativamente simples para detectar, *in situ*, macromoléculas vegetais (proteínas, carbohidratos complexos e ácidos nucleicos) e assim visualizar padrões de acumulação específicos para determinados tecidos ou células. Consiste, essencialmente, em cortar o tecido *in vivo* com lâmina de barba e pressioná-lo contra uma membrana de

nitrocelulose ocorrendo, assim, transferência e imobilização de macromoléculas na membrana que podem ser visualizadas com as sondas adequadas.

A imunolocalização de proteínas em impressões de tecido em nitrocelulose foi desenvolvida por Cassab e Varner (1987). Após a impressão do tecido, a membrana é incubada com os anticorpos primários e a detecção destes faz-se normalmente com anticorpos secundários conjugados com um marcador para detecção, tal como nas técnicas usuais de detecção de anticorpos em membrana ("Western blot"). Os marcadores mais utilizados são enzimas (fosfatase alcalina ou peroxidase) sendo a detecção feita pelo produto de actividade destas sobre substratos adequados.

Este método tem a vantagem de permitir obter uma imagem global de distribuição de antigénios em áreas de dimensões superiores às usadas normalmente em microscopia, mas pode também revelar a presença de macromoléculas em tecidos e células específicas com um grau de resolução razoável. A vantagem principal reside no facto de a proteína estar acessível ao anticorpo e ser detectada na sua forma nativa e na sua localização original, sem artifícios induzidos pela fixação, desidratação ou impregnação.

A retenção de ácidos nucleicos na membrana permite a detecção de RNA por hibridização quer com cDNA ou RNA complementar.

Através da modificação do processo de detecção imunológica de proteínas, foram desenvolvidas técnicas de hibridização para detecção de mRNAs em impressões de tecido em membranas de nitrocelulose ou "nylon" (Guilfoyle et al, 1993).

OBJECTIVOS

O azoto é o principal constituinte de compostos essenciais à estrutura e função de todos os seres vivos. A incorporação de azoto inorgânico em compostos orgânicos, particularmente aminoácidos e proteínas, depende quase exclusivamente das plantas.

Como foi referido anteriormente, o azoto é limitante no crescimento das plantas e esta limitação parece incidir não na aquisição de nitrato mas na incorporação de azoto em proteínas (Lam et al, 1995). A glutamina sintetase (GS) é a enzima-chave neste processo, representando aparentemente a única via, utilizada pelas plantas superiores, para a conversão de azoto inorgânico em compostos azotados. É considerada, assim, uma enzima primordial e possivelmente limitante neste processo (Lam et al, 1995). Além disso, intervem na reassimilação da amónia proveniente de vária vias metabólicas na planta. É, assim, de primordial importância estudar a sua expressão em tecidos específicos e avaliar o seu papel no metabolismo do azoto, particularmente em situações fisiológicas específicas, como carência de azoto ou transições "fonte"-"recebedor". O conhecimento da regulação das enzimas envolvidas na assimilação da amónia necessita do conhecimento fundamental sobre as vias metabólicas em que estão envolvidas e dos genes que as codificam e este conhecimento poderá contribuir para

aumentar a produtividade ou qualidade das plantas de cultura através manipulção genética ou molecular (Lam et al, 1995).

O presente estudo centrou-se no estudo das isoformas da glutamina sintetase (GS) em batateira. A batateira é uma planta de interesse económico, onde ocorrem várias fases de transição "fonte"-"recebedor" em órgãos como as folhas e os tubérculos e onde estão envolvidos processos de interconversão metabólica do azoto e redireccionamento de fluxos de compostos azotados, em fases específicas de desenvolvimento da planta (por exemplo, abrolhamento, senescência) ou em situações ambientais adversas, como por exemplo, carência de azoto. O azoto absorvido do solo tem de ser repartido na planta pelas folhas, tubérculos e sementes e as folhas e os tubérculos representam "fontes" ou "recebedores" de azoto em diferentes estados do desenvolvimento da planta.

Para complementar os estudos feitos na planta, foi planeado estabelecer um modelo *in vitro*, com o objectivo de estudar a expresão da GS em situações controladas, nomedamente em microtrubérculos *in vitro*.

Este trabalho teve por finalidade caracterizar as isoformas da GS em órgãos de batateira por técnicas de SDS-PAGE, cromatografia de troca iónica, PAGE nativo e IEF.

Como se sabe que as isoformas da GS são diferencialmente expressas em diferentes órgãos e compartimentos subcelulares da planta e que a sua localização está relacionada com o metabolismo particular do azoto em que intervêm, procurou estudar-se a localização da expressão da GS em vários órgãos e tecidos de batateira e em situações fisiológicas particulares.

Como era aceite tradicionalmente na literatura que nas folhas das Solanaceae a GS citosólica (GS1) estaria ausente, procurou estabelecer-se o padrão de expressão das isoformas da GS na batateira e compará-lo com o de outras Solanaceae (tabaco e tomateiro) e de uma não Solanaceae (girassol).

Na localização da expressão foi dada prioridade ao desenvolvimento de técnicas *in situ*, como imunocitoquímica ultraestrutural, imunolocalização da GS em impressões de tecido em nitrocelulose, hibridização *in situ* a nível ultraestrutural e detecção de mRNA de GS em impressões de tecido em nitrocelulose. As técnicas *in situ* são instrumentos poderosos que permitem a localização precisa de constituintes celulares a nível celular e subcelular premitindo o estudo da expressão de produtos génicos em tipos específicos de células.

Para as técnicas imunológicas foram utilizados anti-corpos anti-GS de feijoeiro cedidos gentilmente pela Drª Julie Cullimore (INRA, Toulouse), embora estivesse subjacente o objectivo de vir a identificar polipeptídeos específicos de GS de batateira, com vista à obtenção futura de anticorpos específicos. Para a hibridização *in situ*, pretendia-se utilizar sondas não radioactivas, marcadas com biotina e/ou digoxigenina.

Sabe-se que, nas plantas superiores, a GS existe sob a forma de múltiplas isoenzimas, codificadas por uma família de genes nucleares que são diferencialmente expressos em diferentes tecidos e órgãos das plantas. O significado fisiológico desta expressão diferencial não está bem estabelecido mas pensa-se que existe, a nível genético, uma regulação da expressão em resposta a variáveis ambientais (por exemplo, luz, suprimento de compostos azotados) ou a necessidades específicas da planta em diferentes órgãos e estados de desenvolvimento. Deste controlo resultaria uma eficiência máxima na economia de utilização de azoto pela planta.

Era, assim, objectivo deste trabalho investigar a actividade e a expressão das isoenzimas da GS em situações que envolvessem alterações nas necessidades de mobilização de azoto da planta, nomeadamente:

-durante o reverdecimento de plantas estioladas

- em diferentes graus de desenvolvimento, de plantas submetidas a carência de azoto

- durante o abrolhamento dos tubérculos

Uma vez que a GS das plantas superiores estudadas é codificada por uma família de genes diferencialmente expressos em diferentes órgãos da planta e diferencialmente regulados por diferentes estímulos ambientais, procurou abordar-se a caracterização da família de genes que codificam a GS da batateira a fim de conhecer o seu papel em diferentes aspectos do metabolismo do azoto e conhecer as suas implicações na eficiência de utilização de azoto pela planta.

Este trabalho teve subjacente a questão mais global de saber se genes específicos da GS são expressos, e como são regulados, em diferentes tecidos ou órgãos para responder a necessidades fisiológicas específicas. Para isso, planeou-se a construção de uma biblioteca de cDNA de folha em fago Lambda gt11 *Sfi-Not*, a partir da qual se poderia iniciar o isolamento e caracterização de clones de cDNA que codificassem a GS na batateira. Para o rastreio desta biblioteca planeou-se utilizar uma sonda de cDNA obtida por PCR através de oligonucleotídeos iniciadores, para o desenho dos quais seriam utilizadas sequências específicas de GS, conservadas em várias espécies de plantas e obtidas a partir de buscas em bancos de dados de nucleotídeos. Paralelamente foi pedida a outro laboratório uma biblioteca de cDNA de tubérculo com o objectivo de isolar clones de cDNA de GS expressa neste órgão.

A partir do isolamento e caracterização de clones de cDNA codificando a GS na batateira será possível determinar a complexidade e organização da família de genes; caracterizar, nomeadamente por "Northern blotting" ou hibridização *in situ*, o padrão de expressão dos genes correspondentes da GS em vários órgãos e em diferentes contextos fisiológicos; pesquisar clones de DNA genómico em bibliotecas genómicas para identificação de sequências reguladoras; proceder a estudos de sobreexpressão ou inibição da expressão.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições de cultura

Plantas de *Solanum tuberusum* cv Desirée foram crescidas a partir de tubérculos em vasos com vermiculite em câmara de cultura, com fotoperíodo de 16 horas de luz e regadas com solução de Hoagland. O tecido caloso foi obtido de uma cultura estabelecida de tecido caloso derivado de explantes foliares (Ferro de Beça, 1995).

Os tubérculos eram mantidos a 4°C na obscuridade até à utilização. Antes da plantação eram submetids a pré-abrolhamento, na obscuridade, à temperatura ambiente.

Para o estudo da GS em plantas estioladas e após reverdecimento, tubérculos de *Solanum tuberosum* L. cv. Desirée foram colocados em vermiculite e na obscuridade, em câmara de crescimento. Desenvolveram-se plantas que cresceram durante 4 semanas em total obscuridade após o que foram transferidas para um regime de fotoperíodo de 16 h de luz. Foram recolhidas amostras para imunocitoquímica a partir das plantas estioladas, e após 4 h, 24 h, e 7 dias de transferência para o regime de fotoperíodo. As plantas foram regadas com uma solução de Hoagland modificada contendo 1/5 do azoto normal.

Para o estudo da influência da carência de azoto na actividade e padrão de isoformas da glutamina sintetase em folhas de batateira, foram colocados tubérculos em semeadeiras com vermiculite que foram divididas em dois lotes. Um dos lotes, designado N, foi regado com solução de Hoagland. As plantas do outro lote foram submetidas a um regime de carência de azoto sendo regadas com uma solução de Hoagland modificada de modo a omitir os iões NO_3^- e NH_4^+. Após 4 semanas, foram colhidas amostras das 2ªs, 5ªs e 7ªs folhas a contar do ápice, para análises bioquímicas e imunocitoquímica.

As folhas de tabaco utilizadas (*Nicotiana tabacum* L. Havana 425) provinham de plantas de três meses, desenvolvidas a partir de sementes colocadas em terra, em câmara de cultura e regadas com água.

Folhas de tomateiro (*Lycopersicom esculentum* Mill., variedade Hellfrucht Fruhstamm) foram fornecidas por Alejandro Pérez-García, Universidade de Málaga.

Folhas de girassol (*Helianthus annuus* L.) e tecido caloso da mesma planta foram fornecidos por Conceição Santos, Universidade de Aveiro.

Soluções nutritivas

Foi utilizada a solução completa de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950) e uma solução de Hoagland modificada de modo a omitir os iões NO_3^- e NH_4^+.

Solução completa de Hoagland

Composição em g/L:

$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	0,94
$MgSO_4.7H_2O$	0,52
KNO_3	0,66
$(NH_4)H_2PO_4$	0,12
NaFeEDTA	0,12

Adicionar 0,1 mL da Solução de Micronutrientes

Acertar pH=6,7 com KOH

Solução de Hoagland modificada de modo a omitir os iões NO_3^- e NH_4^+

Composição em g/L:

$CaCl_2$	0,443
$MgSO_4.7H_2O$	0,52
KCl	0,204
K_2SO_4	0,239
KH_2PO_4	0,142
NaFeEDTA	0,012

Adicionar 0,1 mL da Solução de Micronutrientes

Acertar pH=6,7 com KOH

Solução de Hoagland modificada contendo 1/5 do azoto normal

Composição em g/L:

$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	0,188
$CaCl_2$	0,353
$MgSO_4.7H_2O$	0,520
KNO_3	0,132
K_2SO_4	0,191
KCl	0,164
$(NH_4)H_2PO_4$	0,024
KH_2PO_4	0,114
NaFeEDTA	0,012

Adicionar 0,1 mL da Solução de Micronutrientes

Acertar pH=6,7 com KOH

Solução de Micronutrientes

Composição em g/100 mL:

H_3BO_3	2,8
$MnSO_4.4H_2O$	3,4
$CuSO_4.5H_2O$	0,1
$ZnSO_4.7H_2O$	0,22
$(NH_4)6MoO_{24}.4H_2O$	0,1
Adicionar H_2SO_4	2,5mL

Acertar pH=6,7

Extracção da enzima e cromatografia de troca iónica

Extracção da enzima

Todas as operações foram efectuadas entre 0-4°C de acordo com (McNally et al, 1983).

Em cada extracção, porções de folha com nervura central ou porções de tubérculo foram homogeneizados em almofariz ou Polytron (4 x 14 segundos à velocidade máxima) em 2 ou 3 volumes de meio constituido por Tris-HCl 25 mM pH 7,9, $MgCl_2$, 1 mM mercaptoetanol 10 mM, DTT 1 mM, PVP insolúvel 1%; os homogeneizados foram passados por 4 camadas de gaze e os filtrados sujeitos a centrifugação em rotor Sorvall SS34, a 19000 rpm durante 30 min.

Os sobrenadantes foram utilizados directamente na determinação da actividade enzimática ou colocados directamente no topo de uma coluna de troca iónica.

Cromatrografia de troca iónica

Todo o processo ocorreu em câmara fria (< 8°C).

Foi preparada um coluna contendo 3,5 g de resina de troca aniónica DE-52 (Whatman), num volume de 10 x 1 cm. O sobrenadantes obtidos na extracção foram colocados no topo da coluna, previamente equilibrada com tampão de homogeneização. As proteínas foram eluidas com um gradiente linear de NaCl 0-400 mM dissolvido em 40 mL de tampão de equilibração, que foi bombeado com bomba peristáltica à velocidade de 0,26 mL por minuto. Fracções de aprox 0,5 mL foram recolhidas à mão ou em colector de fracções. A actividade enzimática da GS foi imediatamente determinada em todas as fracções.

Extracção de enzima para detrerminação da actividade enzimática e análise electroforética

Porções de tecido foram homogeneizadas em almofariz na presença de areia de quartzo e em meio de extracção contendo Tris-HCl 25 mM pH 8, $MgCl_2$ 10 mM, DTT 1 ou 5 mM, glicerol 10%, Triton-X-100 0,05%, PVP insolúvel 5%-10%. Os homogeneizados foram filtrados por quatro camadas de gaze e centrifugados a 20 000 x *g* durante 30 min a 4°C.

Alternativamente, o tecido foi homogeneizado com "polytron", à velocidade máxima, durante 4 x15 segundos, em meio de extracção numa proporção de tampão/tecido de 2:1 (v/p); o homogeneizado foi filtrado por 4 camadas de gaze e submetido a centrifugação a 20 000 x *g* durante 30 min a 4°C. O sobrenadante foi usado directamente nas análises subsequentes.

Determinação da quantidade de proteínas solúveis presentes nos extactos

As proteínas solúveis totais foram determinadas nos mesmos extractos utilizados para extracção da GS e foram quantificadas espectrofotometricamente pelo método de Bradford (1976). Este método utiliza o corante Azul brilhante de Coomassie G-250. Para preparar o reagente de Bradford dissolvem-se 10 mg de Azul brilhante de Coomassie G-250 em 5 mL de etanol 95% e mistura-se com 10 mL de ácido fosfórico 85% e água destilada para um volume final de 100 mL. A solução foi filtrada e guardada na obscuridade. Para quantificação das proteinas misturou-se 100 µL de amostra, convenientemente diluida, com 1 mL de reagente de Bradford. As leituras de absorvância a 595 nm foram efectuadas ao fim de 15 minutos. Para a construção de curvas padrão utilizou-se albumina sérica bovina.

Determinação da actividade enzimática

Para determinação da actividade da glutamina sintetase foi usada a reacção biossintética baseada na formação de γ-glutamil hidroxamato, na presença de hidroxilamina (NH_2OH), que é

um substrato alternativo a NH_4^+. A afinidade da GS para a hidroxilamina é semelhante à afinidade para NH_4^+ (Barratt, 1980).

$$ATP + L\text{-glutamato} + NH_2OH \xrightarrow{Mg^{2+}} \gamma\text{-glutamil hidroxamato} + ADP + Pi$$

O meio de reacção continha glutamato de sódio 150 mM, ATP 15 mM, $MgCl_2$ 10 mM, NaOH 10 mM, EDTA 2mM, Tris-Hcl 100 mM pH 7,9. Utilizou-se 0,3 mL de extracto, perfazendo 1 mL de volume de reacção e esta iniciou-se pela adição de glutamato. Após incubação a 30°C durante 20 min ou 30 min, a reacção foi parada com 1 mL de reagente de cloreto de ferro (3,3% $FeCl_3$, 8% TCA, 2M HCl). A formação de γ-glutamil hidroxamato foi medida, após centrifugação (5000 x g durante 5 min), pela absorvância a 540 nm do produto de cor castanha resultante da reacção entre o γ-glutamil hidroxamato e $FeCl_3$. Foi preparado um tubo "branco" sem glutamato. A curva padrão foi preparada com L-glutamato-γ-monohidroxamato comercial.

Isolamento de cloroplastos e obtenção dos extractos cloroplastidiais

Porções de folha sem nervuras foram homogeneizadas em "polytron" (3 x 1 segundos) em 4 volumes de meio (frequentemente utilizando o meio parcialmente congelado) contendo Tris-HCl 100 mM ou Tricine-KOH 100 mM pH 7,9, sacarose 396 mM, EDTA 1 mM, $MgCl_2$ 1mM, BSA 0,1% e β-mercaptoetanol 6 mM. Os homogeneizados foram passados por 4 camadas de gaze arrefecida e centrifugados a 6000 rpm em centrífuga de bancada, à temperatura ambiente, durante 1,5 min. A centrifugação foi rapidamente parada colocando o travão numa posição alta. Os sedimentos foram lavados superficialmente com meio de extracção e depois ressuspensos no mesmo meio contendo Nonidet P-40 0,5%. Permaneceram pelo menos 20 min a 4°C neste meio a fim de solubilizar as membranas cloroplastidiais e os componentes estromáticos.

Electroforese em gel condições não desnaturantes

Obtenção de extractos

Os extractos de folha para determinação de actividade da GS no gel não desnaturante foram preparados em meio de homogeneização contendo Tris-HCl 25 mM pH 7,9, $MgCl_2$ 10 mM, de glicerol 10%, Triton-X100 0,05%, DTT 1 mM e opcionalmente, β-mercaptoetanol 10 mM. No almofariz, era ainda adicionado PVP insolúvel (10%) e areia de quartzo. Em algumas extracções foi utilizado o inibidor de proteases PMFS (1mM) mas a sua presença não se traduziu em diferenças na actividade da GS detectada no gel, em relação às amostras onde não estava presente. Porções de folha com nervura central foram homogeneizadas em almofariz e o homogeneizado foi filtrado através de gaze e submetido a centrifugação a 19000 rpm, 30 min a 4°C. O sobrenadante foi directamente carregado no gel. Os extractos de cloroplastos foram preparados como descrito anteriormente, mas utilizou-se 0,5% Triton-x-100 para solubilização das membranas. Aos extractos cloroplastidiais assim preparados foi adicionado glicerol para a

concentração de 10%. As electroforeses decorreram em mini-geles verticais de poliacrilamida (Hames, 1988), em unidades SE250 Mighty Small II (Hoefer) a 4°C, com voltagem constante de 600 V e intensidade de 20 mA/gel.

Preparação do gel

O gel vertical de poliacrilamida, de 1,5 mm de espessura, foi preparado de acordo com o procedimento descrito por Hames (1988) para sistemas descontínuos não desnaturantes (elevado pH). Foram utilizadas concentrações de acrilamida de , 5, 7,5 e 10% no gel de separador e 3,7% no gel concentrador.

O "stock" de acrilamida (30:0,8) preparou-se dissolvendo 30 g de acrilamida e 0,8 de bisacrilamida num volume total de 100 mL de água. Para preparar o gel separador misturou-se a quantidade de "stock" de acrilamida adequada à percentagem pretendida no gel, com Tris-HCl pH 8,8, na concentração final de 0,375 M e como catalisadores da polimerização utilizou-se persulfato de amónio a 10%, preparado na altura, para uma concentração final de 0,075% e TEMED para uma concentração final de 0,05%. O gel concentrador foi preparado misturando a quantidade pretendida de "stock" de acrilamida com Tris-HCl pH 6,8, para uma concentração final de 0,125 M. Como catalisadores da polimerização utilizou-se TEMED para uma concentração final de 0,075% e riboflavina para uma concentração final de 0,0005%. Utilizando a riboflavina como catalisador a polimerização só ocorre após iluminação do gel com uma lâmpada fluorescente "Daylight" colocada a 2-5 cm de distância do gel. O tampão de electroforese continha Tris 25 mM e glicina 192 mM, pH 8,3.

Determinação de actividade da GS em gel não desnaturante

A actividade da GS no gel foi detectada utilizando a reacção biossintética de acordo com Barrat (1980). O meio de reacção comtinha L-glutamato 80 mM, $MgSO_4$ 20 mM, ATP 8 mM, hidroxilamina 6 mM, EDTA 1 mM em Tris 100 mM pH 7,9. O ATP, a hidroxilamina e o L-glutamato foram adicionados imediatamente antes da reacção. Cada gel foi a incubar com 25 mL do meio de reacção durante 30 min a 37°C. Após a incubação a mistura de reacção foi decantada e a formação de γ-glutamil hidroxamato foi detectada após a adição ao gel de uma mistura de 5% (p/v) TCA e 10% (p/v) $FeCl_3$ em HCl 2,5 N, com pipeta de Pasteur. Bandas acastanhadas surgiam onde ocorreu a formação de um quelato de ferro do γ-glutamil hidroxamato. Logo que se formavam bandas o gel era lavado com água destilada para evitar coloração de fundo. O gel foi fotografado imediatamente pois as bandas tendiam a difundir.

Transferência de proteínas de gel não desnaturante para membrana de nitrocelulose

Antes da transferência o gel foi equlibrado durante 1 hora em tampão de equilibração contendo: mercaptoetanol 5% e SDS 0,3% em tampão de gel separador (Tris 0,375M pH8,8).

As proteínas foram electrotranferidas para membrana de nitrocelulose (0,45μm) durante a noite, a uma corrente constante de 20 mA , seguida de 1 hora a uma corrente constante de 200 mA, em tampão de transferência, a 14°C, com agitação. O tampão de transferência utilizado era específico para proteinas de elevado peso molecular (Harlow and Lane, 1988): Tris 50 mM (pesado directamente para a solução), glicina 380 mM, SDS 0,1%, metanol 20%.

Focagem isoeléctrica em gel de poliacrilamida em camada fina

Os polipeptídeos presentes em extractos de proteínas solúveis de folha e de cloroplastos foram separados pelo ponto isoeléctrico em gel de poliacrilamida em camada fina de 150 μm, com anfólitos na gama de pH 3-10 (Servalyt Precotes 3-10, Serva). A focagem isoeléctrica era desenvolvida em mesa horizontal (Isobox, Hoeffer) a 4°C, a 2000 V e 4 W, de acordo com as instruções do fabricante.

Os extactos de folha e de cloroplastos foram preparados como indicado para gel não desnaturante mas as proteínas presentes nos extractos foram posteriormente precipitadas com acetona e ressuspensas em ureia 9 M com NP-40 2%. As amostra assim preparadas foram aquecida a 37°C, 30 min, antes de ser colocadas no gel, sobre porções de papel de filtro (0,5 x 1,5 cm), que eram posteriormente retiradas.

Transferência de proteínas de gel em camada fina para membrana de nitrocelulose

O gel foi colocado dentro de uma tina e sobre ele foi colocada a nitrocelulose, 2 folhas de papel de filtro Whatman 3MM e uma placa de vidro. O conjunto foi submerso durante a noite em Tris-HCl 10 mM pH 8.

Focagem isoeléctrica em gel vertical de poliacrilamida

Os geles verticais de poliacrilamida para focagem isoeléctrica, de 1,5 mm de espessura, foram preparados de acordo com o procedimento descrito no manual da Hoefer ("Basic techniques and exercises in electrophoresis", 1988/89) baseado no método O'Farrell (1975) em unidades de electroforese SE250 Mighty Small II (Hoefer Scientific Instruments). Na preparação do gel utilizou-se, para um volume final de 10 mL: 5,5 g de ureia, 1 mL de acrilamida de uma solução contendo 38 g de acrilamida e 2 g de bisacrilamida (40%T, 5%C_{bis}), 2 mL de NP-40 10%, 0,4 mL de anfólitos 5-7 e 0,1 mL de anfólitos 3-10, 7 μL de TEMED e 10 μL de persulfato de amónio 10% e água para o volume final de 10 mL.

As amostras, extraídas como descrito para electroforese não desnaturante, foram precipitadas com acetona e redissolvidas em tampão de amostra (ureia 9 M, NP-40 2%, anfólitos 2%, 2-mercaptoetanol 5%). Para a pré-corrida encheu-se a câmara inferior (+) com tampão do ânodo (H_3PO_4) e a câmara superior (-) com tampão de cátodo (20 mM NaOH). Aplicou-se no gel tampão de cobertura da amostra (ureia 9 M, anfólitos 1%) e procedeu-se à pré-corrida a 200 V,

300 V e 400 V, durante 10 minutos em cada voltagem. Após a pré-corrida, o gel de cobertura de amostra foi removido por lavagem com tampão do cátodo (20 mM NaOH). Colocou-se novo tampão de cátodo, aplicaram-se as amostras e sobre cada amostra aplicou-se 3-5 µL de tampão de cobertura da amostra (ureia 9 M, anfólitos 1%). Procedeu-se à electroforese, arrefecendo-se a unidade com água da torneira, a 500 V durante 1 hora aumentando-se para 800 V durante mais 1 hora.

Transferência de proteínas para nitrocelulose após focagem isoeléctrica

Após a focagem isoeléctrica as proteínas foram transferidas para nitrocelulose após tratamento prévio descrito em "Basic techniques and exercises in electrophoresis", 1988/89, Hoefer. Para coloração prévia das bandas, incubou-se o gel numa solução de ácido perclórico 5% e Coomassie Blue G-250 0,04% em água durante várias horas (2 horas a uma noite), e depois na solução de descoloração (álcool isopropílico 25% e ácido acético 10% em água) durante várias horas. O processo de coloração/descoloração foi repetido e o gel foi colocado em solução de equilibração (mercaptoetanol 5% e SDS 0,3% em tampão Tris 0,375M pH 8,8) durante 1 hora e em tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM) durante 30 minutos. A electrotransferência para membrana de nitrocelulose foi efectuda de acordo com Towbin et al (1989) em tampão de transferência, durante a noite a 20 mA seguida de 1 hora a 200 mA, a 14°C, com agitação.

Electroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

As electroforeses em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio foram realizadas em gel vertical, em unidades de electroforese SE250 Mighty Small II (Hoefer Scientific Instruments). Foi utilizado o sistema descontínuo descrito por Laemmli (1970), com malha de 5% no gel de concentração e malhas de 10% a12,5% no gel de separação. O "stock" de acrilamida preparou-se dissolvendo 29 g de acrilamida e 0,8 de bisacrilamida num volume total de 100 mL de água.(30%T, 2,7%C_{bis}) Para preparar o gel separador misturou-se a quantidade de "stock" de acrilamida adequada à percentagem pretendida no gel, com Tris-HCl pH 8,8, na concentração final de 0,375 M e com SDS 10%, para uma concentração de 0,1%. Como catalisadores da polimerização utilizou-se persulfato de amónio a 10%, preparado na altura, para uma concentração final de 0,05% e TEMED para uma concentração final de 0,025%. O gel concentrador foi preparado misturando a quantidade pretendida de "stock" de acrilamida com Tris-HCl pH 6,8, na concentração final de 0,125 M e SDS na concentração final de 0,1% Como catalisadores da polimerização utilizou-se persulfato de amónio para a concentração final de 0,05% e TEMED para uma concentração final de 0,025%.

O tampão electrólito (tampão do tanque) era constuituido por Tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%, pH 8,3: O tampão de amostra (3 x concentrado) era constituido por Tris 187,5

mM, SDS 6%, β-mercaptoetanol 15%, azul de bromofenol 0,003% e glicerol 30%, pH 6,8. A amostras, dissolvidas em tampão de amostra na proporção de 2 partes de amostra : uma parte de tampão de amostra), eram aquecidas a 100°C durante 2 minutos antes de serem aplicadas no gel . As amostras continham igual quantidade de proteína (geralmente 20 μg) ou o volume correspondente a igual quantidade de peso fresco de folha. A electroforese era desenvolvida com voltagem constante (600 V) e intensidade de 15 mA até as amostras atingirem o gel de separação e depois 20 mA até final.

As proteínas separadas foram coradas com Coomassie-R 250 no gel ou electro-transferidas para membranas de nitrocelulose de acordo com o metodo de Towbin para análise "Western".

Coloração com Azul de Coomassie R-250 de geles de poliacrilamida com SDS e geles nativos após detecção da actividade

Os geles foram incubados em solução de azul brilhante de Coomassie-R 250 0,25% (p/v) em metanol 40% (v/v) e ácido acético 7% (v/v) durante 30 min. A descoloração foi feita durante a noite em metanol 10% e ácido acético 7,5%.

Electrotransferência das proteínas separadas por SDS-PAGE para nitrocelulose

Os polipeptídeos separados por SDS-PAGE foram transferidos para membrana de nitrocelulose (0,45μm) de acordo com Towbin et al (1979), durante a noite a uma corrente constante de 20 mA, seguida de uma corrente constante a 200 mA durante 1 hora, em tampão de transferência (glicina 191 mM, Tris 25 mM pH8,3, com ou sem metanol 20%), a 14°C, com agitação.

Anticorpos utilizados na detecção da GS

Na detecção da GS em "western blots", em "tissue prints" e nos tecidos fixados e incluídos foram utilizados anticorpos policlonais obtidos em coelho contra GS citoplasmática de nódulo (GSn1) de *Phaseolus vulgaris*. (Cullimore e Miflin, 1984), gentilmente cedidos pela Drª Jullie V. Cullimore (INRA-CNRS, Castanet-Tolosan, Toulouse).

Estes anticorpos reagiam com formas citoplasmáticas e cloroplastidiais da GS feijoeiro e GS de outras plantas (Cullimore e Miflin, 1984).

Imunodetecção da GS em membranas de nitrocelulose ("Western blotting")

Após a transferência, a membrana foi incubada durante 30 minutos numa solução de PBS (tampão fosfato salino composto por NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, Na_2HPO_4 8 mM, KH_2PO_4 1,47 mM) contendo de leite em pó 5% e NP-40 0,1%, para saturar os locais livres da membrana e impedir que as IgGs se ligassem inespecificamente à matriz. Em seguida, a membrana foi incubada durante 4 horas, à temperatura ambiente, com os anticorpos primários

anti-GS diluidos em PBS contendo de leite em pó 0,5 ou 5% e de NP-40 0,05 a 0,1%. Após lavagens em PBS com de NP-40 0,05% ou 0,1% (3 x 10 minutos), a membrana foi incubada durante 1 hora, à temperatura ambiente, com anticorpos secundários anti IgG de coelho feitos em cabra e conjugados com peroxidase (Amersham, UK e Vector, UK), diluidos no mesmo tampão dos anticorpos primários. Após três lavagens, como descrito anteriormente, as bandas foram visualizadas por incubação da membrana com 4-cloro-1-naftol na presença de H_2O_2. Na preparação da mistura de revelação 60 mg de 4-cloro-1-naftol foram dissolvidos em 20 mL de metanol e adicionados a 100 mL de PBS. Imediatamente antes de adicionar a mistura à membrana adicinou-se 20 µL H_2O_2 de uma solução comercial a 30% Alternativamente, para revelação, utilizou-se uma mistura contendo 50 mg de DAB (diaminobenzidina) em 100 mL de PBS à qual se adicinou 33 µL de peróxido de hidrogénio a 30%.

Detecção imunológica da GS em impressões de tecidos em nitrocelulose ("Tissue printing")

Para visualização da distribuição da GS em impressões de tecido em nitrocelulose (Cassab e Varner, 1987), pressionaram-se secções de tecido obtidas na altura com lâmina de barba, contra uma membrana de nitrocelulose, durante aproximadamente 15 segundos. A membrana foi lavada em PBS com NP-40 0,1% durante 30 minutos a uma noite. Seguidamente, procedeu-se ao bloqueio das peroxidases endógenas em ácido periódico 1% durante 30 minutos. Após lavagem em PBS procedeu-se à imunodetecção da GS nas membranas conforme descrito para detecção de proteínas em nitrocelulose após transferência do gel de electroforese. As imagens foram fotografadas em fotomicroscópio Nikon ou lupa Nikon.

Imunocitoquímica ultraestrutural

Fixação

Os procedimentos utilizados basearam-se nos descritos por Hawes (1988) e Esaguy et al (1989) mas com várias adaptações. Inicialmente, na solução fixadora utilizou-se PBS (tampão fosfato salino, ver composição em secção anterior "Imunodetecção") que foi substituido em fixações subsequentes por tampão PIPES (Salema e Brandão, 1973).

Porções de tecido foram fixadas em paraformaldeído 2, 3, ou 4% e glutaraldeído 0,5% em tampão PIPES 1,25%, pH 7,2 contendo normalmente sacarose 2%, $CaCl_2$ 0,05% durante 1-2 horas à temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C.

Para os tubérculos realizaram-se ensaios de retenção de antigenicidade com percentagens de glutaraldeído superiores às utilizadas normalmente. Para isso, extractos de tubérculo (20 µg de proteína) foram separados por SDS-PAGE e as proteínas electrotransferidas para nitrocelulose, conforme descrito anteriormente. A membrana foi dividida a meio sendo metade da membrana incubada em PIPES e a outra metade em PIPES contendo de glutaraldeído 2%, durante 2 horas. Após este tempo, procedeu-se à imunodetecção da GS na nitrocelulose conforme descrito anteriormente.

Na fixação de tecidos de tubérculo utilizou-se paraformaldeído 3 a 4% e glutaraldeído 0,5-1%.

Para o tabaco, porções de folha de de nervura central foram fixadas durante 2 h à temperatura ambiente em paraformaldeído 4%, glutaraldeído 0,2%, sacarose 1% e $CaCl_2$ 0,05% em M Pipes 0,1 pH 7,2. Os passos subsequentes de desidratação e infiltração com LR White foram executados conforme descrito para batateira.

Desidratação e impregnação

Após a fixação, procedeu-se à lavagem em PIPES 2,5%, seguido de glicil-glicina 1 mM em PIPES 2,5%, para saturar os aldeídos livres, evitando, assim, a ligação inespecífica dos anticorpos usados nas incubações para marcação citoquímica subsequnte (Esaguy et al, 1989). Após nova lavagem em PIPES (2 x 10 min) procedeu-se à desidratação em etanol em concentrações crescentes, normalmente 30%, 50%, 70%, 90% (v/v em água), etanol absoluto (10 min em cada). A impregnação em LR White foi feita gradualmente, em misturas de LR White:etanol de 1:2, 1:1 e 1:2 (v/v), 1 hora em cada, seguindo-se LR White puro toda a noite. Após nova mudança para LR White puro (1h) procedeu-se à inclusão em LR White novo, em cápsulas de gelatina, com a respectiva tampa. A polimerização ocorreu nas cápsulas fechadas, durante 22-24 horas a 55 ° C.

Os cortes ultrafinos foram obtidos com faca de vidro em ultramicrótomo LKB e recolhidos em grelhas de cobre ou de níquel de 400 buracos, não recobertas por membrana.

Para a inclusão em Unicryl (BioCell) o material foi fixado e desidratado conforme descrito. A infiltração foi feita em resina 100% 2 x 1 hora com agitação num volume 100 x volume da peça. Seguidamente, as peças foram colocadas em cápsulas de gelatina em resina a 100% num volume mínimo necessário para envolver e manipular a peça depois da polimerização, durante pelo menos 8 horas com agitação. As cápsulas foram fechadas e colocadas a polimerizar em estufa a 55ºC durante dois dias. Os cortes ultrafinos foram obtidos conforme descrito para o LR White.

Marcação imunocitoquímica de cortes ultrafinos

A detecção imunológica da GS nos cortes ultrafinos foi baseada no procedimento descrito por Esaguy et al (1989), com algumas alterações. A marcação indirecta dos cortes foi feita por incubação sucessiva das grelhas em gotas de soluções de anticorpos primários produzidos em coelho seguida de incubação em suspensões de conjugados de ouro coloidal com anticorpos secundários anti-coelho. As gotas foram colocadas em superfícies hidrofóbicas muito limpas, tal como parafilme ou cera dental, em placa de Petri ou outro recipiente fechado.

Para a marcação incubaram -se, sequencialmente as grelhas nas seguintes soluções: PBS (10 min); solução de lavagem constituida por PBS com BSA 1%, NaCl 3%, Tween-20 0,2%; soro policlonal anti-GS (IgG, 20 µg/mL) produzido em coelho (Cullimore e Miflin, 1984) dissolvido

na solução anterior (3-4 horas, à temperatura ambiente); solução de lavagem (6 x 5 minutos); anticorpo secundário de cabra anti-IgG de coelho conjugado com ouro coloidal de 10 (Sigma) e 15 nm (Amersham) na diluição de 1/30 feita na solução de lavagem (1 hora à temperatura ambiente); solução de lavagem (6 x 5 min); água bidestilada (2 x 10 min).

Para os controlos usou-se o mesmo procedimento mas substituindo o anti-soro primário por PBS ou soro não imune de coelho (20 µg/mL).

Contrastação

As grelhas foram contrastadas em acetato de uranilo (solução saturada de acetato de uranilo em álcool a 50% com ácido acético a 1% (Valentine, 1965)) durante 15-20 min, e citrato de chumbo (Reynolds, 1963; Venable e Goggeshall, 1965) durante 2-5 min. As grelhas foram postas a flutuar, com os cortes para baixo, sobre gotas dos contrastantes colocadas numa superfície hidrofóbica (ex°, parafilme ou cera dental). A contrastação foi efectuada em placa de Petri, na presença de partículas de NaOH, de modo a criar uma atmosfera livre de CO_2.

Os cortes ultrafinos foram observados em microscópio electrónico Siemens Elmiskop IA, e Zeiss EM C10 As imagens foram registadas em película fotográfica Agfa Gevaert 23D 56.

Microscopia óptica

Os cortes semi-finos (cercade 1 µm de espessura), dos mesmos blocos usados para imunocitoquímica ultraestrutural, foram obtidos num ultramicrótomo LKB, com faca de vidro, corados com Azul de metileno - Azure II (Azure 1% e Azul de metileno 1% em borato de sódio 1%), montados em lâmina de vidro e fotografados num fotomicrocópio Nikon.

Obtenção de microtubérculos *in vitro*

Procedeu-se à desinfecção de segmentos caulinares com 1,5 cm de comprimento, abrangendo a zona nodal. Para a desinfecção os segmentos caulinares foram imersos sucessivamente em álcool a 70% durante 10 minutos, 2 x em água esterilizada, lixívia 20% com Tween, durante 10 minutos e água esterilizada (3 passagens).

Os segmentos foram colocados em meio MN (composto por meio basal de Murashige e Skoog (1962), 2,36 g/L, sacarose 15 g/L, cineteina 0,1 mg/L, GA3 0,2 mg/L, pH 5,8 acertado com KOH, agar 10/L, autoclavado durante 20 minutos) em placas de Petri, com um ângulo de 30°, durante 4 semanas em estufa a 24°C.

Ao fim de 4 semanas formaram-se novas estruturas caulinares dos quais foram novamente cortados segmentos nodulares que foram transferidos para meio HS2 (meio basal de Murashige e Skoog 4,71 g/L Sacarose 60 g/L, BAP 2mg/L, pH 5,8 agar 10 g/L e CCC (cloreto de clorocolina) 1 g/L; o meio é autoclavado antes da adição de CCC, que é esterilizado por filtração e adicionado ao meio antes do plaqueamento) em placas de Petri seladas com parafilme e colocadas a 15°C, na obscuridade, para formação de microtubérculos.

Electroforese de DNA e RNA em gel de agarose

Excepto quando especificado de outro modo, a análise de DNA e RNA[1] decorreu em gel de agarose de grau de pureza para biologia molecular, dissolvida em tampão TAE (Tris-acetato 0,04 M, EDTA 0,001 M). A composição de solução "stock" 10 x concentrada de TAE contem (por litro): 48,4 g Tris base, 11,42 mL de ácido acético glacial, 20 mL de EDTA 0,5 M pH 8. O tampão de electroforese era 1 x TAE. As amostras eram previamente misturadas com tampão de amostra 6 x concentrado composto por azul de bromofenol 0,25% e glicerol 50% em TAE. Agaroses especiais com baixo ponto de fusão (exº SeaPlaque GTG e NuSieve GTG da FMC), foram utilizadas para extrair o DNA do gel e proceder a reacções enzimáticas com o DNA em agarose, como reacções de restrição, de ligação e marcação por nucleótidos radioactivos.

Quantificação de ácidos nucleicos

A quantificação de ácidos nucleicos foi efectuada espectrofotométricamente segundo as equações (Sambrook et al, 1989):

1 unidade de A_{260} = 50 µg/mL para DNA de cadeia dupla
1 unidade de A_{260} = 33 µg/mL para DNA de cadeia simples
1 unidade de A_{260} = 40 µg/mL para RNA de cadeia simples

Extracção de RNA de folha

Porções de folha foram congeladas em azoto líquido e trituradas em almofariz até obtenção de um pó fino que foi transferido para um tubo cónico de 50 mL e ao qual se adicionou 5 mL de tampão de extracção (ácido p-aminosalicílico 4% e ácido naftalenodisulfónico (sal dissódico) 1%) e 5 mL de fenol saturado com água. Depois de dispersar o pó, adicionou-se mais 5 mL de clorofórmio e homogeneizou-se em Polytron (Polytron Ultra-Turrax, T-25, Janke and Kunkel, IKA) à velocidade máxima durante 45 segundos em gelo. Transferiu-se a mistura para tubo Corex de 30 mL e centrifugou-se a 4°C em centrífuga Sorvall em rotor HB-4 a 6000 rpm durante 15 minutos para precipitar os polissacarídeos. O sobrenadante foi recolhido e adicionou-se 1/10 do seu volume de acetato de sódio 3 M pH 5,2, misturou-se bem e adicionou-se mais 2 volumes de etanol absoluto, após o que se colocou o tubo no gelo durante 30 minutos a 24 horas. Precipitaram-se os ácidos nucleicos por centrifugação em centrífuga Sorvall como descrito anteriormente e o sedimento, após secar brevemente (5 minutos), foi ressuspenso em água autoclavada. A esta solução adicionou-se 2,5 mL de LiCl 8M, misturou-se bem e deixou-se em gelo durante a noite. Após centrifugação nas condições descritas, o

[1] Técnicas e cuidados gerais em Biologia Molecular:
Nos procedimentos gerais envolvendo DNA e RNA e técnicas relacionadas, utilizaram-se os princípios e os cuidados descritos na literatura especializada (exº, Sambrook et al, 1989).

sedimento foi lavado com 500 µL de etanol 80%, e após secar brevemente foi ressuspenso em água estéril e a solução conservada a -20°C.

Extracção de RNA de tubérculo

Foi utilizado uma técnica descrita para extracção de RNA de batata doce adequada para extracção de RNA de órgãos vegetais com elevado tor de carbohidratos (Yeh et al, 1992). Porções de tubérculo foram congeladas em azoto líquido e trituradas em almofariz em tampão de extracção (guanidina-HCl 7,5 M, citrato de sódio 25 mM, lauril-sarcosinato 0,5% e 2-mercaptetanol 0,1 M). O homogeneizado foi centrifugado em centrífuga Sorvall durante 10 minutos a 12000 x g, a 4°C. Foi feita a extracção mediante a adição de fenol/clorofórmio/álcool isoamilico (24:24:1) e centrifugação a 5000 rpm durante 4 minutos. Após repetição do processo anterior, adicionou-se clorofórmio/álcool isoamilico (24:1) e após centrifugação, adicionou-se ao sobrenadante 1/15 do volume de acetato de sódio 4,5 M e 2 volumes de isopropanol frio. A mistura foi deixada durante a noite a -20°C após o que foi centrifugada a 17000 x g durante 20 minutos a 4°C. O sedimento foi lavado com etanol a 75% e seco no vácuo, e seguidamente, ressuspenso em água e mantido a -20°C.

Determinação da qualidade do RNA

O RNA isolado e utilizado para isolamento de mRNA, síntese de cDNA e "Northern blotting" deve estar livre de DNA e proteína.

A pureza do RNA foi estimada através da razão Abs_{260}/Abs_{280}. Preparações puras exibem uma razão $Abs_{260}/Abs_{280}>=2,0$, sendo de esperar, na prática, valores entre 1,7-2,0. Valores inferiores denotam contaminação, tipicamente por proteínas ("Promega protocols and applications guide", 1991)

A integridade foi avaliada rapidamente por separação em electroforese não desnaturante em gel de agarose (1,5% em TAE) contendo brometo de etídio na concentração de 1 µg/mL. As bandas 28S e 18S de RNA ribossomal eucariótico deverão apresentar uma intensidade (avaliada pela emissão de luz pelo brometo de etídio) aproximadamente de 2:1) ("Promega protocols and applications guide", 1991).

Isolamento de mRNA (poli(A)$^+$)

O isolamento de mRNA foi feito com o sistema PolyATtract (Promega). De acordo com as instruções utilizou-se um oligonucleótido iniciador biotinilado que hibridiza, com elevada eficiência em solução com a região poli(A) a 3' presente na maioria dos mRNA eucarióticos. Os híbridos foram capturados com streptavidina ligada a esferas magnéticas que foram sedimentadas por meio de um magneto. Depois de uma lavagem das partículas com 0,1 x SSC[1], o RNA foi eluído por ressuspensão das partículas em água livre de RNases. As

[1] Tampão 20 X SSC: NaCl 3 M, citrato de sódio 0,3 M.

partículas foram sedimentadas por meio do magneto e o sobrenadante, contendo o mRNA foi recuperado e calculada a sua concentração. O mRNA foi concentrado por precipitação alcoólica em que se adicionou ao sobrenadante 1/10 do seu volume de acetato de potássio 3 M e 1 volume de isopropanol, após o que se deixou a incubar durante a noite a -20°C e se centrifugou a 12000 x g durante 10 minutos. O sedimento foi ressuspenso em etanol 75% novamente submetido a centrifugação. O mRNA precipitado foi ressuspenso em água para uma concentração aproximada de 1 μg/μL.

Síntese de cDNA

Para síntese e clonagem do cDNA utilizou-se o sistema RiboClone (Promega). Este sistema baseia-se no método introduzido por Okayama e Berg (1982) e modificado por Gubler e Hoffman (1983). Neste método, a síntese da primeira cadeia de cDNA é efectuada por meio da AMV transcriptase reversa (transcriptase reversa de retrovirus de aves) na presença de pirofosfato de sódio 4 mM, que inibe a formação de estruturas secundárias em "gancho de cabelo" na extremidade 3' da primeira cadeia de cDNA. Seguidamente, utiliza-se a RNase H que cria descontinuidades na cadeia de mRNA no híbrido mRNA:cDNA. Os fragmentos de mRNA servem de iniciadores e são substituidos na síntese da segunda cadeia de cDNA pela DNA polimerase I. Após tratamento com DNA ligase de *E. coli*, para reparação da cadeia de cDNA, procede-se ao tratamento com T4 DNA polimerase para remover as extremidades protuberantes a 3' criando extremidades a direito ("blunt") que permitem a adição de adaptadores ou ligadores adequados.

Na síntese da primeira cadeia, utilizou-se como inciador-adaptador um oligodesoxinucleotídeo que consiste num oligo (dT) adjacente a um local único de de restrição (*Not*I), que permite a posterior inserção orientada do cDNA no vector (Apêndice 1.3, Fig. A1.5). A sequência do *Not*I iniciador-adaptador é 5'-CAATTCGCGGCCGC$(T)_{15}$-3'

Após a síntese da segunda cadeia de cDNA e criação de extremidades a direito, foram adicionados adaptadores de *Eco*RI o que evita a necessidade de metilar os locais *Eco*RI do cDNA. Os adaptadores em excesso foram removidos por cromatografia e após restrição com enzima *Not*I obtiveram-se moléculas de cDNA com uma extremidade *Eco*RI a 5' e uma extremidade *Not*I a 3', permitindo a inserção orientada no vector.

Como vector utilizou-se o fago Lambada gt11 *Sfi-Not* (Promega) que é um derivado do fago Lambda gt11 (Huynh et al, 1985; Young e Davies, 1983) com a adição de locais de restrição *Not*I e *Sfi*I na proximidade do local *Eco*RI (Apêndice 1.3).

Síntese da primeira cadeia de cDNA

Na síntese da primeira cadeia de cDNA foram utilizados 5 μg de mRNA ao qual se adicionou 1,5 μg de iniciador-adaptador *Not*I, num volume total de 15 μL. Aqueceu-se a 70°C durante 5 min e após arrefecimento adicionou-se 11 μL de 5 X tampão (Tris-HCl 250 mM, pH 8,3, KCl

250 mM, $MgCl_2$ 50 mM, DTT 50 mM e 5 mM de cada dNTP), 1 µL de inibidor de ribonucleases rRNasin, 5,5 µL de pirofosfato de sódio 40 mM e AMV trascriptase reversa (15 U/ µg RNA) e água para um volume final de 55 µL.

A este volume foram retirados 5 µL para utilizar numa reacção contendo 5 uCi de ^{32}PdCTP como marcador da síntese da primeira cadeia.

Os tubos de reacção foram incubados a 42°C durante 60 minutos e colocados em gelo. Ao tubo com marcador radioactivo foi adicionado EDTA 50 mM para perfazer o volume de 100 µL e o tubo foi colocado em gelo.

Síntese da segunda cadeia de cDNA

Para a síntese da segunda cadeia adicionou-se aos 50 µL da reacção anterior 25 µL de 10 X tampão da segunda cadeia (Tris -HCl 400 mM, pH 7,2, KCL 900 mM, $MgCl_2$ 30 mM, BSA 0,5 mg/mL, DTT 30 mM), 5 µL (57 U) de *E. coli* DNA polimerase I, 1,5 µL (2 U) de RNase H e água para um volume final de 250 µL. A este volume foram retirados 10 µL para utilizar numa reacção contendo 5 uCi de ^{32}PdCTP como marcador da síntese da segunda cadeia.

Ambos os tubos foram a incubar a 14°C durante 2 horas.

Ao tubo de reacção (sem marcador radioactivo), após aquecimento a 70°C durante 10 minutos e arrefecimento em gelo, foi adicionado 1,25 µL (10 U) de T4 DNA polimerase. O tubo foi incubado a 37°C durante 10 minutos e a reacção foi terminada com a adição de 25 µL de EDTA 200 mM. O cDNA foi extraído com igual volume de uma mistura de fenol:clorofórmio (1:1), e à fase aquosa foi adicionado 1/2 volume de acetato de amónio 7,5 M e 2,5 volumes de etanol frio (-20°C). Após incubação a -20°C durante 30 minutos, o cDNA foi precipitado por centrifugação, o sedimento foi lavado com etanol a 70% e ressuspenso em água.

Ao tubo com marcador radioactivo foi adicionado EDTA 50 mM para perfazer o volume de100 µL e o tubo foi colocado em gelo.

Avaliação da eficiência de síntese das cadeias de cDNA

De cada tubo contendo o produto diluído das reacções de síntese da primeira e da segunda cadeia de cDNA na presença de ^{32}P-dCTP, foram utilizados 10 µL para avaliar a incorporação de nucleótidos e os restantes 90 µL foram utilizados para análise em gel de electroforese.

Avaliação da incorporação de nucleótidos por precipitação com TCA

De cada tubo de reacção com marcador radioactivo foram retirados duas amostras de 3 µL que foram colocadas em filtros de fibra de vidro, que se deixaram secar ao ar. Um dos filtros de cada par foi usado para medir a a radioactividade total na na reacção e o outro filtro foi utilizado para medir apenas a radioactividade precipitada por ácido (Sambrook et al, 1989).

Um filtro de cada par foi transferido para um frasco contendo 200-300 mL de uma solução contendo TCA 5% e pirofosfato de sódio 20 mM, arrefecida no gelo. O filtro foi agitado na solução durante dois minutos e transferido para outro frasco com a mesma solução, repetindo-

se o processo de lavagem mais duas vezes. Neste processo os nucleótidos não incorporados são eluídos dos filtros enquanto que os ácidos nucleicos radioactivos ficam no filtro.

Os quatro filtros foram transferidos para frascos de cintilação e os cpm foram medidos num contador de cintilações.

Cálculo do rendimento para a primeira cadeia de cDNA:

cpm incorporados x 100% = % de incorporação
cpm totais

4 nmoles dNTP/µL x volume de reacção (µL) x % de incorporação/100 = nmoles de dNTPs incorporados

nmoles de dNTPs incorporados x 330 ng/mole = ng cDNA sintetizado

ng cDNA sintetizado x 100% = % mRNA convertida a cDNA
ng mRNA utilizados

Cálculo do rendimento para a segunda cadeia de cDNA:
cpm incorporados x 100% = % de incorporação na segunda cadeia
cpm totais

[0,8 nmoles dNTP/µL x volume de reacção (µL) - nmoles incorporados na síntese da primeira cadeia] x % incorporação na segunda cadeia/100 = nmoles de dNTPs incorporados.

nmoles dNTP incorporados x 330 ng/mole = ng de segunda cadeia de cDNA sintetizada

ng de segunda cadeia de cDNA sintetizada x 100%
ng de primeira cadeia de cDNA sintetizada

= % de conversão em cDNA de cadeia dupla

Análise do cDNA por electroforese em gel de agarose

A gama de tamanhos das moléculas de cDNA obtidas após a reacção de síntese da primeira e segunda cadeias foi avaliada em gel alcalino de agarose a 1,4% em tampão alcalino de electroforese (Sambrook et al, 1989). Para preparação do gel alcalino, a agarose foi primeiro dissolvida em água e depois de arrefecida a 60°C adicionou-se NaOH para concentração final de 50 mM e EDTA para concentração final de 1 mM. O brometo de etídio foi omitido do gel porque não se liga ao DNA a pH elevado.

Ao volume restante (90 µL) nos tubos de reacção com marcador radioactivo foi adicionado igual volume de uma mistura de fenol:clorofórmio (1:1), e à fase aquosa foi adicionado 1/2 volume de acetato de amónio 7,5 M e 2,5 volumes de etanol frio (-20°C). Após incubação a -20°C durante 30 minutos, o cDNA foi precipitado por centrifugação, o sedimento foi lavado em etanol a 70% e ressuspenso em água (20 µL) A cada tubo adicionou-se igual volume de 2 x tampão de amostra (NaOH 20 mM, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,025%).

O gel foi deixado a equilibrar no tampão alcalino de electroforese (NaOH 50 mM, EDTA 1 mM) durante 30 minutos antes de carregar as amostras e proceder à electroforese. No final

desta, o gel foi imerso em TCA 7% durante 30 minutos à temperatura ambiente, foi envolvido em plástico e exposto a filme de autorradiografia, à temperatura ambiente, durante a noite.

Ligação dos adaptadores de *Eco*RI ao cDNA

Fraccionamento do cDNA por tamanhos

Antes de ligar os adaptadores o cDNA foi submetido a cromatografia para eliminar as moléculas de tamanho inferior a 200 bp.

Foram utilizadas colunas de Sephacryl S-400 (suspensão em Tris-HCl 10 M, pH 8, NaCl 100 mM, EDTA 1mM) (Promega) que excluem fragmentos de cDNA de cadeia dupla com tamanho superior a 271 bp.

O cDNA foi aplicado no topo da coluna e esta foi submetida a centrifugação a 800 x g durante 5 minutos. O cDNA eluído foi usado directamente para ligação dos adaptadores.

Ligação dos adaptadores

Preparou-se a reacção de ligação contendo 12 µL de 10 x tampão de ligase (Tris-HCl 300 mM pH 7,8, $MgCl_2$ 100 mM, DTT 100 mM, ATP 5 mM), 12 µL de BSA (1mg/mL), 80 µL de cDNA (aprox 1 µg), 4 µL de adaptadores *Eco*RI (10 µM), 10 µL de T4 DNA ligase (3 U/µL) e água para um volume final de 120 µL. A mistura foi a incubar a 15°C durante a noite e a reacção foi inativada a 70°C durante 10 minutos.

A sequência dos adaptadores *Eco*RI (Promega) é a seguinte:

```
5'-AATTCCGTTGCTGTCG-3'
    3'-GGCAACGACAGCp-5'
```

Reacção com cinase

Uma vez que o vector estava desfosforilado, era necessário proceder a reacção de cinase. Como era necessário digerir o cDNA com *Not*I, a fim deproceder à clonagem orientada, efectuaram-se as duas reacções simultaneamente substituindo o tampão da cinase pelo tampão de restrição. Directamente no tubo onde se efectuou a ligação dos adaptadores, adicionou-se 14,5 µL de 10 x tampão da *Not*I (Promega), 8 µL de ATP 0,1 mM, 4 µL de T4 polinucleotídeo cinase (40 U), 0,5 µL de *Not*I (20 U) e água para um volume final de 147 µL. O tubo foi colocado a 37°C durante 1 hora e seguidamente procedeu-se à extracção com igual volume de fenol/clorofórmio.

Remoção dos adaptadores não ligados

Para remover os adaptadores não ligados, o produto da reacção anterior foi passado por uma coluna de Sephacryl S-400 como anteriormente descrito e o cDNA eluído foi precipitado com 1/10 de volume de acetato de sódio 3 M e 2,5 volumes de etanol absoluto e seguidamente ressuspenso em água.

Ligação do cDNA ao vector

Nas reacções de ligação utilizaram-se braços desfosforilados de fago Lambda gt11 *Sfi-Not* (Promega) submetido a dupla digestão com *Eco*RI e *Not*I.

Preparam-se reacções de ligação com proporções diferentes de vector cDNA (assumindo o tamanho médio do cDNA de 1,5 kb; tamanho do vector: 43 kb):

Ligação 1 (razão molar vector:cDNA aprox. 1:1,5): 4 µL de vector (2 µg), 1 µL de cDNA (aprox 100 ng), 0,6 µL de 10 x tampão da ligase e 0,5 µL de T4 DNA ligase (1 unidade Weiss), num volume final de 6 µL.

Ligação 2 (razão molar vector:cDNA aprox. 1:3): 2 µL de vector (1 µg), 1 µL de cDNA (aprox 100 ng), 0,5 µL de 10 x tampão da ligase e 0,5 µL de T4 DNA ligase (1 unidade Weiss) num volume final e 4 µL.

Os tubos foram a incubar a 14°C durante a noite.

Simultaneamente preparou-se uma reacção de ligação com um DNA controlo (plasmídio pGEM-9Zf(-), com 2925 bp, digerido com *Eco*RI e *Not*I), fornecido com o vector, contendo: 1 u de vetor (0, 5 µg), 1 µL DNA controlo (200 ng), 10 x tampão de ligase, 0,5 µL de T4 DNA ligase (1 unidade Weiss) e água para um volume final de 5 µL.

Esta reacção destina-se a testar a eficiência de clonagem e a eficiência da reacção de empacotamento.

Empacotamento *in vitro* e propagação em *Escherichia coli*

Para reacção de empacotamento *in vitro* do DNA resultante das reacções de ligação anteriores utilizou-se o sistema GIGAPACK II (Stratagene).

Na reacção de empacotamento utilizou-se a totalidade do DNA resultante das reacções de ligação ao qual foram adicionados os extractos de empacotamento e 500 µL de tampão de fago (Apêndice 1.1), num volume final aproximado de 530 µL.

Como controlo da reacção, procedeu-se ao empacotamento do fago lambda selvagem-cI857Sam7, fornecido juntamente com o sistema.

A partir de uma alíquota de cada reacção de empacotamento preparam-se diluições seriadas, infectaram-se estirpes de *E. coli* LE 392 e Y1090R- (Apêndice 1.2).

Preparação das bactérias hospedeiras

Os meios de cultura utilizados no crescimento de bactérias e fagos estão descritos no (Apêndice 1.1):

Bactérias da estirpe LE 392, foram cultivadas em meio sólido (L-Agar). Uma colónia isolada foi usada para inocular 3 mL de meio LB suplementado que foi incubado durante a noite a 37°C, com agitação. Desta cultura, foram usados 500 µL para inocular 50 mL de meio LB

suplementado. Deixou-se a incubar a 37°C, com agitação, aprox. 2,5 horas (até $DO_{600} = 0,6$) e colocou-se em gelo até utilização.

Para a estirpe Y1090R- utilizou-se o mesmo procedimento mas os meios L-Agar e LB foram suplementados com ampicilina, já que esta estirpe possui um plasmídio pMC9 que lhe confere resistência e este antibiótico (Apêndice 1.2).

Infecção das bactérias e plaqueamento dos fagos

A partir de uma alíquota de cada reacção de empacotamento preparam-se diluições seriadas (10^{-3} a 10^{-5}), em tampão de fago. Adicionou-se 10 µL de cada de cada uma das diluições de fago a 200 µL de bactérias hospedeiras preparadas como anteriormente descrito e incubou-se durante 20 minutos a 37°C. Adicionou-se a cada tubo 3 mL de top-agarose liquefeita, a 48°C, misturou-se no vórtex e verteu-se em placas de L-agar. Para as bactérias Y1090R-, utilizou-se top-agarose suplementada com IPTG e X-Gal para permitir a selecção visual dos recombinantes. Após 10 minutos à temperatura ambiente, incubaram-se as placas a 37°C durante 12 horas.

As placas fágicas foram contadas e determinados os parâmetros abaixo indicados. Em todos os casos, execepto na determinação da percentagem de recombinantes, foi utilizada estirpe LE392, pois embora não permita a selecção visual dos recombinantes, permite a obtenção de títulos mais elevados. Na determinação da percentagem de recombinates utilizou-se a estirpe Y1090 pois permite a identificação dos recombinantes pela cor (Apêndice 1.2).

i) *Título,* expresso em pfu/mL (pfu, "plaque forming units") expressa o nº de partículas fágicas capazes de infectar e dar origem a placas de lise, por mililitro da mistura resultante do empacotamento:

$$\text{pfu/mL} = \frac{\text{número de placas fágicas x diluição}}{\text{volume de fago plaqueado (mL)}}$$

ii) *Eficiência da reacção de empacotamento in vitro,* expressa em pfu/µg de fago Lambda selvagem:

$$\text{pfu/µg} = \frac{\text{nº de placas fágicas x diluição x volume total de empacotamento (µL)}}{\text{DNA empacotado (µg) x volume de fago plaqueado (µL)}}$$

iii) *Eficiência de ligação do DNA controlo aos braços do vector,* expressa em pfu/µg de braços de vector:

$$\text{pfu/µg} = \frac{\text{nº de placas fágicas x diluição x volume total de empacotamento (µL)}}{\text{braços do vector (µg) x volume de fago plaqueado (µL)}}$$

iv) *Percentagem de recombinantes*: Apesar de se esperar uma baixa percentagem de religação dos braços do vector, calculou-se a percentagem de recombinates plaqueando os fagos em estirpe Y1090 e em meio contendo IPTG e X-Gal. Os fagos recombinates dão origem a placas de lise transparentes enquanto que os braços religados dão origem a placas de lise azuis (Apêndice 1.3). A percentagem de recombinantes determina-se contando o número de placas transparentes no total de placas de lise:

$$\% \text{ de recombinates} = \frac{\text{nº de placas transparentes x 100\%}}{\text{nº total de placas (azuis + transparentes)}}$$

v) *Eficiência da clonagem de cDNA* é calculada a partir do número de recombinantes obtido e é expressa em pfu (recombinantes)/µg de cDNA:

$$\text{pfu/µg} = \frac{\text{nº de placas fágicas x diluição x volume total de empacotamento (µL)}}{\text{cDNA (µg) x volume de fago plaqueado (µL)}}$$

$$\text{x \% de recombinantes/100}$$

vi) *Tamanho da biblioteca:* número total de fagos recombinantes independentes, presentes na biblioteca primária:

nº de recombinates = título (pfu/mL) x volume total da biblioteca (mL) x % de recombinantes/100

Amplificação da biblioteca

Para amplificação de uma biblioteca primária, preparam-se culturas de estirpe LE392 conforme descrito e dividiu-se a cultura por 20 tubos em alíquotas de 600 µL. A cada tubo adicionou-se um volume de suspensão de fagos correspondente aproximadamente a 75000 fagos (num total de 1,5 x 10^6 fagos) e depois de incubação a 37°C durante 15 minutos, adicionou-se 6,5 mL de top-agarose e verteu-se em placa de Petri de 150 mm de diâmetro. As placas de Petri (20 placas) foram colocadas a incubar a 37°C durante aproximadamente 6 horas, sendo periodicamente observadas de modo a evitar que as placas de lise crescessem demasiado, levando à confluência de placas.

Adicionou-se a cada placa 10 mL de tampão de fago e colocaram-se as placas a 4°C durante 16 horas. O tampão de fago foi depois recuperado para tubos cónicos de 50 mL e as placas foram lavadas com tampão de fago (2 mL por placa) que foi adicionado ao tampão anteriormente recuperado. Adicionou-se à suspensão de fagos clorofórmio para concentração de 5% e após incubação à temperatura ambiente durante 15 minutos, centrifugou-se 5 minutos a 2000 x g. O sobrenadante foi recuperado e adicionou-se clorofórmio para a concentração de 0,3%. Procedeu-se a diluições seriadas de uma alíquota e determinou-se o título (pfu/mL) da

biblioteca amplificada, conforme anteriormente descrito. O restante volume da biblioteca (aprox. 200 mL) foi dividido em alíquotas de 1 mL a que se adicionou DMSO para concentração de 7% e guardadas a -70°C.

Verificação da especificidade dos anticorpos anti-GS para rastreio da biblioteca

Para verificar se os anticorpos anti-GS de feijoeiro utilizados neste trabalho em técnicas de "Western blotting" e imunocitoquímica reconheciam proteinas de *E. coli*, procedeu-se à separação de extracto *E. coli* por SDS-PAGE, e transferiram-se as proteinas para membrana de celulose que foram incubadas com anticorpos anti-GS. a detecção foi feita por anticorpos secundários anti-coelho conjugados com peroxidase conforme descrito em secções anteriores.

Para o extracto de *E. coli*, utilizaram-se 3 mL de uma cultura de células LE392 crescida durante a noite. As células foram sedimentadas por centrifugação e o sedimento ressuspenso em tampão de tratamento da amostra (Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, SDS 4%, glicerol 20% e 2-mercaptoetanol 10%). A electroforese em gel desnaturante de acrilamiada a 4% no gel concentrador e 10% no gel separador, a transferência e a imunodetecção de polipeptídeos foram efectuadas como descrito em secções anteriores.

Obtenção da sonda específica de cDNA de GS para rastreio da biblioteca

Desenho dos iniciadores e amplificação do cDNA por PCR

A partir de sequências cDNAs de GS, obtidas a partir de bancos de dados (EMBL, Apêndice2) escolheu-se uma região bem conservada entre as sequências de cDNA de GS citosólicas e cloroplastidiais, de aproximadamente 400 bp, para ser amplificada por PCR. Com base nas sequências obtidas, desenharam-se dois oligonucleótidos iniciadiores, contendo cada um, um local *Eco*RI, para posterior clonagem, com a seguinte sequência (5'--->3'):

Iniciador a 5': GSR1-(GAATTC)TCCTGCTGGCGAGCC
Iniciador a 3': GSR2-(GAATTC)TGTGAGCACCTGCACC

Utilizando cDNA total de folha de batateira como molde e os referidos oligonucleótidos iniciadores, procedeu-se a vários ensaios para apurar as condições da reacção de PCR de modo a obter apenas uma banda visível em gel de agarose após electroforese dos produtos de PCR.

Numa primeiro conjunto de reacções, manteve-se constante a quantidade de cDNA utilizado, variando-se as concentrações dos iniciadores. As reacções de PCR foram preparadas num volume final de 50 µL, contendo 1 ng de cDNA, 5 µL de 10 x tampão de enzima (Tris-HCl 100 mM pH 8,3, KCl 500 mM, $MgCl_2$ 15 mM, gelatina 0,01%) dNTPs (dATP, dGTP, dCTP e dTTP, Boehringer Manheim) na concentração final de 200 µM cada, iniciadores com concentrações que variavam entre 0,1 µM e 0,5 µM e 0,25 µL de enzima (5 U/µL) AmpliTaq DNA Polimerase (Perkin-Elmer, Cetus).

Numa segundo conjunto de reacções, repetiu-se o procedimento anterior mas manteve-se constante a concentração dos iniciadores (0,25 μM), variando-se em cada reacção a quantidade de cDNA que foi de 1 ng e 0,5 ng.

Para a reacção de PCR adicionaram-se ao tubo todos os componentes da mistura, execepto a enzima. A mistura foi aquecida a 97°C durante 2 minutos para desnaturar o DNA e a enzima foi adicionada quando a temperatura atingiu os 60°C. As condições de reacção foram: desnaturação a 94°C durante 15 segundos, emparelhamento a 55°C durante 30 segundos, e polimerização a 72°C durante dois minutos. Ao fim de 34 ciclos acrescentou-se um passo final de extensão a 72°C durante 5 minutos.

Os produtos das reacções de PCR foram analisados em gel de agarose com baixo ponto de fusão, SeaPlaque GTG 1% e NuSieve GTG 4% (FMC) em tampão TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1mM, pH8).

Clonagem dos produtos de PCR

Foram utilizadas duas estratégias para clonagem do produto de PCR

1) Tirando partido de a Taq DNA polimerase adicionar um dATP extra na extremidade dos fragmentos amplificados, inseriu-se o DNA obtido por PCR em plasmídio pBluescript II SK (Stratagene) (Apêndice 1.3) previamente cortado com *Eco*RV e ao qual foram adicionadao dTTPs.

A banda correspondente ao produto de amplificação por PCR foi exisada do gel e o DNA foi eluído da agarose (SeaPlaque) por extracção fenólica do seguinte modo: à agarose liquefeita a 67°C durante 10 minutos, adicionou-se TE (10mM Tris-HCl, pH 8, 1mM EDTA) a 67°C misturou-se e manteve-e a 67°C. Adicionou-se um volume de fenol em TE à temperatura ambiente, misturou-se, e centrifugou-se a 1600 x g durante 15 segundos. A fase aquosa foi removida e repetiu-se a extracção uma vez com fenol e outra vez com fenol:clorofórmio (1:1). O DNA na fase aquosa foi precipitado com 1/10 de volume de acetato de sódio 3 M e 2 volumes de etanol absoluto, durante a noite a -20°C.

O fragmento de DNA assim obtido foi inserido em vector pBluescipt SK II, preparado do seguinte modo: 5 μg de plasmídio foram digeridos com *Eco*RV em tampão apropriado após o que se procedeu à extracção fenólica e precipitação com etanol. O DNA foi ressuspenso em 100 μL de água.

Preparou-se uma reacção com DNA plasmídico, dTTP 100 mM, 10 μL de 10 x tampão de AmpliTaq DNA Polimerase (Perkin-Elmer, Cetus), 2,5 U de AmpliTaq DNA Polimerase (Perkin-Elmer, Cetus) e água para um volume final de 100 μL. A reacção decorreu a 72°C durante 2 horas. Após extracção fenólica e precipitação com etanol do produto de PCR, repetiu-se a reacção nas mesmas condições.

Para ligação do do cDNA amplificado ao vector utilizaram-se 1 μL de vector (aprox. 75 ng) e quantidades diferentes de cDNA, a qua se adicionou T4 DNA ligase (Gibco/BRL) e tampão apropriado num volume final de 10 μL.

2) A banda correspondente ao produto de amplificação por PCR foi exisada do gel e o DNA foi digerido, na agarose (SeaPlaque) com *Eco*RI, do seguinte modo: adicionou-se um volume de água ao gel, aqueceu-se a 68°C durante 10 minutos e depois de arrefecer a 37°C adicionou-se *Eco*RI e tampão apropriado, incubando-se a 37°C, durante a noite. A enzima foi inactivada por aquecimento a 68°C durante 10 minutos.

Para a reacção de ligação utilizaram-se directamente diferentes volumes da mistura anterior, 50 ng de plasmídio pBS (Stratagene) (Apêndice 1.3) cortado com *Eco*RI T4 DNA ligase e tampão de enzima (Gibco/BRL), num volume final de 10 µL. Um terço do volume total da reacção de ligação foi utilizado para transformar células de *E. coli* das estirpes TG2 e DH5α (Apêndice 1.2).

Transformação de estirpes de *Escherichia coli*

Para transformação, utilizaram-se estirpes de *E. coli* que permitem a identificação visual dos clones recombinates quando transformadas com plasmídios adequados As bactérias contendo plasmídio religado dão origem a colónias azuis quando cultivadas em meio contendo IPTG e X-Gal (Apêndice 1.2) enquanto os clones recombinantes dão origem a colónias brancas.

Para preparação de células competentes para transformação utilizou-se o método com cloreto de cálcio, adaptado de Cohen et al (1972). Uma colónia de cada estirpe foi isolada a partir de uma placade L-Agar com ampicilina (Apêndice 1.1) e usada para inocular 50 mL de meio LB com ampicilina. Após incubação a 37°C, durante a noite, com agitação, retiraram-se 500 µL desta cultura que se adicionaram a 50 mL de meio LB com ampicilina. Incubou-se a 37°C, com agitação, durante aproximadamente 2 horas até $DO_{550} = 0,26$ e colocaram-se os tubos em gelo, pelo menos durante 10 minutos.

As células foram sedimentadas por centrifugação a 3000 rpm durante 5 minutos e ressuspensas em 10 mL de $CaCl_2$ 100 mM, esterilizado por filtração e previamente arrefecido no gelo. Colocaram-se os tubos em gelo durante 20 minutos e centrifugou-se novamente. O sedimento foi ressuspenso em 1 mL de $CaCl_2$ 100 mM arrefecido e a suspensão foi colocada em gelo. As células competentes foram utilizadas para transformação após 3 horas ou uma noite de incubação no gelo.

Na transformação utilizaram-se 100 µL de suspensão de células em $CaCl_2$, que se colocaram num tubo em gelo. A cada tubo com células adicionou-se 1/3 do volume total da reacção de ligação do DNA ao plasmídio. Incubou-se em gelo durante 30 minutos e seguidamente procedeu-se ao choque térmico colocando os tubos a 37°C durante 2 minutos ou 42°C durante 45 segundos. Colocaram-se os tubos novamente em gelo durante pelo menos 2 minutos, adicionou-se 400 µL de meio LB e colocaram-se a incubar a 37°C, durante 1 hora, com agitação. Plaqueram-se 125 µL em placas de L-Agar contendo ampicilina, IPTG e X-Gal (Apêndice 1.1) que se colocaram a 37°C, durante a noite.

As colónias contendo plasmídio recombinante (brancas) foram recolhidas e cultivadas em meio líquido LB suplementado com ampicilina. Às culturas assim obtidas adicionou-se glicerol para concentração final de 10% e guardaram-se a -70°C para posterior análise.

Certificação do produto de PCR e do cDNA clonado

"Southern blotting" do produto de PCR

Procedeu-se à reacção de PCR, conforme anteriormente descrito, para amplificação de um fragmento de cDNA por meio de iniciadores com sequências específicas para a GS (GSF1 e GSR1). A mistura resultante da reacção de PCR foi submetida a electroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE. O gel foi colocado em solução de desnaturação (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M) durante 45 minutos e em solução de neutralização (Tris-HCl 1 M pH 7,4, NaCl 1,5 M). A transferência para membrana de "nylon" foi efectuada durante 4 horas em tampão 20 x SSC (NaCl 3 M, citrato de sódio 0,3 M). A membrana foi lavada com 2 x SSC e colocada a 80°C durante 2 horas para fixação do DNA. As condições de pré-hibridização e hibridização foram idênticas às descritas para o rastreio da biblioteca. Como sonda utilizou-se um fragmento de cDNA de GS de feijoeiro (subunidade β), marcada com ^{32}P, pelo "Multyprime labelling system" (Amersham). O DNA a ser marcado (cerca de 20 ng) foi diluído em água num volume final de 31 µL, desnaturado por fervura durante 3 minutos e colocado em gelo. Adicionou-se ao DNA 10 µL de tampão de marcação (dATP, dGTP e dTTP em Tris-HCl, pH 7,8, $MgCl_2$ e 2-mercaptoetanol), 5 µL da solução BSA+oligonucleótidos iniciadores aleatórios, 2 µL de ^{32}P-dCTP (10 µCi/mL) e 2 µL de enzima Klenow (1 U/mL) num volume final de 50 µL. Misturou-se suavemente e incubou-se em recipiente de chumbo durante 1 hora a 37°C. A sonda foi purificada em colunas de Sephadex G-50 em TNE2 (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 20 mM EDTA 2mM e SDS 0,1%) ou em colunas "NuTrap Probe Purification Columns" (Stratagene).

Rastreio das colónias contendo plasmídio recombinante

A partir das culturas originárias de colónias brancas, contendo plasmídio recombinante fez-se uma repicagem ordenada para placa de Petri com meio L-Agar com ampicilina, que foi incubar a 37°C, durante a noite. A transferência das colónias foi feita colocando dobre as colónias um filtro Whatman 541 previamente humedecido em placas de Petri só com meio de cultura. Após a transferência, o filtro foi colocado com a face das colónias para cima, sobre papel de filtro Whatman 3 MM saturado com tampão de desnaturação (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M) a 37°C durante 30 minutos e seguidamente sobre papel de filtro saturado com tampão de neutralização (NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,5 M pH 8) a 37°C durante 30 minutos. Após lavagem em 2 x SSC durante 5 minutos, o filtro foi colocada a 80°C durante 2 horas para fixação do DNA. As condições de pré-hibridização e hibridização foram idênticas às descritas para o rastreio da biblioteca. Como sonda utilizou-se um fragmento de cDNA de GS de feijoeiro (subunidade β), marcada com ^{32}P como anteriormente descrito.

Das colónias que hibridizavam positivamente com a sonda preparam-se culturas em meio líquido, que se congelaram a -70°C com 10% de glicerol.

Minipreparação de DNA plasmídico e sequenciação

O DNA plasmídico foi extraído a partir de culturas em meio líquido através do sistema "Magic Minipreps DNA Purification System" da Promega.

A partir de um dos clones positivos (clone "D") obteve-se plasmídio recombinante purificado (pSK-D). Procedeu-se à sequenciação, pelo método de Sanger (1981) com o sistema "Sequenase 2.0" da USB, utilizando como iniciadores oligonucleotídeos que hibridizam com o sequências do vector, flaquendo o local de clonagem múltipla. Como iniciador universal utilizou-se a sequência 5'-AATACGACTCACTATAG-3' (iniciador T7) e como iniciador reverso a sequência 5'-AACAGCTATGACCATG-3' (iniciador pUC/M13 reverso).

A 3 µg de plasmídio com o fragmento de inserção a sequenciar, num volume de 8 µL adicionou-se 2 µL de NaOH 2 M e incubou-se a 37°C durante 30 minutos para desnaturar o DNA. O DNA foi em seguida precipitado com 3 µL de acetato e sódio 3 M e 2,5 volumes de etanol absoluto. Após 15 minutos a -70°C, centrifugou-se a 12000 x g, 10 minutos, e o sedimento foi lavado com etanol a 70% e seco ao ar. No final o DNA foi ressuspenso em 7 µL de água a que se adicionou 2 µL de tampão de Sequenase e 1,5 µL de iniciador (1,2 ng/µL), colocando-se o tubo a 37°C durante 30 minutos.

A cada tubo contendo o DNA e o iniciador adicionou-se 1 µL de DTT 0,1 M, 2 µL de mistura de marcação diluida 5 x, 1 µL de (^{35}S)dATP (10 uCi/mL) 2 µL de Sequenase (13 U/mL) diluída 8 x em tampão de diluição. Misturou-se bem e incubou-se 2-5 minutos à temperatura ambiente.

Seguidamente preparam-se 4 tubos contendo cada um, 2,5 µL da mistura de terminação contendo um dos diferentes ddNTPs e colocaram-se a 37°C. A cada um dos quatro tubos adicionou-se 3,5 µL da mistura de marcação e incubou-se a 37°C durante 5 minutos, e no final deste tempo a reacção foi parada com a adição de 4 µL de mistura de paragem. As amostras foram desnaturadas a 90°C durante 3 minutos e imediatamente carregadas no gel de sequenciação.

Tampão de reacção da Sequenase, 5 x: Tris-HCl 200 mM pH 7,5, $MgCl_2$ 100 mM, NaCl 250 mM.

Mistura de marcação, 5 x: 7,5 µM de dGTP, dCTP e dTTP.

Misturas de terminação com ddNTP. Cada mistura contem 8 µM de um dos 4 ddNTPs e 80 µM de dGTP, dCTP, dATP e dTTP.

Tampão de diluição da enzima: Tris-HCl 10 mM pH 7,5, DTT 5 mM, BSA 0,5 mg/mL.

Solução de paragem: formamida 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0,005%, xileno cianol FF 0,05%.

Para o gel de sequenciação (0,4 mm) preparou-se uma solução, esterilizada por filtração, contendo 25,2 g de ureia, 7,2 mL de tampão 10X TBE (tampão 1 x TBE: Tris-borato 0.09 M, EDTA 0,002) 6 mL de de acrilamida "Long Ranger Gel Solution (AT Biochem), água destilada até 60 mL, 400 µL de APS (Persulfato de amónio) 10% e 40 µL de TEMED.

A electroforse decorreu a uma corrente constante de 60 Watts em tampão 0,6 x TBE. Utilizou-se a unidade "Sequencing Gel Electrophoresis System" modelo S2 da BRL.

Depois da corrida aderiu-se o gel a uma folha de de papel 3 MM, cobriu-se com película aderente, secou-se no vácuo em secador de geles ou em estufa a 80°C e expôs-se a filme de autorradiografia 1-5 dias à temperatura ambiente.

Rasteio da biblioteca com sonda radioactiva

Primeiro rastreio

Como sonda utilizou-se o fragmento de inserção do plasmídio pSK-D, obtido por restrição do plasmídio com *Eco*RI e isolado em gel de agarose de baixo ponto de fusão (NuSieve 4%). Esta agarose é adequada para separar fragmentos de baixo peso molecular (500 bp).

Rastrearam-se cerca 2 x 10^5 fagos, procedendo-se à infecção e plaqueamento de células LE392 conforme anteriormente descrito. Para o primeiro rastreio, o fago foi plaqueado a uma densidade de 30000-50000 fagos por placa. As placas foram colcadas a 4°C durante 30 minutos e seguidamente procedeu-se à transferência das placas fágicas para membrana de "nylon". De cada placa foram obtidas duas cópias em membranas de "nylon". Estas foram colocadas com a face das placas para cima sobre papel de filtro Whatman 3 MM saturado com tampão de desnaturação (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M) durante 5 minutos e seguidamente sobre papel de filtro saturado com tampão de neutralização (NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,5 M pH 8). Após breve lavagem em 3 x SSC, as membranas foram colocadas a 80°C durante 2 horas para fixação do DNA. A pré-hibridização foi feita durante 1 hora, a 42°C, numa solução contendo SDS 7%, EDTA 1 mM e $NaHPO_4$ 0,5 M, pH 7,2 (Church e Gilbert, 1984); a solução "stock" de $NaHPO_4$ 1 M pH 7,2 (1 M em Na^+) contem 134 g de $Na_2HPO_4.7H_2O$ e 4 mL de H_3PO_4, por litro (Church e Gilbert, 1984). A hibridização foi feita durante a noite, a 42°C, com sonda marcada com ^{32}P-dCTP, que depois de fervida, foi adicionada à mistura de pré-hibridização.

A sonda foi preparada como anteriormente descrito para "Southern blotting" dos produtos de PCR, excepto que a banda de agarose contendo o fragmento de DNA foi previamente liquefeita por aquecimento a 65°C durante 10 minutos e diluida em água numa concentração final de 2 ng/µL. Utilizaram-se 10 µL (20 ng) que se diluiram em água um volume final de 31 µL. Ferveu-se durante 3 minutos e procedeu-se como anteriormente descrito.

Após a hibridização, as membranas foram lavadas a 65°C com uma solução contendo Na_2HPO_4 0,4 mM, SDS 1% e EDTA 1 mM e posteriormente expostas a filme de autorradiografia (Agfa) a -70°C.

Segundo e terceiro rastreios

Após identificação das placas positivas, removeu-se uma porção de agar com uma área que as abrangesse, por meio de pipeta de Pasteur esterilizada. Os fagos foram eluidos, colocando a porção de agar contendo as placas fágicas em 0,5 mL de tampão de fago durante 2-4 horas à temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C e foram plaqueados de novo em densidades menores (200-1000 fagos por placa de Petri de 82 mm de diâmetro). Após transferência para membrana de nylon e hibridização com sonda radioactiva, o processo foi repetido até à obtenção de placas fágicas positivas isoladas.

O fago puro assim isolado foi eluído em tampão de fago como descrito e o eluato foi utilizado para propagação do fago em LE392 ou Y1090R- e posterior obtenção de lisado de fago.

Preparação de lisado de fago

Misturaram-se 200 µL de cultura de Y1090, preparada como anteriormente descrito, com o 50 µL de eluato de fago isolado no 3º rastreio e incubou-se a 37°C durante 20 minutos. Adicionou-se 3 mL de top-agarose, conforme anteriormente descrito e verteu-se numa placa de L-agar com ampicilina. Incubou-se a 37°C até se observar lise confluente. A eluição dos fagos foi feita por adição de 3 mL de tampão de fago a cada placa de Petri, durante 3-4 horas, à temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C, com agitação suave. Recolheu-se o lisado de fago, centrifugou-se a 4000 rpm, 5 minutos, para remoção dos resíduos de agarose, adicionou-se uma gota de clorofórmio e guardou-se a 4°C.

"Dot blotting" de lisado de fago

De cada lisado de fago retiraram-se 2 µL que se aqueceram a 95°C, colando-se depois em gelo. Adicionou-se igual volume de 20 x SSC, aplicaram-se 2 µL desta mistura numa membrana de "nylon" previamente humedecida em 10 x SSC e deixaram-se secar as amostras. A membrana foi colocada com face para cima em papel de filtro Whatman 3MM embebido em solução de desnaturação e durante 5 minutos em papel de filtro embebido em solução de neutralização durante 1 minuto. Secou-se a membrana ao ar e foi colocada em estufa a 80°C durante 2 horas para fixação do DNA. A pré-hibridização, hibridização e lavagens foram feitas como descrito para o rastreio de bibliotecas. A sonda radioactiva foi também a mesma utilizada no rastreio de bibliotecas.

Amplificação do fragmento de inserção por PCR

O fragamento de inserção dos fago isolados foram amplificados por PCR utilizando como iniciadores oligonucleótidos correspondentes a sequências do vector flanqueando o local de clonagem (Dorfman, 1993; Simon e Schorr, 1992).

Os iniciadores utilizados, específicos para sequências do fago lambda gt 11, e complementares de sequências da β-galactosidase do vector, foram os seguintes:

iniciador a 5' (na direcção de transcrição do gene *lac*Z),

5'-GGTGGCGACGACTCCTGGAGCC-3'

iniciador a 3',

5'- GACACCAGACCACTGGTAATG-3'

Na reacção de PCR utilizou-se o lisado de fago diluido 1/100 em tampão de fago e congelado e descongelado 3 vezes para desnaturar as proteínas do invólucro do fago.

As reacções foram preparadas num volume final de 100 µL, contendo 50 µL de lisado de fago, 10 µL de 10 x tampão de enzima (Tris-HCl 100 mM pH 8,3, KCl 500 mM, $MgCl_2$ 15 mM, gelatina 0,01%) dNTPs (dATP, dGTP, dCTP e dTTP, Boehringer Manheim) na concentração final de 200 µM cada, 0,1 µM de cada iniciador e 0,5 µL de enzima (5 U/µL) AmpliTaq DNA Polimerase (Perkin-Elmer, Cetus).

Para a reacção de PCR, adicionaram-se ao tubo todos os componentes da mistura, execepto a enzima. A mistura foi aquecida a 97°C durante 2 minutos para desnaturar o DNA e a enzima foi adicionada quando a temperatura atingiu os 60°C. As condições de reacção foram: desnaturação a 94°C durante 15 segundos, emparelhamento a 60°C durante 30 segundos, e polimerização a 72°C durante dois minutos. Ao fim de 34 ciclos acrescentou-se um passo final de extensão a 72°C durante 5 minutos.

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 0,9%.

Preparação de DNA de fago

A 50 mL de LB com 10 mM de $MgSO_4$, adicionou-se 125 µL de uma cultura de *E coli* LE392 crescida durante a noite e 125 µL de lisado de fago. Incubou-se 10-12 horas a 37°C, com agitação até se verificara lise. Para a lise ser total adicionou-se 1 mL de clorofórmio e incubou-se a 37°C, 30 minutos, com agitação.

Centrifugou-se a 5000 rpm durante 5 minutos e ao sobrenadante adicionou-se RNase A e DNase I para concentração final de 30 µg/mL cada e incubou-se 1 h a 37°C. O fago foi precipitado durante a noite a 4°C após a adição de PEG 8000 para concentração final de 7% e NaCl para 6%.

Centrifugou-se a 5000 rpm durante 5 minutos, e ressuspendeu-se o sedimento em 2,5 mL de tampão de fago. Adicionou-se um volume de clorofórmio, misturou-se e centrifugou-se 10 minutos a 5000 rpm. Removeu-se a fase aquosa à qual se adicionou SDS e EDTA para concentrações finais de 0,1% e 20 mM, respectivamente. Adicionou-se 1 volume de fenol/clorofórmio 1:1 e removeu-se a fase aquosa após centrifugação. O processo foi repetido uma vez com fenol/clorofórmio e com clorofórmio. O DNA foi precipitado com 1/10 de volume e acetato de sódio 3 M e 2 volumes de etanol, a -70°C durante 1 hora. Após centrifugação

durante 5 minutos a 5000 rpm, lavou-se o sedimento com alcool a 70% e ressuspendeu-se em água.

Excisão do fragmento de inserção do fago lambda gt 11 *Sfi-Not*

Restrição com as enzimas EcoRI e NotI

Efectou-se a dupla digestão do fago contendo o cDNA com as enzimas *Eco*RI e *Not*I (BRL) em tampão de restrição "React 3" (BRL) durante uma hora a 37°C. Na reacção utilizou-se 1 µg de DNA de fago, 1 µL de cada enzima (10 U), 2 µL de 10 x tampão de restrição e água para um volume final de 20 µL. Os produtos da reacção foram submetidos a electroforese em gel NuSieve 2% em TAE e a banda correspondente ao fragmento de inserção foi excisada do gel para posterior subclonagem em plasmídio pBluecript SK II (Stratagene).

Restrição com as enzimas SfiI e NotI

Para a restrição com as enzimas *Sfi*I e *Not*I teve de se proceder a duas digestões consecutivas. Na primeira reacção utilizou-se 1 µg de DNA, 2 µL de 10 x tampão B (Promega), 2 µL de BSA 1 mg/mL, 1 µL de *Sfi*I (10 U) (Promega) e água para um volume final de 20 µL. O tubo com a mistura de reacção foi colocado a 50°C durante 1 hora. No final deste tempo, ajustou-se a concentração de NaCl na mistura de reacção para 150 mM e procedeu-se à restrição com *Not*I, a 37°C durante 1 hora. Para esta reacção adicionou-se ao tubo da primeira reacção 0,7 µL de NaCl 4M, 0,5 µL de 10 x tampão B (Promega), 0,5 µL de BSA 1 mg/mL, 1 µL de *Not*I (10 U) e água para um volume final de 25 µL.

Os produtos de reacção foram submetidos a electroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão SeaPlaque 0,9% em TAE e a banda correspondente ao fragmento de inserção foi excisada do gel para posterior subclonagem em plasmídio pGEM11f(+) (Promega).

Subclonagem do cDNA isolado do fago em plasmídio pBluecript SK II

A banda de agarose extraída do gel e contendo o fragmento de inserção cortado com *Eco*RI e *Not*I foi aquecida a 65°C durante 10 minutos e depois mantida a 37°C. Preparou-se a reacção de ligação com 100 ng de fragmento de inserção 1 µg de pSK cortado com as mesmas enzimas, 5 µL de 10 x tampão de ligase, 1 µL (2,5 U) de T4 DNA ligase e água para um volume final de 50 µL. Fez-se a incubação a 16°C durante a noite.

A preparação e transformação de células competentes DH5α foi feita como descrito anteriormente para clonagem dos produtos de PCR.

Colónias contendo plasmídio recombinante (brancas) foram isoladas e colocadas a crescer em 5 mL de meio LB com ampicilina, durante a noite a 37°C. Procedeu-se à purificação de DNA de plasmídio e verificou-se por digestão enzimática, seguida de electroforese, a presença de fragmento de inserção de tamanho esperado.

Subclonagem do cDNA isolado do fago em plasmídio pGEM11f(+)

cDNA, cortado com *Sfi*I *e Not*I e isolado em gel de agarose, foi ligado ao plasmídio pGEM11f(+) (Apêndice 1.3) digerido com as mesmas enzimas nas condições descritas para a restrição do fago. A reacção de ligação foi feita nas condições descritas anteriormente para ligação do cDNA ao pBluesript II SK.

Para transformação com plasmídio pGEM11f(+) utilizaram-se células competentes JM109. Para seleccionar a presença do episssoma F', necessário para a produção de cor, fez-se um riscado de *E. coli* JM109 (Promega) numa placa de meio M9 suplementado com Tiamina-HCl (Apêndice 1.1) e incubou-se durante a noite a 37°C. No dia seguinte, inocularam-se 25 mL de meio LB com uma colónia individualizada e incubou-se a 30°C durante a noite com agitação. Utilizaram-se 5 mL desta cultura para iniciar uma cultura de 500 mL de LB incubada a 30°C até a $DO_{600\ nm}$ da cultura atingir valores compreendidos entre 0,45 a 0,55. A cultura foi arrefecida em gelo durante 2 horas e repartida por alíquotas para ser centrifugada a 2500 x g durante 15 a 20 minutos. As células foram inicialmente ressuspensas em 10 a 20 mL de tampão de trituração, previamente arrefecido ($CaCl_2$ 100 mM, $MgCl_2$ 70 mM e acetato de sódio 40 mM, pH=5,5), preparado antes do uso e esterilizado por filtração, e depois diluídas em 500 mL da mesma solução. Depois de 45 minutos de incubação em gelo, procedeu-se a uma centrifugação a 1800 x g durante 10 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspenso em 50 mL de tampão de trituração pré-arrefecido.

Para a transformação de células competentes JM109 procedeu-se como descrito para a estirpe DH5α.

As células transformadas foram plaqueadas em meio L-agar com ampicilina, IPTG e X-Gal, para selecção visual das colónias recombinantes. Procedeu-se à extracção de DNA plasmídico das colónias recombinantes e submeteu-se a restrição com as enzimas *Sfi*I *e Not*I. O produto da reacção de restrição foi analisado por electroforese em gel de agarose para verificar a existência de fragmento de inserção.

Sequenciação

A sequenciação, do cDNA inserido nos plasmídios foi essencialmente efectuada pelo método de Sanger (1981) com o sistema "Sequenase 2.0" da USB, conforme descrito em "Certificação do produto de PCR e do cDNA clonado". Para além do iniciador "universal" e do iniciador "reverso", anteriormente descritos, foram utilizados iniciadores internos cuja sequência foi deduzida a partir de sequências comhecidas do cDNA

Pontualmente, procedeu-se à reacção de sequenciação em termociclador pelo sistema "PRISM Ready reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing kit" (Perkin Elmer Cetus), que utiliza ddNTPs marcados com diferentes fluorocromos. Cada reacção foi efectuada num só tubo que continha 30-180 µg de DNA amplificado por PCR e extraído do gel de agarose pelo sistema "QIAquick Gel Extracxction KIt" (QIAGEN), 3,2 pmoles de iniciador (um dos inciadores utilizados na amplificação por PCR) e água para um volume final de 20 µL. A

mistura foi submetida a 25 ciclos de 96°C durante 30 segundos, 50°C durante 15 segundos e 60°C durante 4 segundos. No final da reacção, os produtos de PCR foram purificados por adição de 35 µL de etanol a 95% e incubação em gelo durante 10 minutos. Centrifugou-se à velocidae máxima durante 15-30 minutos e secou-se o sedimento. A leitura automática foi feita pelo "ABI 173 DNA Automated Sequencer System" (Perkin Elmar Cetus).

Extracção de DNA genómico

O método utilizado baseia-se na utilização de CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamónio) (Doyle e Doyle, 1991). Porções de folha (0,5-1 g) foram homogeneizadas em azoto líquido, em almofariz. O pó resultante foi imediatamente transferido para para meio de isolamento (CTAB 2% (p/v), NaCl 1,4 M, 2-mercaptoetanol 0,2% (v/v), EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM pH 8.0) pré-aquecido a 60°C em tubo de vidro de centrífuga e incubado durante 30 minutos. Procedeu-se à extracção com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1, v:v) e centrifugou-se em rotor basculante a 1600 x g à temperatura ambiente. A fase aquosa foi removida com uma pipeta de abertura larga e transferida para um tubo de vidro a que se adicinou 2-3 volumes de isopropanol frio. O DNA foi recuperado directamente com um gancho de vidro ou precipitado por centrifugação a 500 x g durante 1-2 minutos e ressuspenso em tampão de lavagem (etanol 76%, acetato de amónio 10 mM). Seguidamente foi de novo precipitado por centrifugação a 1600 x g durante 10 minutos e ressuspenso em TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,4, EDTA 1mM).

"Southern blotting" de DNA genómico

Digeriram-se 10 µg de DNA genómico com várias enzimas de restrição durante a noite a 37°C. Os produtos de digestão foram misturados com tampão de amostra (azul de boromofenol 0,25%, glicerol 50% em TAE) aplicados num gel de agarose 0,8% (p/v) (15 x 15 cm) em 1 x tampão TAE com brometo de etídeo na concentração de 1 µg/mL.

A corrida fez-se durante a noite a 30 Volts em tampão 1 x TAE. Foi utilizado o equipamento da "Hoefer Scientific Instruments" (USA) a unidade "Max Submarine, Agarose Gel Unit, Model HE 99". No final da corrida fotografou-se o gel e procedeu-se à depurinação numa solução de HCl 0,25 M durante 15 minutos e lavou-se com água destilada. A desnaturação foi feita numa solução de desnaturação (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M) durante 30 minutos. Depois de uma lavagem breve em água destilada, procedeu-se à neutralização, imergindo o gel 2 vezes numa solução de neutralização (Tris-HCl 1 M pH 7,4, NaCl 1,5 M) durante 15 minutos. Lavou-se em água destilada e procedeu-se à transferência por capilaridade, durante a noite, para uma membrana de "nylon" "Hybond-N^{+}" (Amersham) em tampão 20 x SSC.

Após a transferência, a membrana foi lavada brevemente em 2 x SSC e o DNA fixado à membrana colocando-a sobre papel de filtro embebido em NaOH 0,4 M durante 30 minutos. A membrana foi lavada em 5 x SSC e submetida a pré-hibridização e hibridização e aos mesmos tratamentos como descrito anteriormente nos rastreios das bibliotecas.

As sondas utilizadas foram i) a mesma sonda utilizada no rastreio da biblioteca ii) o fragmento de inserção do fago positivo isolado no terceiro rastreio (λ.14.A.1.2) e amplificado por PCR. Ambas as sonda foram marcadas radioactivamente em agarose, conforme anteriormente descrito.

"Northern blotting"

A RNA total (10 µg) de folha e tubérculo foi adicionado 8,5 µL de formaldeído, 25 µL de formamida 5 µL de tampão 10 X MOPS/EDTA (MOPS (3-N-ácido morfolinopropanosulfónico) 0,2 M, acetato de sódio 50 mM e EDTA 10 mM, pH 7,0.) e 2 µL de brometo de etídeo 10 mg/mL, num volume final de 50 µL.

As amostras foram aquecidas a 65°C durante 15 minutos e submetidas a electroforese em gel desnaturante de agarose (agarose 1,4%, Tampão 10 x MOPS/EDTA 10%, formaldeido 3%, em água) durante uma hora em tampão 1 X MOPS/EDTA. Após a electroforese o gel foi lavado 3 vezes em água e 1 vez em 6 x SSC.

A transferência para membrana de nylon (Hybond N^+, Amersham) processou-se por capilaridade, durante a noite, em 6 x SSC. A membrana foi posteriormente lavada com 2 x SSC e imersa 30 minutos em NaOH 0,4 M para fixação do RNA.

Procedeu-se à pré-hibridização e à hibridização conforme descrito anteriormente para o rastreio de bibliotecas.

Hibridização *in situ* para microscopia electrónica

A hibridização foi feita em secções de folha incluida em Unicryl conforme descrito para imunocitoquímica, montadas em grelhas de níquel.

A sonda (cerca de 400 bp) foi obtida por amplificação de um fragmento de cDNA de GS, a partir dos fago positivo λ14.A.1.2 com os iniciadores GSF1 e GSR1, anteriormente descritos. O fragmento amplificado foi isolado do gel (NuSieve 4%), extraído da agarose por extracção fenólica e biotinilado por "nick-translation". A biotinalação da sonda, por incorporação de biotina-14-dATP foi feita pelo sistema "BioNick Labeling System" (Life Technologies).

As grelhas foram postas a flutuar em gotas de tampão de hibridização (formamida 50%, NaCl 0,3 M e citrato de sódio 0,03 M (SSC)) (Hawes, 1988). Seguidamente, as grelhas foram colocadas sobre gotas contendo a sonda dissolvida em tampão de hibridização, previamente aquecida a 78°C durante 3,5 minutos. As grelhas foram deixadas a hibridizar, em câmara húmida, durante a noite, à temperatura ambiente e seguidamente foram lavadas 2 vezes em 2 x SSC, durante 5 minutos.

A marcação foi feita com estreptavidina conjugada com ouro coloidal de 10 nm (BioCell). As grelhas foram previamente incubadas em PBS com BSA 1% durante 30 minutos para bloquear os locais de ligação inespecífica. Seguidamente foram incubadas com estreptavidina conjugada com ouro coloidal, diluída 1:20 em PBS com BSA 1%, durante 1 hora, à temperatura ambiente. Foram depois lavadas em PBS com 1% de BSA e 0,1% Tween-20 3 x 5 minutos e depois em

PBS. Colocaram-se seguidamente em glutaraldeído 1% em PBS durante 5 minutos, lavaram-se em PBS e 3 vezes em água destilada. Seguidamente foram contrastadas com acetato de uranilo e citrato de chumbo, conforme descrito para imunocitoquímica ultraestrutural.

"Northern Tissue Printing"

Obtiveram-se impressões de tecidos de tubérculo em nitrocelulose, conforme descrito para detecção imunológica de GS em impressões de tecidos ("Tissue printing").

As membranas com as impressões de tecido foram aquecidas a 80°C durante 2 horas para fixação do RNA. Antes da hibridização procedeu-se à lavagem da membrana durante 4 horas a 65°C com 0,2 x SSC e SDS 1% (Guilfoyle et al, 1993). Colocou-se a membrana num saco de plástico, ferveu-se a sonda que se verteu no saco. A sonda biotinilada foi a mesma que se utilizou para hibridização *in situ*, diluída para 1 µg/mL ou 0,5 µg/mL em tampão de hibridização (SDS 5%, EDTA 1 mM e Na_2HPO_4 0,5 M, pH 7,2) (Church e Gilbert, 1984).

Após incubação durante a noite a 37°C, as membranas foram lavadas com 2 x SSC, SDS 0,1%, à temperatura ambiente durante 10 minutos e seguidamente foram colocadas em tampão PBS com Tween 0,05%, durante 5 minutos. Seguidamente, procedeu-se à incubação durante 1 hora, à temperatura ambiente, com estreptavidina conjugada com peroxidase (Gibco-BRL) diluida 1:250 em PBS com Tween 0,05%. Seguidamente, as membranas foram lavadas 1 x em PBS com Tween 0,05%, durante 15 minutos e 1 x em PBS durante 15 minutos. Para detecção, utilizou-se 4-cloro-1-naftol 0,5 mg/mL em PBS, conforme descrito anteriormente para detecção imunológica de proteínas em membranas de nitrocelulose.

RESULTADOS

CARACTERIZAÇÃO E LOCALIZAÇÃO DA GS EM *S. TUBEROSUM*

Polipeptídeos da GS

Para análise dos polipeptídeos que constituem as isoformas da GS presentes em vários órgãos de planta e em tecido caloso, as proteínas presentes em extractos totais de proteínas solúveis foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para filtros de nitrocelulose.

Trabalhos anteriores tinham demonstrado que anticorpos anti GSn1 de feijoeiro utilizados neste estudo reconheciam a forma citosólica e cloroplastidial de feijoeiro e reagiam ainda com GS de outras plantas (Cullimore e Miflin, 1984). Dadas as homologias verificadas entre as sequências de amino ácidos das várias isoenzimas de várias plantas (Forde e Cullimore, 1989) era de esperar que os anticorpos utilizados reconhecessem todas as formas da GS presentes nos vários órgãos da batateira.

De acordo com estudos anteriores, as Solanaceas pertenceriam ao grupo de plantas onde, nas folhas verdes, somente a GS2 existiria (McNally et al, 1983).

Os resultados obtidos neste estudo revelaram que quer em folhas, quer em tecido caloso, os anticorpos anti-GS utilizados reconheciam duas classes de polipeptídeos de GS (Fig. 11) um polipeptídeo de aproximadamente 45 kDa e outro menor de aproximadamente 42 kDa. O polipeptídeo de 45 kDa era predominante nas folhas enquanto que este padrão se invertia em tecido caloso, sendo o polipeptídeo de 42 kDa o mais abundante. Por comparação com a literatura da especialidade, o polipeptídeo maior foi considerado uma subunidade cloroplastidial de GS e o menor uma subunidade citosólica de GS.

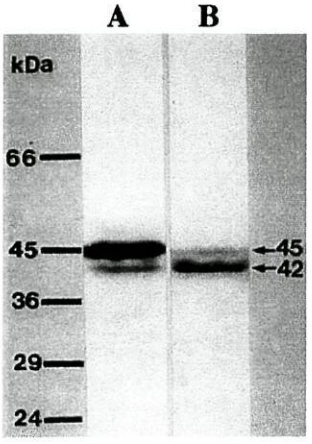


Fig. 11. Polipeptídeos da GS em folhas (A) e tecido caloso (B) de *S. tuberosum*. Proteínas solúveis (20 μg) foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para nitrocelulose. Os polipeptídeos da GS, respectivamente de 45 e 42 kDa, foram detectados com anticorpos anti-GS de feijoeiro. Os pesos moleculares dos marcadores encontram-se indicados à esquerda e à direita o peso molecular dos polipeptídeos da GS.

A análise de extractos de cloroplastos isolados (Fig. 12) demonstrou a existência de uma só banda de aproximadamente 45 kDa, o que permitiu confirmar que o polipeptídeo de maior peso molecular presente em folhas e tecido caloso correspondia a uma subunidade de GS cloroplastidial.

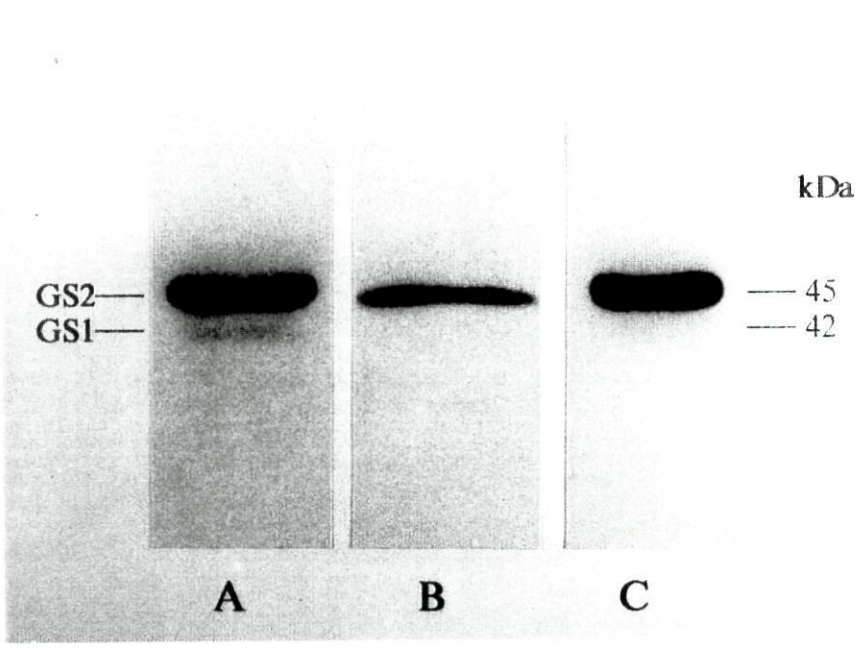


Fig. 12. Análise dos polipeptídeos da GS em folha de *S. tuberosum*. Extractos totais de proteínas solúveis de folha (A) e de cloroplastos isolados (B) e presentes na fracção correspondente ao pico com maior actividade de GS2 eluída da coluna de troca iónica (C) foram separadas por SDS-PAGE e electrotransferidas para nitrocelulose. Os polipeptídeos da GS foram detectados na nitrocelulose com anticorpos anti-GS.

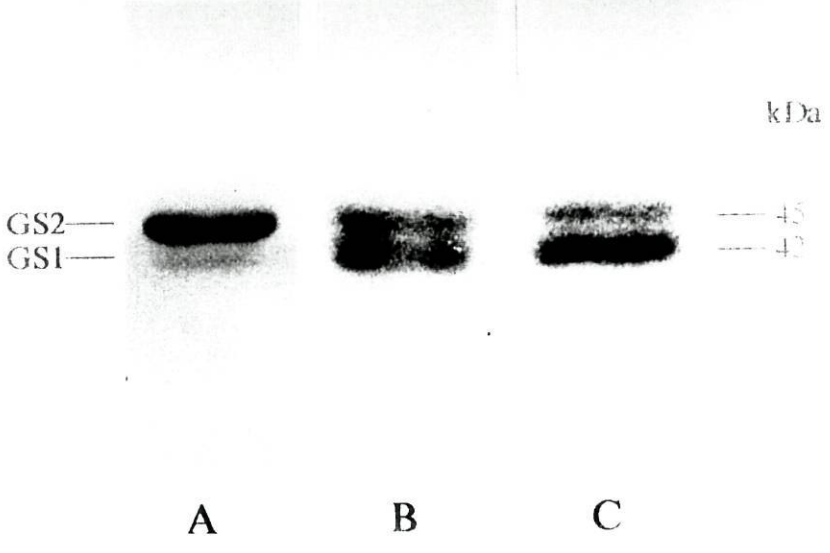


Fig. 13. Quantidade relativa de polipeptídeos de GS em extractos de folha (A), nervura central (B) e pecíolo (C) de *S. tuberosum*. O procedimento foi idêntico ao descrito na Fig. 12.

Os polipeptídeos da GS foram, ainda, analisados em extractos das nervuras centrais excisadas e de pecíolos das folhas (Fig. 13). Os padrões observados, por imunodetecção na nitrocelulose, dos polipeptídeos transferidos, revelaram uma predominância da subunidade citosólica (42 kDa) em ambos os casos.

Assim, em folhas de batateira existem pelo menos duas formas da GS, a cloroplastidial e a citoplasmática, sendo a forma cloroplastidial, com maior massa molecular, a mais abundante nas folhas. Contudo, a forma citoplasmática, de menor massa molecular, predominava em tecidos específicos das folhas como nervuras e pecíolos. Esta forma era, também, predominante em tecido caloso.

Separação das isoenzimas da GS por cromatografia de troca iónica

As isoenzimas citosólicas e cloroplastidiais podem ser identificadas quer pela determinação dos tamanhos das respectivas subunidades por SDS-PAGE ou focagem isoeléctrica seguida de análise por "Western blot", ou ainda separando as actividades de ambas as isoenzimas por cromatografia de troca iónica (Hirel et al, 1992). As izoenzimas cloroplastidiais e citosólicas são, geralmente, eluídas a diferentes forças iónicas, que podem variar com a planta e o órgão em estudo (McNally e Hirel, 1983).

Em face dos resultados anteriores e atendendo a que na literatura as Solanaceae estudadas não apresentavam GS citosólica nas folhas (McNally et al, 1983), procedeu-se à separação das actividades correspondentes às isoenzimas GS1 e GS2 de folha de batateira por meio de cromatografia de troca aniónica. Com um gradiente linear de concentração de NaCl entre 0 e 400 mM foram obtidas duas áreas de actividade da GS: um primeiro pico de actividade foi eluído aproximadamente a 100 mM de NaCl e um segundo eluído aproximadamente a 200 mM (Fig. 14). Por comparação com perfis de eluição descritos na literatura, o primeiro pico foi considerado a GS citosólica (GS1) e o segundo cloroplastidial (GS2). Nestas circunstâncias, a GS2 apresentava 86,4% da actividade total e a GS1 13,6%.

Em repetidos ensaios obteve-se sempre o pico correspondente à GS1, embora na maior parte das vezes fosse muito atenuado.

A análise por SDS-PAGE da fracção com maior actividade revelou que esta continha apenas um polipeptídeo de 45 kDa que comigrava com o polipeptídeo detectado em extractos de cloroplastos isolados, pelo que se confirmou que o maior pico de actividade correspondia à GS cloroplastidial (Fig. 12-C).

Estes resultados (SDS-PAGE e cromatografia de troca iónica) permitiram confirmar a existência das isoformas cloroplastidial e citosólica em tecidos de folha de batateira, não só pela detecção dos respectivos polipeptídeos, mas pela demonstração da actividade das duas isoformas. Contudo, a análise de extractos de nervura sugeria que as duas isoformas apresentavam uma localização diferencial, em diferentes tecidos na folha.

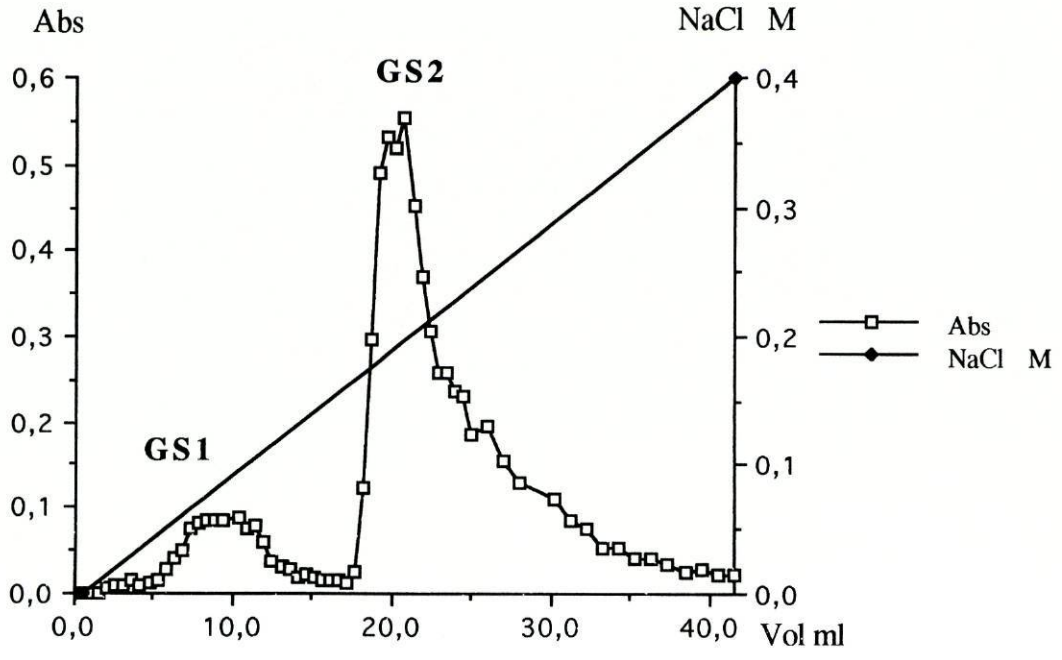


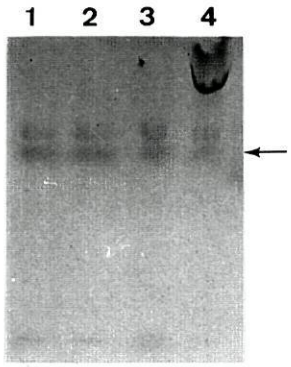
Fig. 14. Perfil de eluição de actividade da GS de extractos totais de folha de batateira após cromatografia de troca iónica em resina DE-52 (Whatmann). Um gradiente linear de 0 a 0,4 M de NaCl foi utilizado para eluição das proteínas.

Detecção da GS nativa em gel não desnaturante

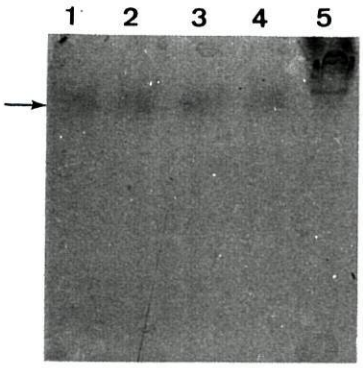
Foram efectuadas várias electroforeses em condições não desnaturantes, sendo a GS detectada pela actividade no gel. Apesar de serem testadas diferentes malhas, com concentrações de acrilamida/bisacrilamida de 4,5, 5, 7,5 e 10%, de uma maneira geral era aparente uma só banda de actividade, um pouco difusa, não se verificando diferenças entre os resultados obtidos com extractos de folha, de cloroplastos, e ainda com o sobrenadante resultante do processo de isolamento de cloroplastos. A presença do inibidor de proteases PMFS também não parecia ter influência nos resultados (Fig. 15-A e B; Fig. 16-A). Dificuldades na separação das actividades da GS1 e da GS2 por electroforese das formas nativas tinham já sido descritas por outros autores (Kawakami e Watanabe, 1988).

A massa molecular da banda, é compatível com uma forma octamérica descrita para a proteína nativa (Stewart et al, 1980), não se detectando bandas de actividade correspondentes a formas tetraméricas como descrito por alguns autores (Mack e Tischner, 1990).

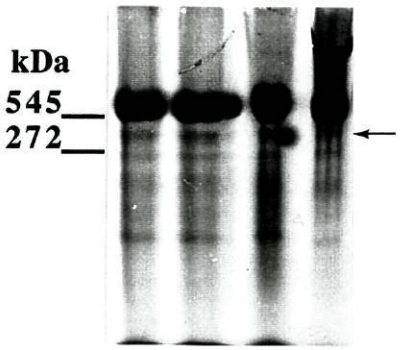
Após a detecção da actividade da GS no gel nativo, este foi incubado com azul de Coomassie para visualização do padrão de proteínas totais (Fig. 15-C e D; Fig. 6-B e C). Para melhor certificação da zona do gel correspondente à actividade era por vezes inserido no gel um arame ao lado da banda da actividade. A posição do arame no gel, após coloração com azul de Coomassie é facilmente identificável na Fig. 15-C.



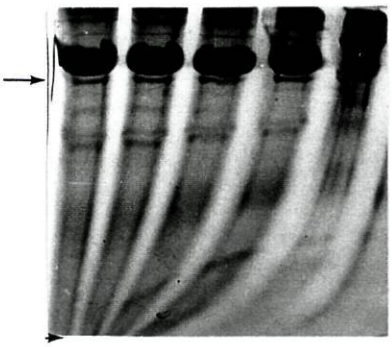
A Actividade (gel de 5% de acrilamida)



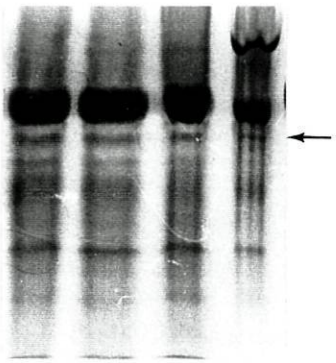
B Actividade (gel de 7,5% de acrilamida)



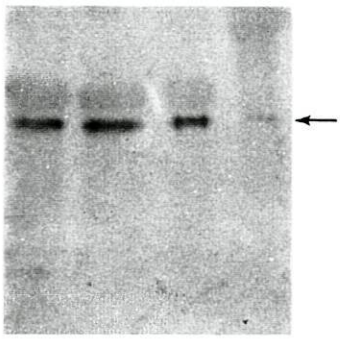
C Proteínas no gel (A) após actividade



D Proteínas no gel (B) após actividade



E Duplicado do gel (A) antes da transferência para nitrocelulose



F Detecção de GS na nitrocelulose após transferência do gel E

Fig. 15. Detecção de actividade da GS em gel não desnaturante de acrilamida a 5% (A) e 7,5% (B). A posição das banda correspondentes à actividade está assinalada com uma seta, notando-se uma mancha de pigmentação acima da banda de actividade no gel de 5% (A). Os mesmos geles onde foi detectada a actividade da GS foram posteriormente corados com azul de Coomassie para identificação das proteínas correspondentes à zona de actividade (C e D). Para facilitar a localização, foi colocado um arame no gel junto da banda de actividade no gel A (pista 3). A posição do arame está visível como uma mancha circular em C, pista 3.

A posição das bandas coradas com azul de Coomassie, correspondentes à zona onde foi detectada a actividade, encontra-se assinalada com uma seta. Acima destas bandas encontra-se uma banda muito forte, possivelmente correspondente à RuBisCO, com 550 kDa. Como marcadores de pesos moleculares em gel não desnaturante utilizou-se a urease, forma hexamérica (545 kDa) e forma trimérica (272 kDa).

Um duplicado do gel de 5% (E) foi corado com Coomassie-G antes da transferência das proteínas para nitrocelulose (F) onde foi detectada a GS, após a transferência, com anti-corpos anti-GS.

Nos geles de 5%: 1, extracto de folha com PMFS; 2, extracto de folha com PMFS; 3, sobrenadante, após isolamento de cloroplastos; 4, extracto de cloroplastos isolados.

No gel de 7,5%: 1, extracto de folha com PMFS; 2, extracto de folha com PMFS; 3, extracto de folha sem PMFS; 4, sobrenadante, após isolamento de cloroplastos; 5, extracto de cloroplastos isolados.

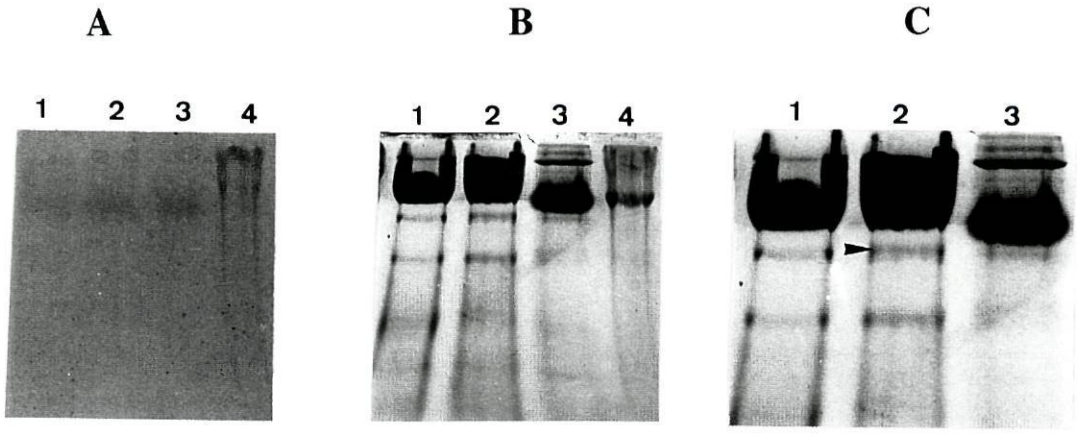


Fig. 16. Detecção da actividade de GS (A) em vários extractos de folha (1, 2 e 3) e cloroplastos (4) em gel não desnaturante de acrilamida a 7,5%; o mesmo gel (B e C) após coloração com azul de Coomassie. Notar que na pista 2 (C) são aparentes duas bandas (seta), coradas com azul de Coomassie, na zona correspondente à actividade.

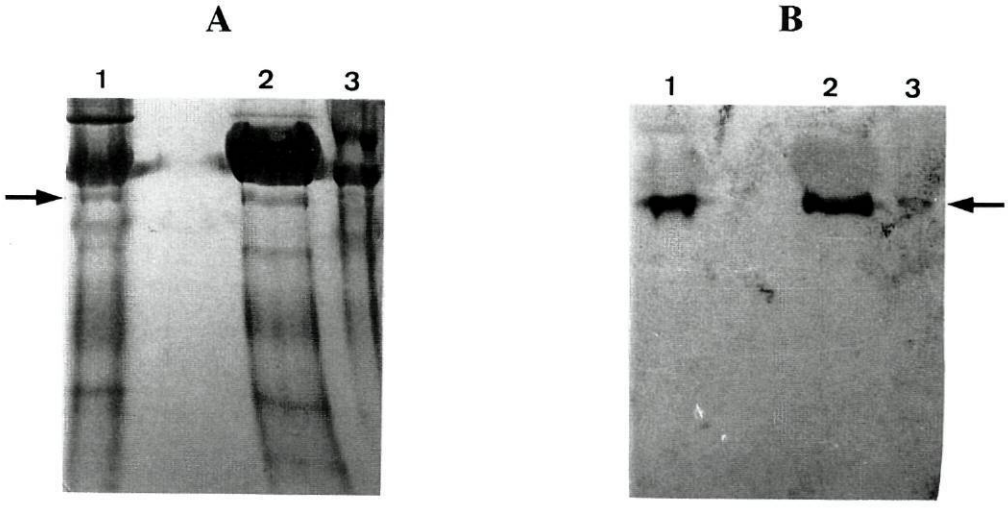


Fig. 17. Correspondência entre as bandas detectadas na nitrocelulose com anticorpos anti-GS (B) e as proteínas em gel não desnaturante de acrilamida corado, antes da transferência, com Coomassie-G (A). A posição das bandas encontra-se assinalada com uma seta. 1 e 2, extractos de folha; 3, extracto de cloroplastos isolados. De notar a posição da banda correspondente à GS cloropastidial, mais fina, e situada numa zona correspondente ao limite superior da banda detectada em extractos de folha.

Verificou-se, em geral, que uma banda corada com azul de Coomassie, correspondia à banda de actividade da GS (Fig. 15-C e D) logo abaixo de uma banda muito forte, possivelmente a RuBisCO, de 550 kDa. Contudo, por vezes, a coloração de Coomassie revelava duas bandas no local correspondente à actividade enzimática (Fig. 16-B e C).

Foi efectuada a transferência das proteínas do gel não desnaturante para membrana de nitrocelulose a fim de testar se os anticorpos anti-GS reconheciam a proteína nativa e, adicionalmente, identificar positivamente a banda de actividade como sendo a GS.

Um duplicado do gel onde foi detectada a actividade foi tratado com SDS, corado com Coomassie-G e transferido para membrana de nitrocelulose (Fig. 15-E e F; Fig. 17).

A técnica utilizada de corar o gel antes da transferência, permite uma identificação positiva da banda proteica imunoreactiva (Hoefer, 1988/89). Nas Figs. 15-E e 17-B pode observar-se que são perfeitamente identificáveis as bandas correspondentes à GS, as quais apresentam uma sobreposição perfeita com as bandas reconhecidas pelos anticorpos anti-GS, na nitrocelulose. Este resultado permite o isolamento e purificação da proteína nativa a partir do gel para posterior produção de anticorpos.

Na Fig. 15-F pode observar-se que os anticorpos reagiram com uma proteína com migração idêntica à apresentada pela banda de actividade, não reagindo com outras proteínas. Embora a resolução das bandas detectadas pelos anticorpos seja superior à resolução apresentada pelas bandas de actividade, não foi possível, de uma maneira geral, resolver mais do que uma banda. Contudo, em alguns casos, há aspectos que sugerem a existência de bandas duplas. Na Fig. 17-A pode ver-se que nos extractos de cloroplastos, os anticorpos reconheciam uma banda única, com migração próxima do limite superior da banda, possivelmente dupla, detectada nos extractos de folha.

Com estes resultados confirmou-se que os anticorpos reconheciam a proteína nativa o que é de interesse em estudos de imunocitoquímica, e também que só reconheciam a banda correspondente à proteína que apresentava actividade GS, o que é importante para caracterizar os anticorpos quanto à sua especificidade.

Focagem isoeléctrica

Com o objectivo de analisar o número de subunidades diferentes da GS presentes na folha, extractos de proteínas solúveis de folha e de cloroplastos, foram tratados com ureia e submetidos a focagem isoeléctrica em gel de poliacrilamida horizontal (pH 3-10). Os polipeptídeos separados foram posteriormente transferidos para membrana de nitrocelulose que foi incubada com anticorpos anti GS. Na membrana resultante de transferência de gel horizontal, podem ser observadas (Fig. 18) nos corredores correspondente a extractos de folha, 5 bandas correspondendo a polipeptídeos, com pontos isoeléctricos diferentes, numa região próxima do pH 6, aparecendo um a banda bastante intensa de pI aproximado 5,9, possivelmente correspondente à subunidade cloroplastidial. Em vários ensaios neste tipo de gel, não foi possível focar os polipeptídeos correspondentes aos extractos de cloroplastos isolados.

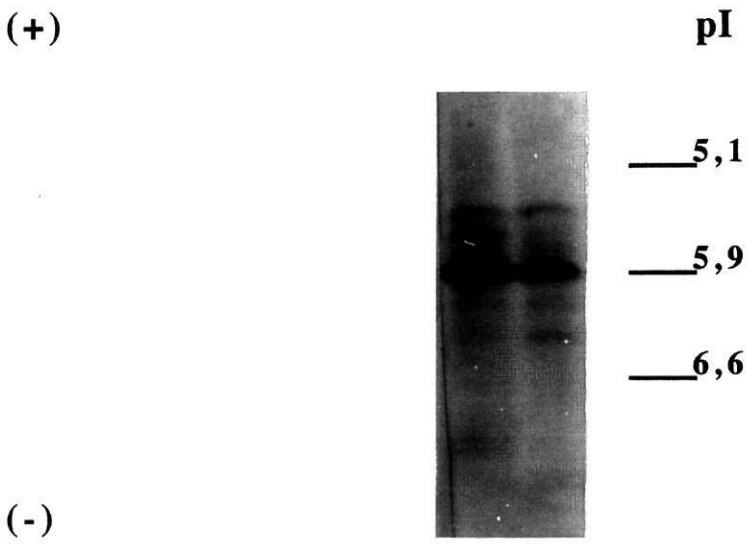


Fig. 18. Imunodetecção de polipeptídeos da GS de extractos foliares em membrana de nitrocelulose após focagem isoeléctrica em gel horizontal de poliacrilamida (pH 3-10) e transferência por capilaridade. À direita estão indicados os pontos isoelétricos de marcadores.

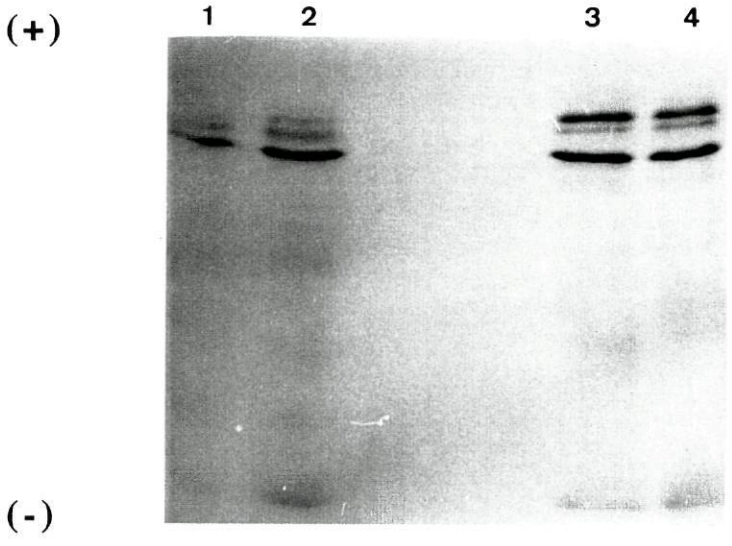


Fig. 19. Imunodetecção de polipeptídeos da GS de extractos de cloroplastos isolados (1 e 2) e de extractos de folha (3 e 4) em membrana de nitrocelulose após focagem isoeléctrica em gel vertical de poliacrilamida (pH 3-10) e electrotransferência para a membrana.

Uma vez que o gel horizontal não continha ureia, procedeu-se à preparação de gel vertical, contendo 8 M de ureia e anfólitos de largo espectro (pH 3-10), para garantir a separação das subunidades da GS: os polipeptídeos de extractos de folha e de cloroplastos foram separados de acordo com o seu ponto isoeléctrico e transferidos para membrana de nitrocelulose. Após incubação com anticorpos anti-GS, verificou-se que o padrão de bandas obtido para extractos de folha era semelhante ao padrão obtido com focagem isoeléctrica em gel horizontal, embora se observe um menor número de bandas. Em extractos de cloroplastos isolados, podem identificar-se quatro bandas sendo uma de alta intensidade e as outras menos intensas (Fig. 19). Em extractos de proteínas solúveis totais de folha são visíveis 3 bandas tendo uma delas, de maior intensidade, o mesmo ponto isoeléctrico da banda cloroplastidial mais intensa, podendo as outras variantes de carga corresponder a subunidades citosólicas.

Localização da GS por impressão de tecidos em nitrocelulose ("tissue printing") e por imunocitoquímica

Foi efectuada uma abordagem imunohistoquímica para localizar a GS em vários órgãos de batateira e assim avaliar a especificidade celular da sua localização, bem como as implicações fisiológicas que daí decorrem.

Pelos resultados anteriores foi possível concluir que os anticorpos utilizados neste trabalho (anticorpos anti-GS citosólica de feijoeiro) reagiam com os polipeptídeos correspondentes às subunidades citosólicas e cloroplastidiais da GS de batateira e também com a proteína nativa, pelo que os mesmos anticorpos foram utilizados na detecção da GS *in situ* em impressões de tecidos em nitrocelulose e em cortes de tecidos fixados e impregnados em resina.

Localização da GS por "tissue printing"

A especificidade celular apresentada pelas isoenzimas da GS, bem como as suas implicações fisiológicas, só pode ser realmente avaliada por técnicas de detecção *in situ*. Uma dessas técnicas consiste na detecção imunológica de proteínas em impressões de tecido feitas em nitrocelulose (Cassab e Varner, 1987). Aí, o antigénio está acessível aos anticorpos, na sua forma nativa e localização original.

Folhas, pecíolos e caules aéreos foram cortados transversalmente e as secções foram pressionadas contra uma membrana de nitrocelulose, que foi posteriormente incubada com os anticorpos anti-GS. A detecção efectuou-se pela actividade da peroxidase conjugada com anticorpos secundários. Após revelação verificou-se, além de alguma marcação dispersa pela lâmina foliar, uma marcação muito intensa e localizada na zona correspondente ao floema adaxial da nervura central da folha (Fig. 20-B) e do pecíolo (Fig. 20-C), tal como se pode confirmar por comparação com a anatomia da folha em imagem de corte transversal obtida no microscópio óptico (Fig. 20-A). No controlo, em que foi omitida a incubação com anticorpos primários, não se observa marcação (Fig. 20-D).

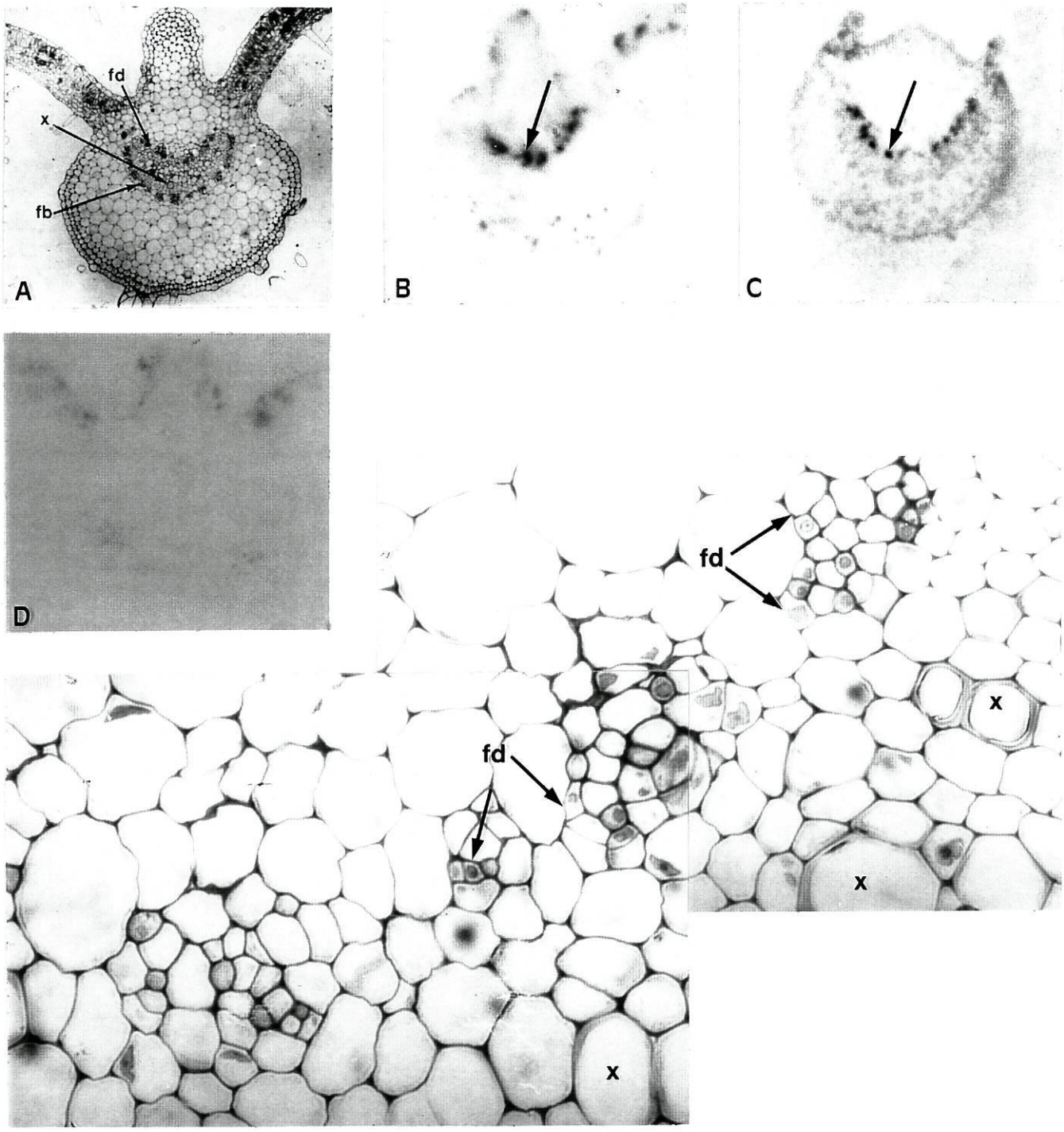


Fig. 20. Imunolocalização da GS em impressões em nitrocelulose de secções transversais de folha (B) e de pecíolo (C) de batateira. Para detecção da GS as membranas foram incubadas em anticorpo anti-GS e seguidamente em IgG anti-coelho conjugadas com peroxidase. A marcação (seta) é bastante intensa na zona correspondente ao floema adaxial estando ausente no controlo (D) em que foi omitido o anticorpo primário. Em A apresenta-se um corte transversal de folha na região da nervura central, corado com azure II/azul de metileno, para comparação da anatomia. fd, floema adaxial; x, xilema; fb, floema abaxial. A, x 33; B, x 32; C, x 18; D, x 32.

Fig. 21. Pormenor dos feixes de floema adaxial da nervura central da folha de batateira em corte transversal. fd, floema adaxial; x, xilema. x 500.

O floema na maioria das dicotiledóneas tem uma posição externa ao xilema nos caules e abaxial nas folhas, mas em algumas famílias, incluindo as Solanaceae, o floema está também localizado numa posição interna ou adaxial, respectivamente nos caules e nas folhas. Os feixes vasculares formam um arco com o lado côncavo orientado para o lado adaxial da folha (Fig. 20-A) tal como descrito na literatura (McCauley e Evert, 1988; McCauley e Evert, 1989). Na Fig. 21 pode ver-se um pormenor dos feixes de floema adaxial em secção transversal, separados do xilema por células de parênquima vascular.

Também no pecíolo, em maior ampliação, a marcação resultante da actividade da peroxidase pode ser observada na zona correspondente ao floema adaxial (Fig. 22), nos feixes vasculares centrais, laterais inferiores e laterais superiores (nas "asas").

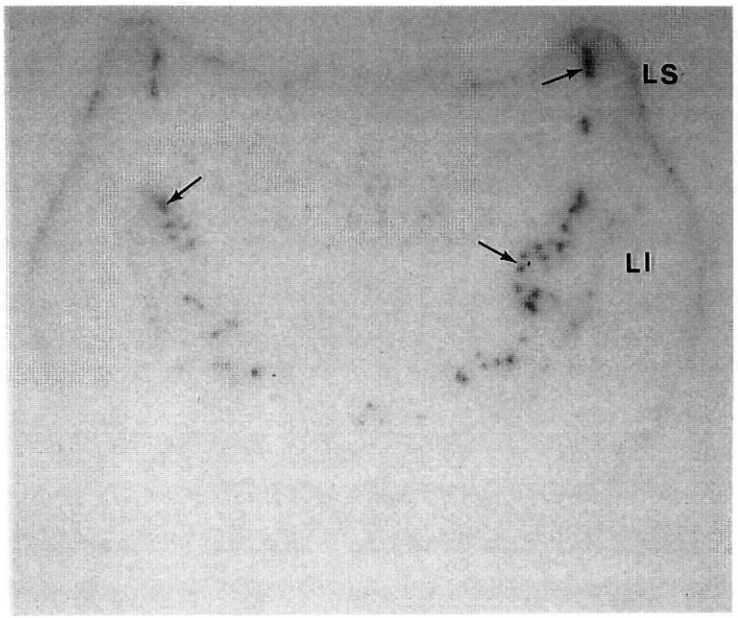


Fig. 22. Detecção da GS em impressão de secção transversal de pecíolo de folha de batateira em nitrocelulose. A GS aparece localizada principalmente no floema interno (setas), nos feixes vasculares centrais, nos feixes laterais inferiores (LI) e laterais superiores (LS). x 40.

As impressões dos tecidos em nitrocelulose podem ser melhor visualizadas por tratamento com vermelho de Ponceau, que cora as proteínas totais presentes na membrana. Na imagem (Fig. 23) de impressões de pecíolo (Fig. 23-A) e folha (Fig. 23-B) coradas com Ponceau é visível a marcação na zona correspondente ao floema interno. A marcação está ausente nos controlos (Fig. 23-C e D) em que a incubação com os anticorpos primários foi omitida.

A detecção dos anticorpos primários foi feita por meio de anticorpos secundários conjugados com peroxidase. Assim, foi necessário inibir as peroxidases endógenas presentes nos tecidos, igualmente transferidas para a membrana, incubando esta previamente com uma solução de ácido periódico 1%. Nos controlos efectuados sem anticorpos primários, não foi detectada qualquer actividade de peroxidase, pelo que a marcação observada nas secções tratadas com ambos os anticorpos corresponde de facto à actividade da peroxidase conjugada com o anticorpo secundário.

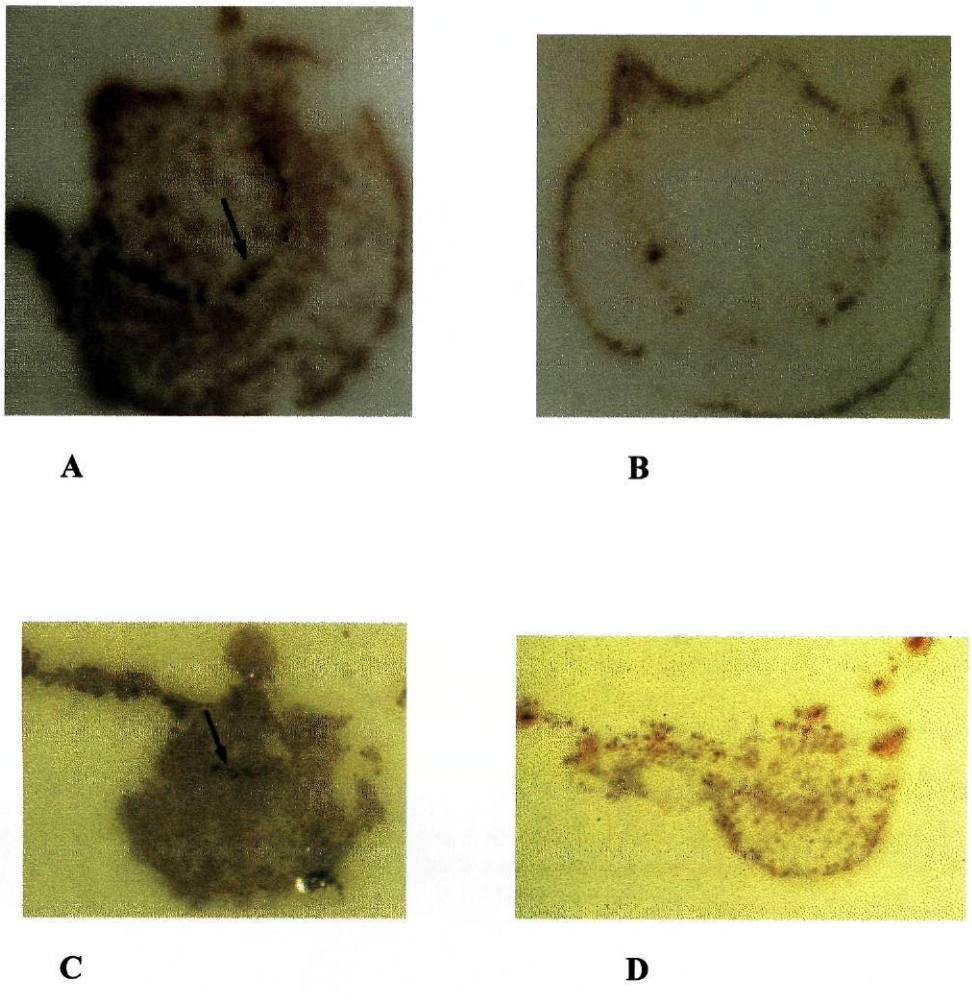


Fig. 23. Localização da GS em impressões em nitrocelulose de secções de pecíolos (A e B) e folhas (C e D) de batateira. As impressões foram tratadas com vermelho de Ponceau, que cora as proteínas totais presentes na membrana. Em A e C a marcação para a GS é visível na zona correspondente ao floema adaxial (seta). B e D, controlos, em que a incubação com anticorpos primários anti-GS foi omitida, não se observando marcação. A, x 22; B, x 23; C, x 34; D, x 28.

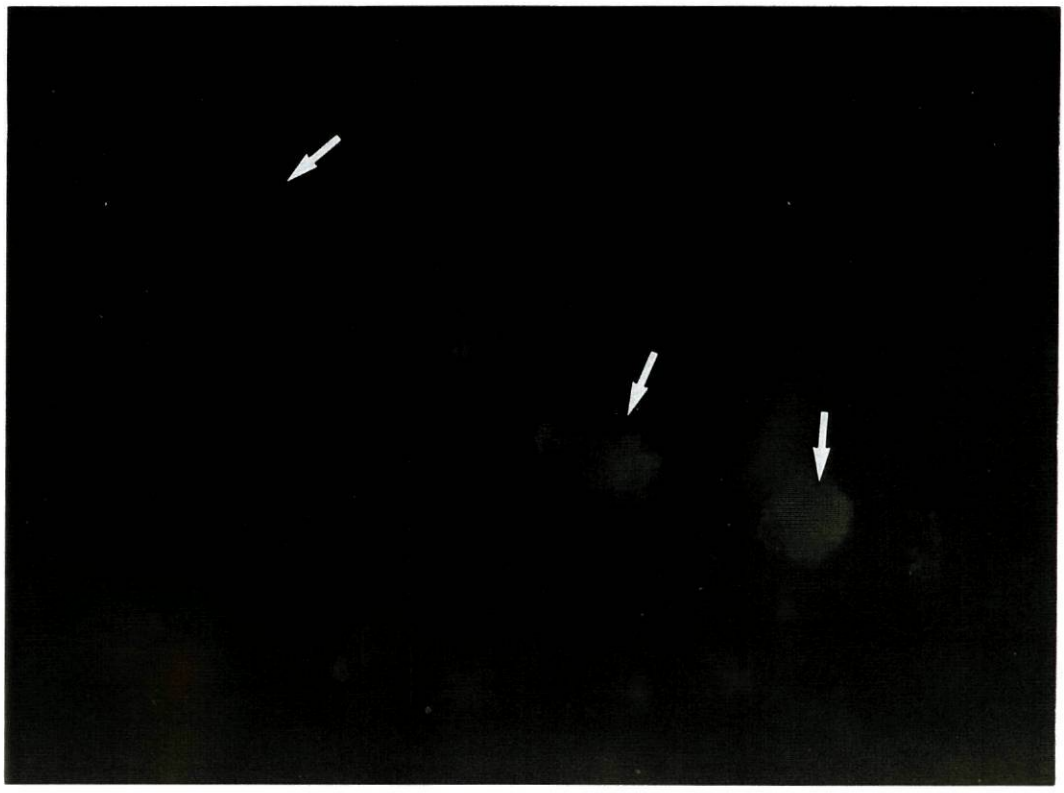


Fig. 24. Detecção de GS por meio de anticorpos secundários marcados com fluoresceína (FITC) em impressão de secção transversal de folha de batateira em nitrocelulose. Após incubação da membrana com anticorpos primários anti-GS, utilizaram-se para a detecção anticorpos secundários conjugados com fluoresceína e as membranas foram observadas ao microscópio de fluorescência. As células marcadas, coradas de verde, aparecem dispostas em arco parcialmente visível na zona do floema adaxial.

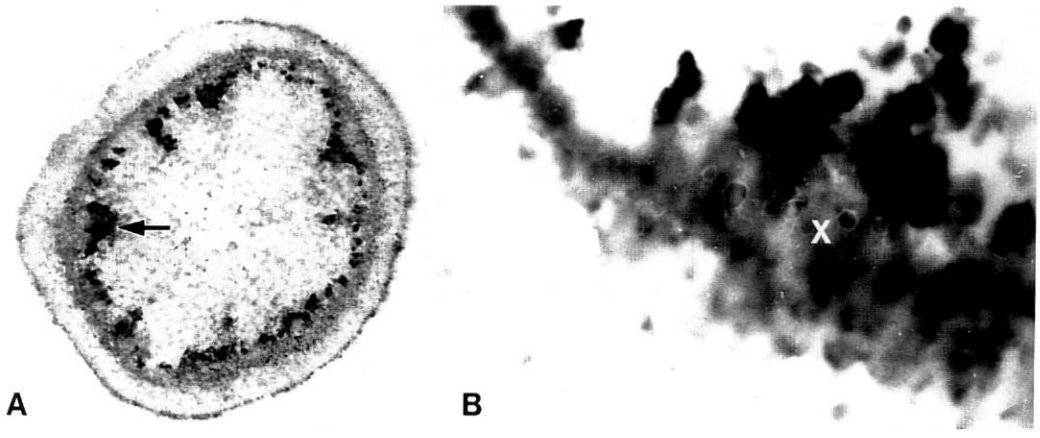


Fig. 25. Detecção de GS em secções transversais de caule de batateira por impressão de tecidos em nitrocelulose. A marcação está presente em toda a zona vascular (A), mas é particularmente intensa na zona do floema interno (seta) como se depreende da localização relativamente ao xilema (x), mais evidente na imagem com maior ampliação (B). A, x 12; B, x 120.

Contudo, para afastar a hipótese de qualquer artefacto resultante do facto de se utilizar a peroxidase na detecção, realizou-se um controlo em que se utilizou, após incubação com os anticorpos primários, anticorpos secundários conjugados com fluoresceína (FITC). A marcação obtida era igualmente intensa e localizada na zona correspondente aos feixes de floema interno (Fig. 24), conforme se pode ver na figura em que as células marcadas com fluoresceína se dispõem em arco na zona correspondente ao floema adaxial.

Quando se realiza a impressão do tecido na nitrocelulose, as paredes celulares mais firmes (xilema, floema, esclerênquima) deixam uma marca física que permite visualizar a anatomia sem qualquer tratamento adicional, e permite uma localização mais rigorosa do antigénio. Em impressões de secções transversais de caule a zona vascular é facilmente identificada, sendo particularmente evidentes as fibras floémicas e o xilema. Como pode ser observado na Fig. 25, a marcação está presente em toda a zona vascular mas aparece particularmente localizada, em manchas muito intensas, na zona correspondente ao floema interno como se pode depreender pela localização relativamente ao xilema.

Localização da GS por imunocitoquímica ultraestrutural

-Apuramento da técnica

Os procedimentos utilizados neste trabalho basearam-se essencialmente nos descritos por Esaguy et al (1989) e por Hawes (1988), mas foram sendo feitas várias alterações resultantes de vários ensaios que tinham por finalidade estabelecer as condições que melhor conciliassem a preservação ultraestrutural com a retenção da antigenicidade e uma marcação eficiente com um mínimo de marcação inespecífica.

Na fixação utilizou-se inicialmente tampão fosfato mas foi posteriormente dada preferência ao tampão PIPES, cujas vantagens para utilização em microscopia electrónica de tecidos vegetais estavam já bem estabelecidas (Salema e Brandão, 1973) existindo também referências à sua utilização em imunocitoquímica (Hawes, 1988).

Testaram-se concentrações de paraformaldeído de 2, 3 e 4%, mantendo-se o glutaraldeído em 0,5%. Os tecidos foram fixados quer durante uma ou duas horas à temperatura ambiente, quer a 4°C, durante a noite, sendo aparentemente a fixação mais eficiente à temperatura ambiente. Com 2 % de paraformaldeído a preservação ultraestrutural era algo deficiente obtendo-se boa densidade de marcação a nível dos cloroplastos e citoplasma de células do floema. Contudo, verificava-se também alguma marcação a nível de núcleo mas apenas nas células com grande densidade de partículas de ouro no citoplasma, pelo que a marcação no núcleo foi atribuída a difusão do antigénio e não a marcação inespecífica. Quando se utilizava 3% de paraformaldeído a marcação no núcleo era substancialmente reduzida nos mesmos tipos de células.

A preservação do citoplasma destas células era também melhor com a concentração mais elevada de paraformaldeído mas, no mesmo tecido, variava com o tipo de célula pelo que a diversidade de tipos de células dificulta a optimização das condições de fixação.

Foram testadas várias diluições dos anticorpos e a concentração de IgG foi acertada para 20 μg/mL respectivamente no antisoro anti-GS e no soro não imune de coelho. Concentrações superiores davam origem a marcação inespecífica por toda a secção.

Os anticorpos secundários utilizados (anti IgG de coelho feitos em cabra) estavam conjugados com partículas de ouro coloidal com diâmetros de 10 nm (Sigma) e de 15 nm (Janssen e Amersham). Embora as partículas de dimensões mais reduzidas possam contribuir para uma maior densidade de marcação e melhor resolução na localização, a sua detecção é mais difícil e no caso dos conjugados da Sigma, apresentavam-se frequentemente em agregados. Foi posteriormente dada preferência ao uso de conjugados que apresentassem baixo número de agregados (ex°, Amersham). As imagens de cortes incubados com conjugados de ouro de 10 nm estão identificadas na respectiva legenda; nos restantes casos as imagens foram obtidas a partir de cortes incubados com conjugados de ouro de 15 nm.

A incubação do anticorpo primário foi feita com ausência ou presença de 0,2 % Tween-20. A presença deste detergente em todas as soluções de incubação de anticorpos (primários e secundários) assim como nas soluções de lavagem, mostrou-se determinante na redução da marcação inespecífica.

A importância da presença do detergente e também de NaCl nos tampões de incubação com material vegetal já tinha sido referida por Hawes (1988). Segundo a técnica de Esaguy et al (1989) utilizou-se uma grande quantidade de sal (3% NaCl adicionados ao PBS) para reduzir interacções inespecíficas de tipo iónico dos anticorpos com o material vegetal. Contudo, era frequente a presença de partículas de ouro coloidal nos espessamentos secundários das paredes de xilema.

Os controlos foram efectuados substituindo os anticorpos primários por soro não imune de coelho ou por PBS. Em qualquer caso, a marcação era muito reduzida ou ausente.

Como material de impregnação utilizou-se essencialmente a resina LR White mas fizeram-se igualmente alguns ensaios com Unicryl (BioCell). Quer em secções de LR White, quer em secções de Unicryl, aparece por vezes um espaço transluzente (halo) em volta dos organelos ou junto das membranas celulares que já tem sido referido por outros autores, embora tenha sido referido que este efeito era menor nos cortes de Unicryl (Goping et al, 1996). O contraste é mais evidente nos cortes de Unicryl. Os cortes de Unicryl estão identificados na legenda da respectiva figura; as restantes imagens são de material impregnado com LR White.

Uma vez que se sabe que o ósmio altera a antigenicidade, não se procedeu à pós-fixação com ósmio. A ausência de ósmio no tratamento das amostras tem como consequência um menor contraste das secções e impede a visualização de estruturas osmiofílicas, que normalmente aparecem escuras na imagem do microscópio electrónico (Salema e Santos, 1992). Assim, as membranas não são visualizadas, mas a sua localização é, contudo, perceptível em contraste negativo, aparecendo como estruturas transparentes aos electrões nomeadamente o sistema de membranas do interior dos cloroplastos, as cristas mitocondriais, etc.

Uma vez que o acetato de uranilo confere contraste às estruturas contendo ácidos nucleicos, a cromatina, os ribossomas e polirribossomas, são visíveis nas imagens tratadas para imunocitoquímica.

-Localização da GS em folhas de batateira

Através de imunocitoquímica ultraestrutural foi possível verificar que ambas as isoformas da GS citosólica e cloroplastidial, estavam presentes em folhas de batateira, mas em diferentes tipos de células: nas células do mesófilo a GS estava presente apenas nos cloroplastos, enquanto a GS citosólica ocorria em células do floema.

Mesófilo

Em trabalhos anteriores desenvolvidos neste laboratório pode ser encontrada a descrição ultraestrutural das células de mesófilo de folha de batateira (Ferro de Beça, 1995).

As células do mesófilo apresentavam-se altamente vacuolizadas com faixa citoplasmática adjacente à parede e contendo organelos típicos deste tipo de células. Os cloroplastos apresentavam um sistema membranoso bem desenvolvido organizado em grana e intergrana, grãos de amido, e numerosos plastoglóbulos (Figs. 26 e 27). Uma marcação significativa estava confinada aos cloroplastos podendo ser observada por todo o perfil cloroplastidial, particularmente no estroma, embora algumas partículas de ouro pareçam associadas aos tilacóides (Fig 26-C e Fig 27 A e B). Não foi observada marcação significativa no citoplasma nem em outros organelos como peroxissomas e mitocôndrias (Fig 27 A e B). A presença de partículas de ouro era também negligível nas paredes celulares e nos núcleos deste tipo de células. A marcação estava também praticamente ausente de secções controlo incubadas com soro não imune de coelho (Fig. 26 A e B).

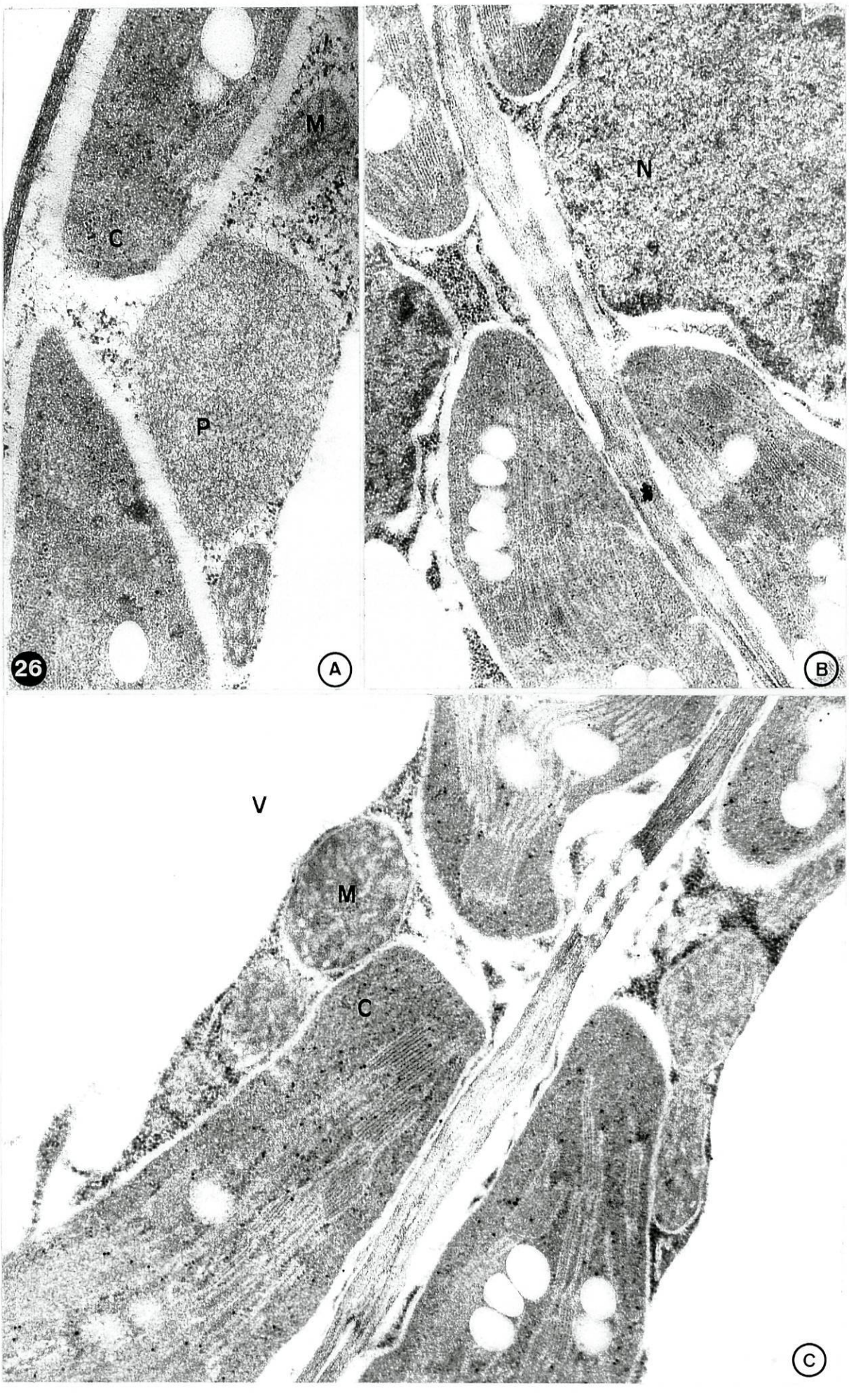
Floema

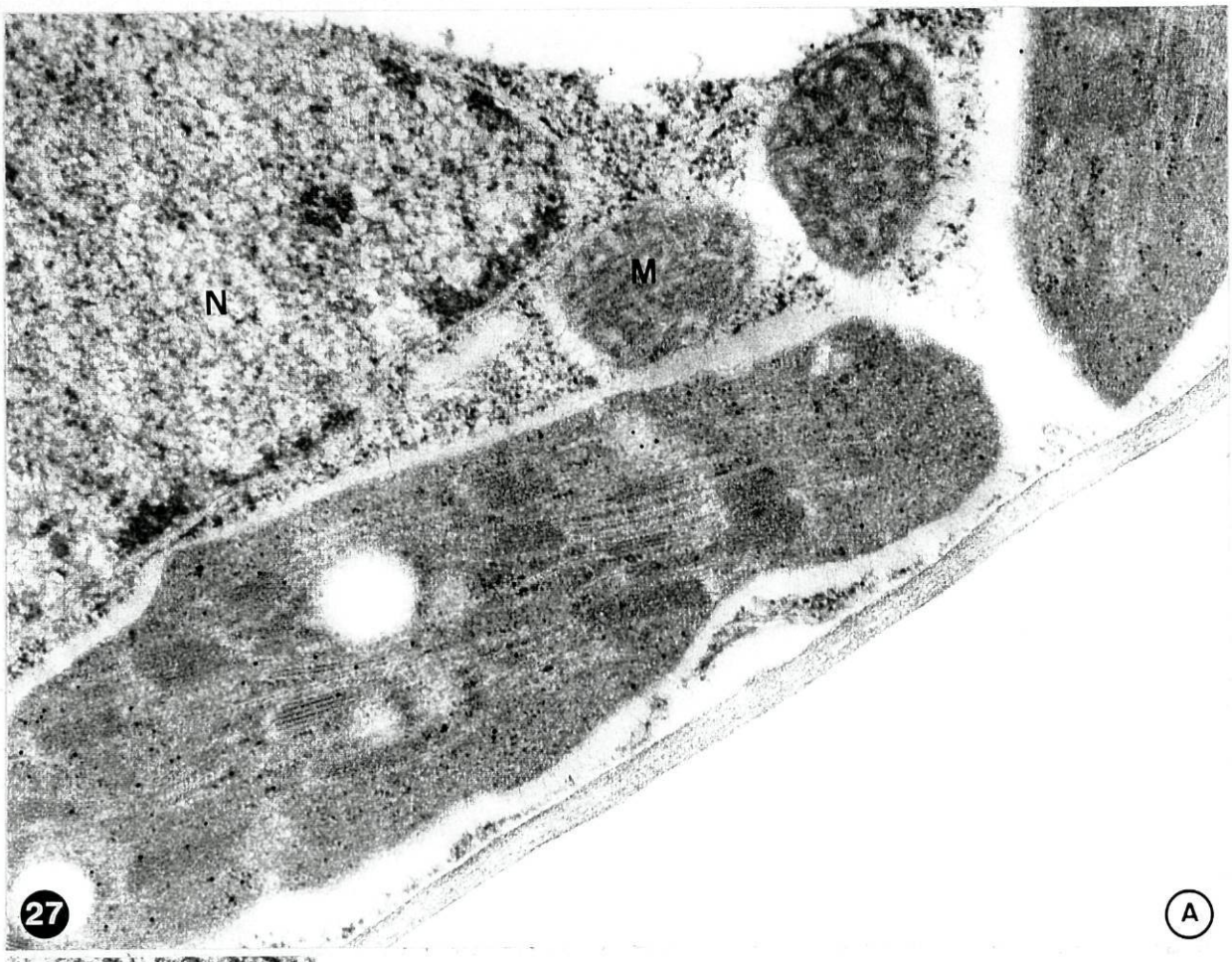
Nervuras centrais de folha foram isoladas e processadas para imunocitoquímica ultraestrutural a fim de se pesquisar a GS nos tecidos vasculares de folha de batateira. No sistema vascular, uma marcação significativa ocorria no floema, quase exclusivamente nas células de companhia.

Na imagem (Fig. 28-A) de baixa ampliação, podem observar-se diferentes tipos de células do floema: elementos de tubo crivoso e diferentes tipos células de parênquima floémico que lhes estão associadas. Dentro das células do parênquima, as células de companhia distinguem-se pelo seu tamanho relativo e uma associação espacial estreita com os elementos crivosos. As células de parênquima floémico são normalmente maiores que as células de companhia adjacentes (Fig. 28-A) e apresentam formas variáveis desde arredondadas até em forma de cunha.

Fig. 26. Localização da GS em células do mesófilo de folha de batateira por imunocitoquímica ultraestrutural. A e B, controlos em que a incubação com o anticorpo primário anti-GS foi substituída por soro não imune de coelho. C, secção tratada com anticorpos anti-GS; a marcação para a GS está confinada aos cloroplastos. C, cloroplasto; M, mitocôndria; N, núcleo; P, peroxissoma, V, vacúolo. A, x 44 000; B x 35 000; C, x 44 000.

Fig. 27. A e B, Secções de células do mesófilo de folha de batateira tratadas com anticorpos anti-GS. A marcação encontra-se especificamente nos cloroplastos sendo praticamente inexistente em outros organelos celulares visíveis nas imagens como mitocôndrias (M), peroxissomas (P), núcleo (N). Também não se observa marcação significativa no citoplasma e paredes celulares. A, x 42 000; B, x 33 000.


M
C
P
26
A
N
B
V
M
C
C


N
M
27
A

N
V
P
B

As células de companhia são normalmente ovais ou arredondadas e possuem um aspecto típico, com citoplasma denso com elevado número de ribossomas, numerosas mitocôndrias e alguns plastídios (Figs. 28-30). Em maior ampliação, pode observar-se retículo endoplasmático rugoso e abundantes polirribossomas. Possuem conexões com o elemento crivoso que tipicamente tomam a forma de plasmodésmios ramificados do lado da célula de companhia (Fig. 28-B).

Os elementos de tubo crivoso apresentam uma parede mais espessa do que as células circundantes e possuem uma estreita faixa de citoplasma adjacente à parede e um material fibrilar, a proteína-P.

A marcação pelo ouro coloidal apresentava uma especificidade celular na sua localização que é bem patente na Fig. 28-A e, em maior ampliação, nas Figs. 28-B e C. A densidade de partículas de ouro era muito elevada nas células de companhia, contrastando com ausência de marcação nos elementos crivosos e o baixo número de partículas observadas em outras células de parênquima floémico. A marcação estava distribuída pelo citoplasma, por vezes em agregados (Figs. 28-30), e numa imagem parece em associação com o retículo endoplasmático rugoso (Fig. 30-D).

As mitocôndrias praticamente não apresentavam marcação e esta era também muito reduzida nos plastídios (Figs. 29-A e 30-A, C e D). A marcação encontrada no núcleo está somente presente em células com marcação abundante no citoplasma e por isso foi atribuída a difusão do antigénio, e não a marcação inespecífica, como já foi referido na secção "apuramento da técnica". Nas secções tratadas com soro não imune não era visível marcação (Figs. 29-B e 30-B).

-Localização da GS em tecido caloso de batateira

Os aspectos ultraestruturais de tecido caloso de batateira mantido neste laboratório já foram anteriormente descritos (Ferro de Beça, 1995). As células, de tipo parenquimatoso, apresentam-se vacuolizadas e podem ser observados no citoplasma mitocôndrias e plastídios com reduzido sistema lamelar.

No tecido caloso, a maior densidade de marcação apresentava-se dispersa no citoplasma (Figs. 31 e 32) mas está também presente nos plastídios nas mesmas células. Outros organelos presentes nas células do tecido caloso não se encontravam marcados. A marcação era também praticamente inexistente nas secções incubadas com soro não imune (Fig. 31-B). Em alguns casos a marcação aparece em células de floema (Fig. 32-B). Pode comparar-se a marcação obtida com partículas de ouro de 10 nm (Figs. 31-A e C), que neste caso tendia a formar agregados, com ouro de 15 nm (Figs. 32-A e B) que aparece disperso. Dadas as suas dimensões, as partículas de 15 nm são mais facilmente detectadas sem recorrer a ampliações muito elevadas mas são, por vezes, difíceis de distinguir dos ribossomas, particularmente em material muito contrastado.

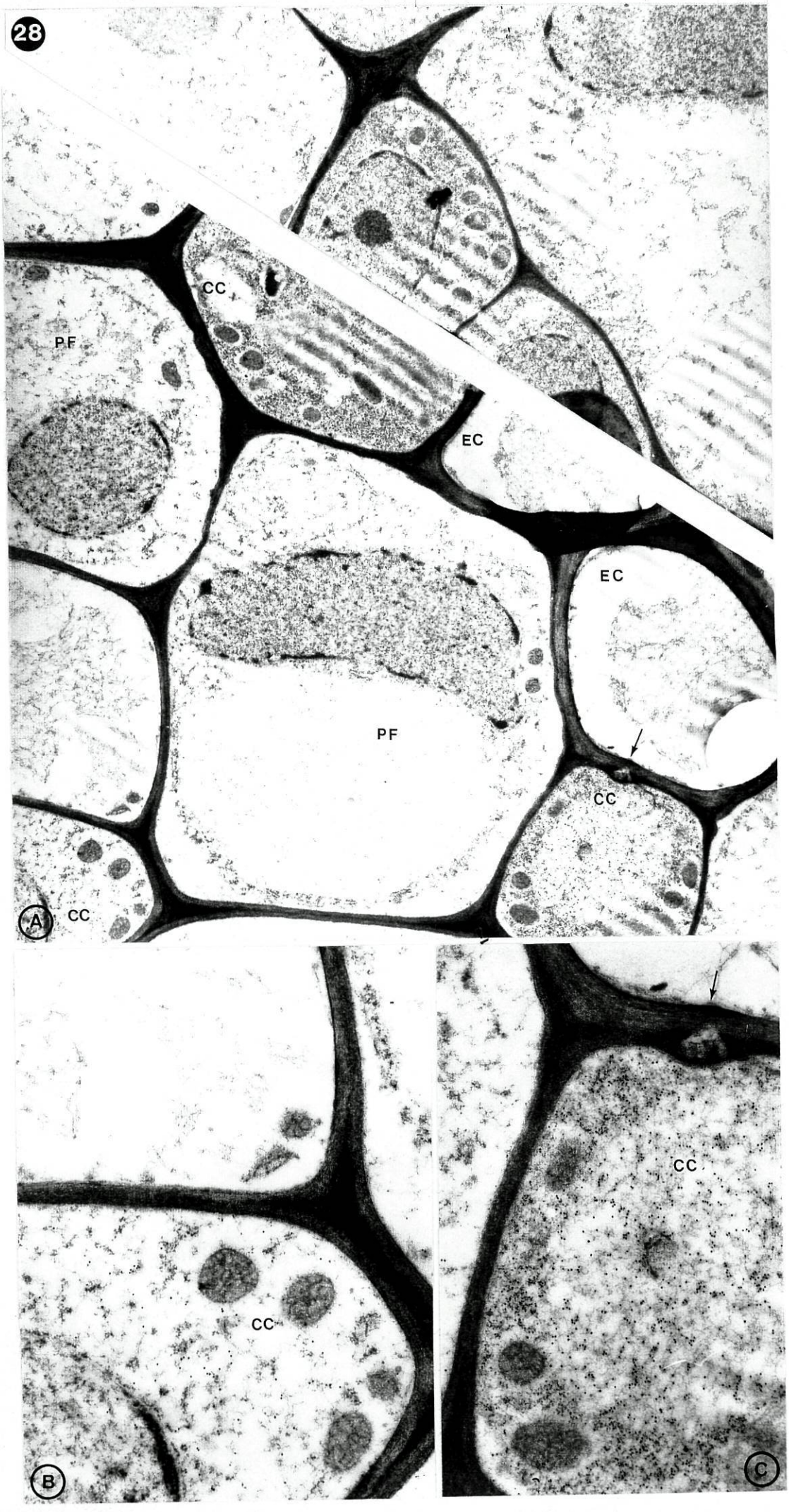
Fig. 28. Localização da GS no floema de folhas de batateira. A, aspecto geral evidenciando diferentes tipos de células de floema: elementos de tubo crivoso (EC), células de companhia (CC) e outras células de parênquima floémico (PF). A marcação apresenta uma especificidade celular, localizando-se apenas nas células de companhia, que se podem observar em maior ampliação em B e C. Um plasmodésmio ramificado do lado da célula de companhia encontra-se assinalado em A e C (seta). A, x 6 900; B, x 21 300; C, x 21 300.

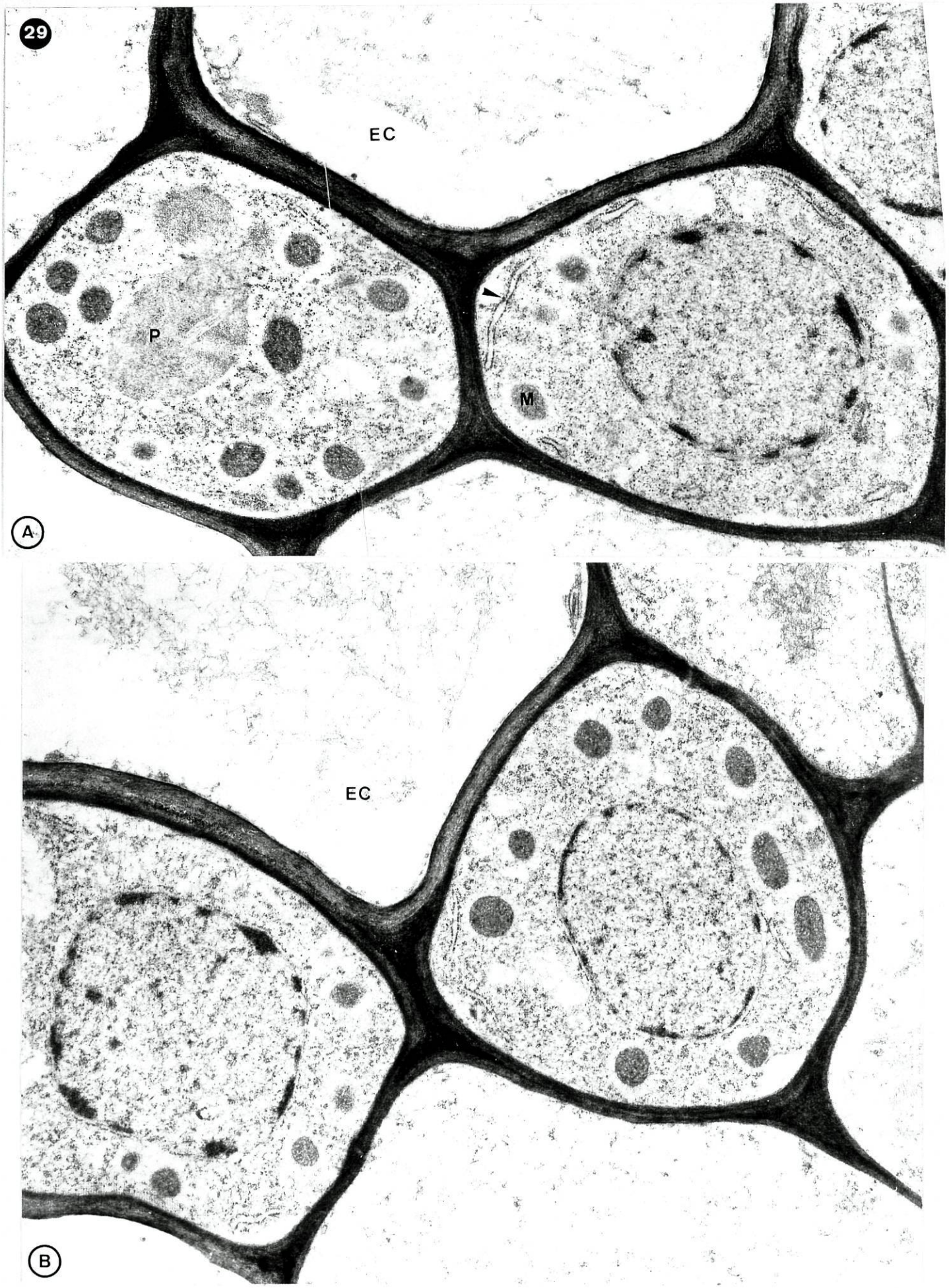
Fig. 29. A, aspecto geral das células de companhia adjacentes ao elemento de tubo crivoso (EC), evidenciando uma elevada de densidade de marcação no citoplasma. No citoplasma, bastante denso, são visíveis numerosas mitocôndrias (M), e perfis de retículo endoplasmático rugoso (ponta de seta). Alguma marcação, muito reduzida, é visível nos plastídeos (P). B, controlo, em que os anticorpos anti-GS foram substituídos por soro não imune de coelho. A x 17 200; B, x 14 800.

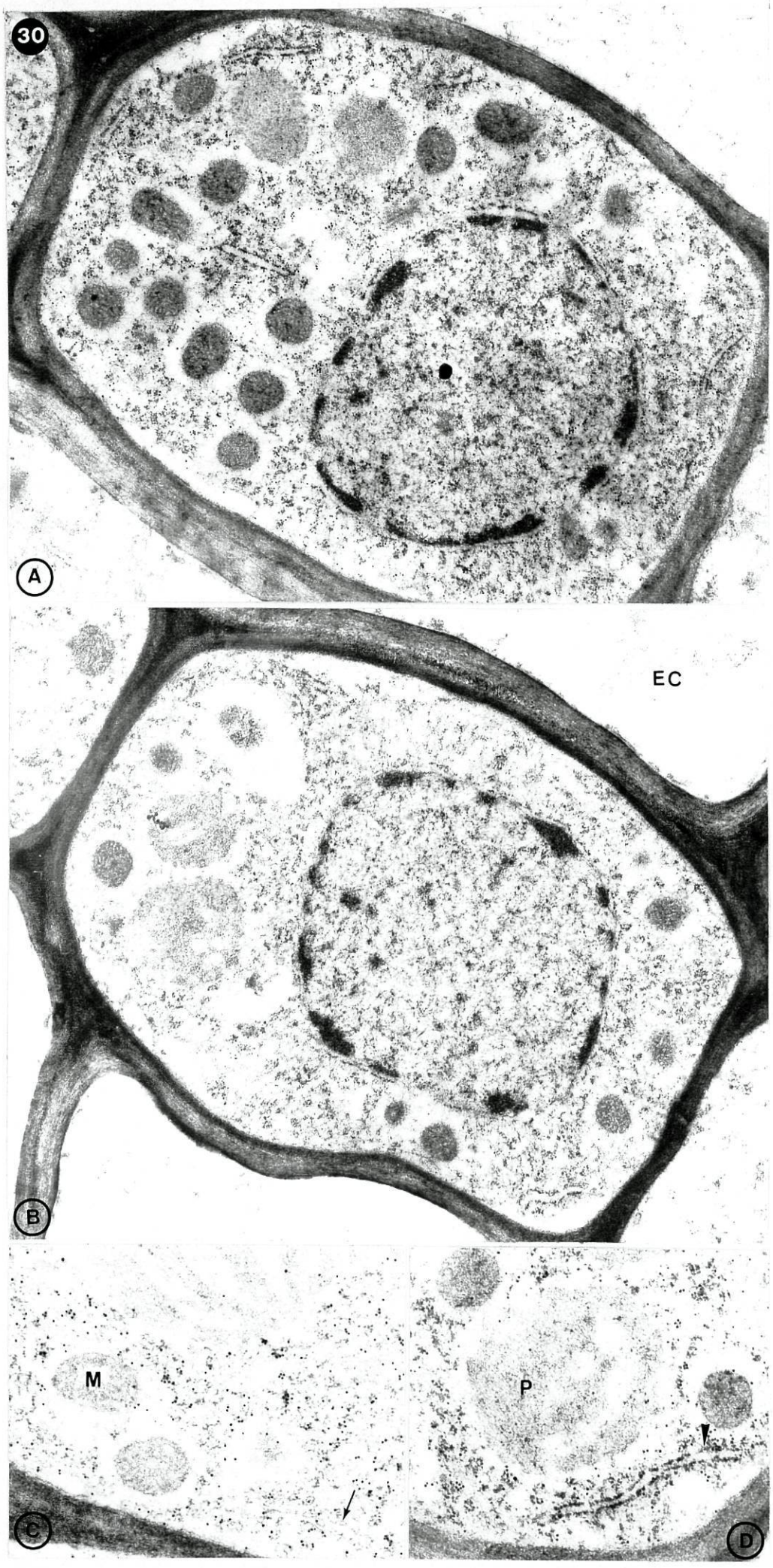
Fig. 30. Célula de companhia apresentando elevada densidade de partículas de ouro no citoplasma (A) e respectivo controlo tratado com soro não imune de coelho (B). Em maior ampliação (C e D) podem observar-se numerosos polirribossomas (seta) e retículo endoplasmático rugoso (ponta de seta). A x 19 600; B x 18 000; C, 28 900; D, 29 000.

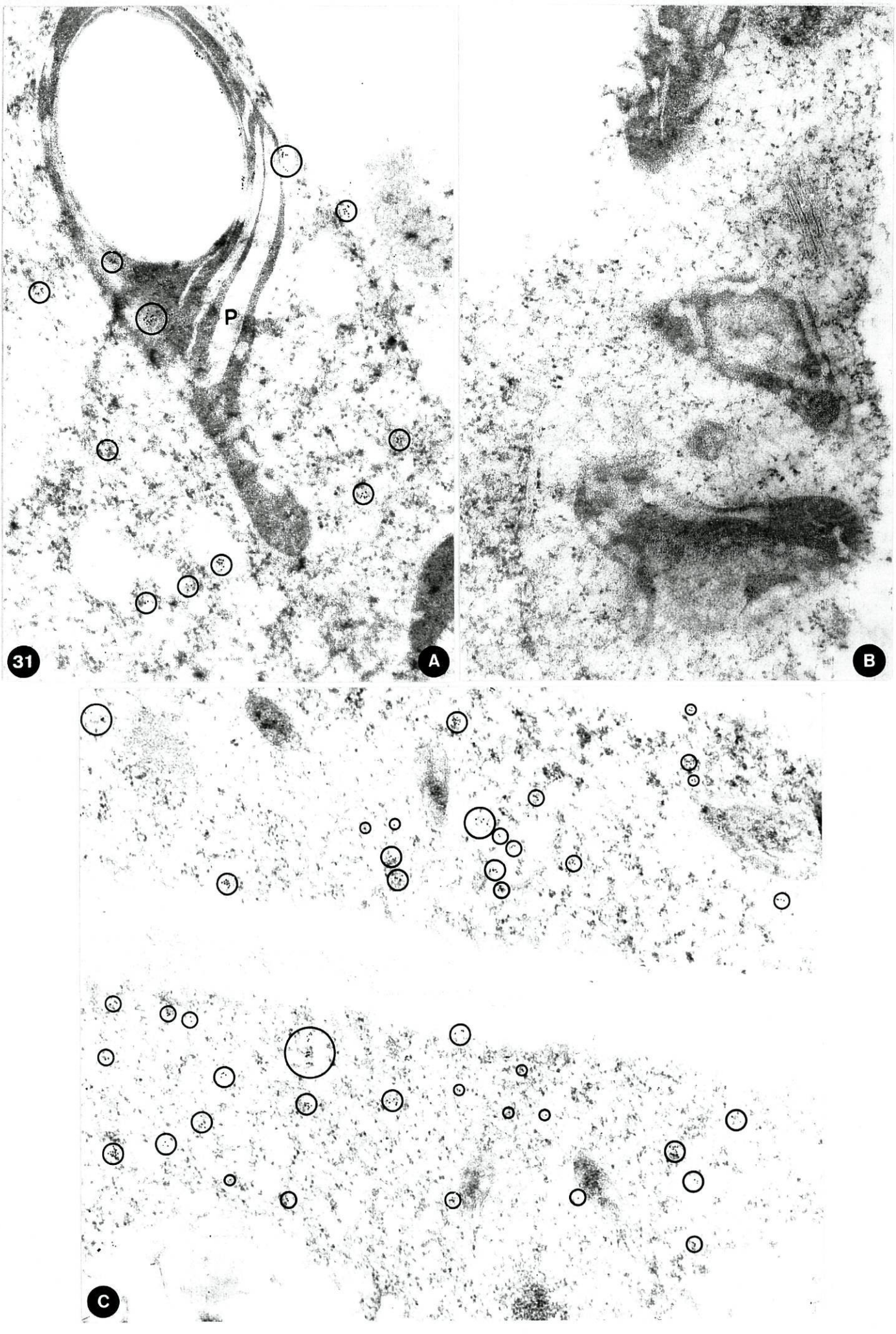
Fig. 31. Localização da GS em tecido caloso de batateira. A marcação encontra-se dispersa pelo citoplasma, estando também presente nos plastídeos (P). As partículas de ouro, de 10 nm, têm tendência a formar agregados (A e C). B, controlo tratado com soro não imune de coelho. A, x 58 300; B, 56 800; C, x 52 400.

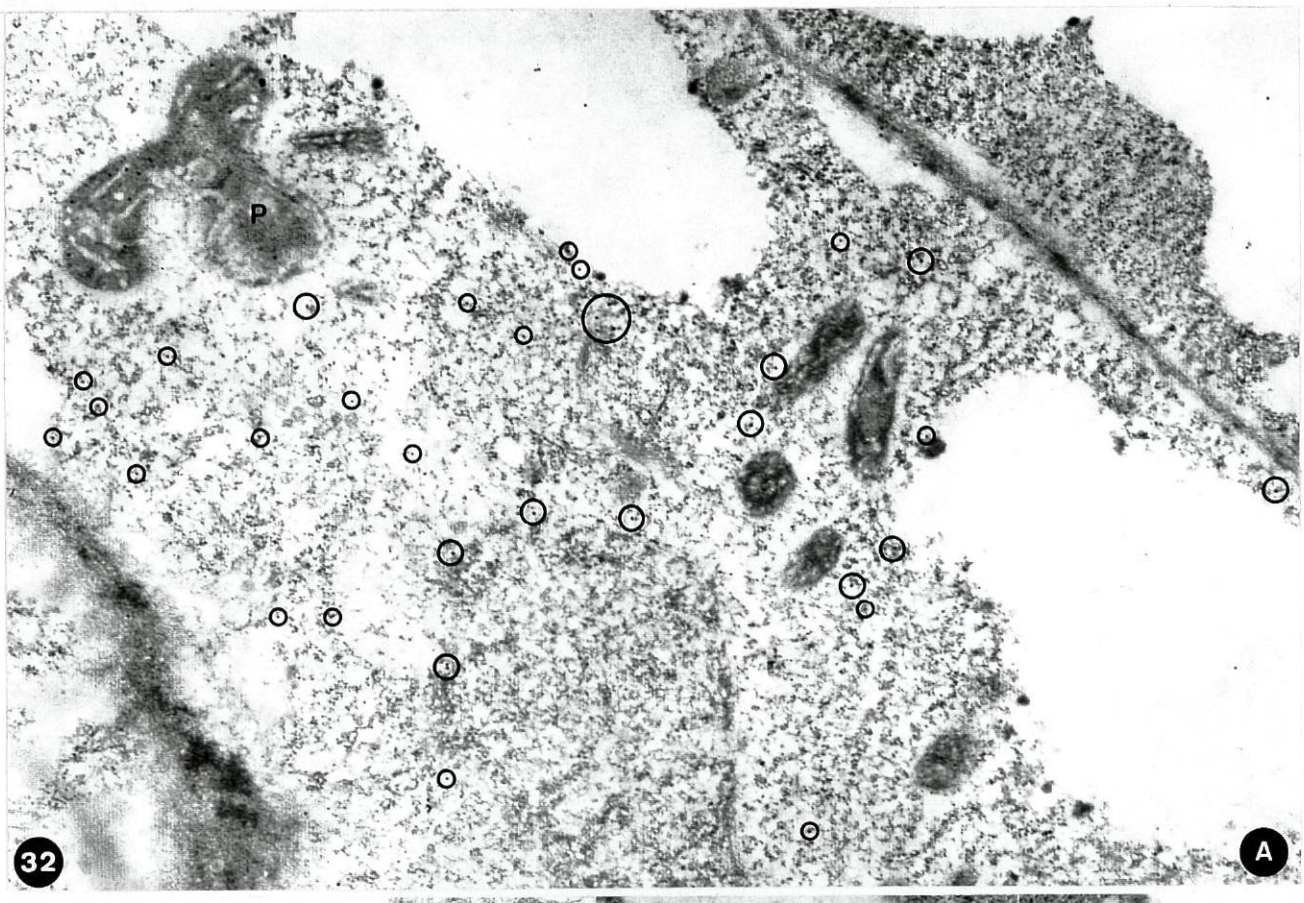
Fig. 32. A e B, detecção da GS, com ouro coloidal de 15 nm, em células de tecido caloso de batateira. A marcação encontra-se dispersa pelo citoplasma e também em pequenos plastídeos (P). Em B, pode observar-se a marcação numa célula de floema, pouco vacuolizada, que apresenta uma espessa parede celular e citoplasma denso, rico em ribossomas e mitocôndrias. A x 18 400; B x 35 000.

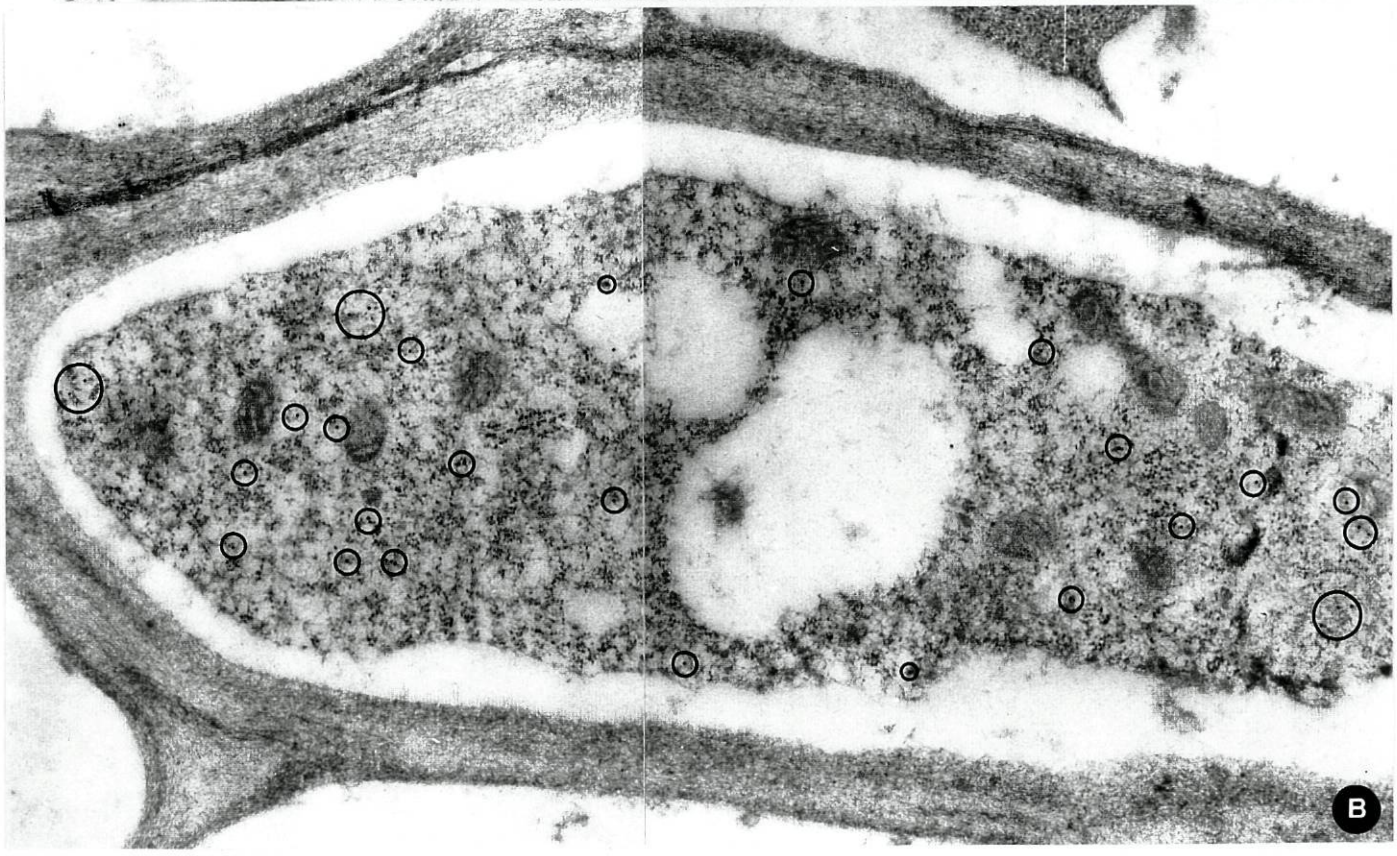

28
CC
PF
EC
EC
PF
CC
A
CC
CC
B
CC
C


29
EC
P
M
A
EC
B


30
A
EC
B
M
C
P
D


P
31
A
B
C


P
32
A


B

Localização das isoformas da GS em folhas estioladas e em reverdecimento

Por imunolocalização foi observada a existência da GS nos cloroplastos e citosol de folhas de batateira; contudo, os resultados obtidos apontavam para uma localização específica da GS1 e da GS2 em diferentes tecidos foliares: a GS ocorria em cloroplastos essencialmente de células do mesófilo e no citosol de células de companhia do floema. Tendo em vista estes resultados, foi feito um estudo mais aprofundado de imunolocalização da GS que abarcou diferentes tipos de células de folhas estioladas e após reverdecimento.

A presença da GS foi investigada numa situação fisiológica que implica alterações no desenvolvimento de plastídios: a transição estioplasto-cloroplasto.

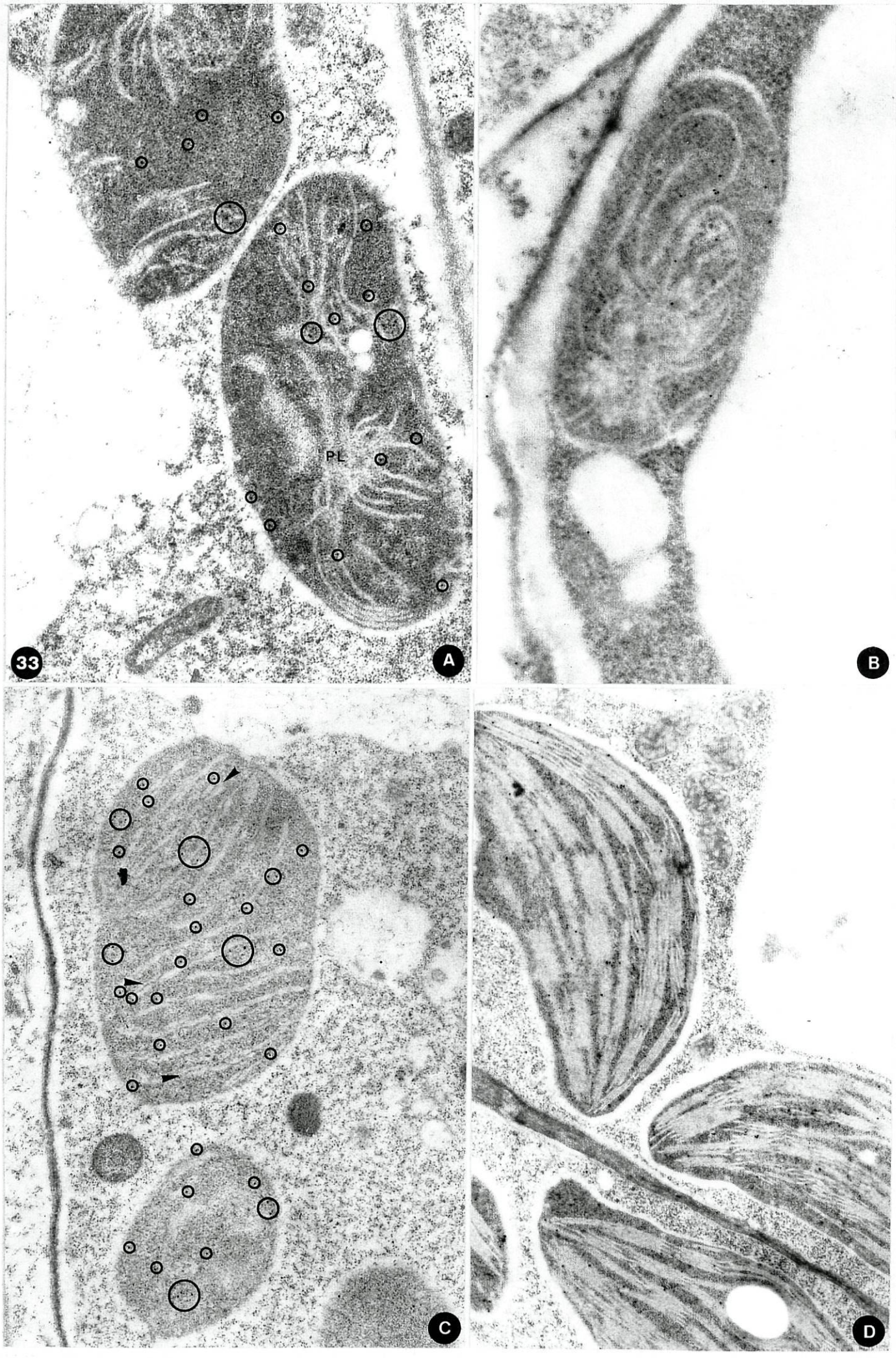
Em células de mesófilo de plantas crescidas na obscuridade era possível observar marcação, ainda que reduzida, nos estioplastos. Nos estioplastos da Fig. 33-A é possível observar o corpo prolamelar bem desenvolvido, donde irradiam tilacóides primários. No estroma são visíveis grãos de amido, plastoglóbulos e numerosos ribossomas. A marcação, embora de baixa densidade, aparece especificamente nos plastídios, não se observando partículas de ouro no citosol.

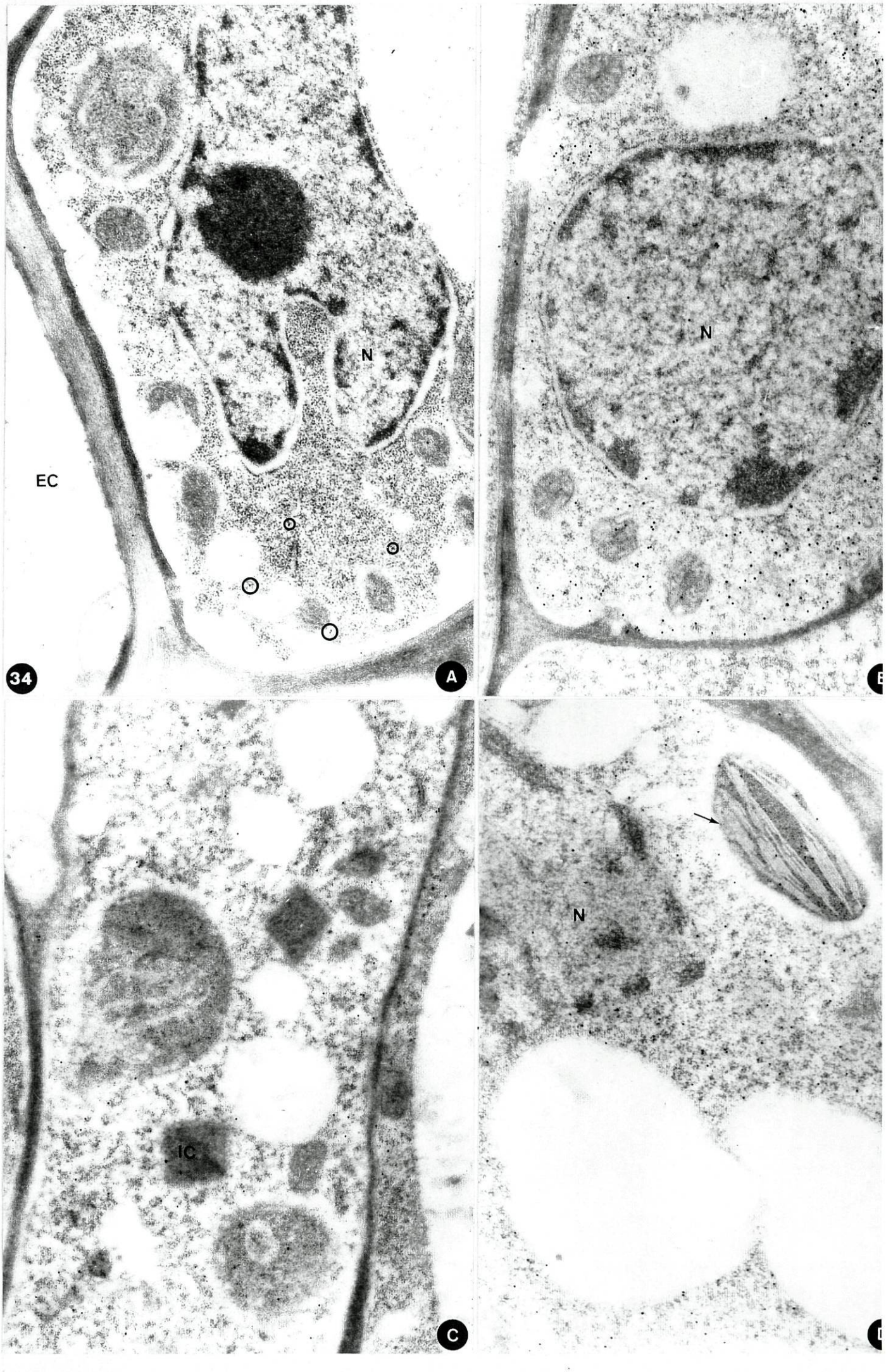
Após exposição à luz, a marcação para a GS nos plastídios aumentava de forma marcada, paralelamente ao desenvolvimento dos estioplastos e sua interconversão em cloroplastos, como se pode ver em imagens que representam várias fases de conversão de estioplastos em cloroplastos, ao fim de 4 h, 24 h e 7 dias de exposição à luz (Figs. 33-B, C e D). Na Fig. 33-B (4 h) ainda são visíveis as membranas dos tilacóides primários em continuidade com o remanescente do corpo prolamelar. Na Fig. 33-C (24 h) já se podem observar zonas onde se verifica uma sobreposição de tilacóides o que indica a primeira fase de formação de grana. Nesta fase nota-se que a marcação para a GS tinha já uma densidade apreciável, dispersa pelo estroma do plastídio. Ao fim de 7 dias de exposição ao fotoperíodo (Fig. 33-D) as células de mesófilo apresentavam cloroplastos bem desenvolvidos, com sistema de membranas diferenciado em grana e lamelas estromáticas. A marcação, de densidade apreciável, distribuia-se por todo o perfil do cloroplasto. Em qualquer das situações observadas (folhas estioladas e em reverdecimento) não era observada marcação no citoplasma das células de mesófilo.

Em folhas estioladas, a imunomarcação era muito escassa no citoplasma das células vasculares da nervura central (Fig. 34-A). Contudo, após 4 h de iluminação, a marcação era já extremamente abundante no citosol das células de companhia do floema (Fig. 34-B), em contraste com outras células de parênquima floémico adjacentes onde a marcação no citoplasma não era significativa. Contudo, em nervuras secundárias, podiam ser observadas partículas de ouro em células de parênquima floémico que apresentavam microcorpos com inclusões cristalinas (Fig. 34-C) não se tratando, por isso, possivelmente de células de companhia cujos microcorpos tipicamente não apresentam inclusões cristalinas (McCauley e Evert, 1989).

Fig. 33. Localização da GS em folhas de batateira estioladas e após reverdecimento. Em folhas de plantas crescidas na obscuridade (A) a marcação é visível especificamente nos estioplastos que apresentam corpo prolamelar (PL) bem desenvolvido, donde irradiam tilacoides primários. A densidade de marcação nos plastídeos aumenta paralelamente com a interconversão de estioplastos em cloroplastos após 4 h (B), 24 h (C) e 7 dias (D) de exposição à luz. Em C pode observar-se sobreposição de tilacoides (pontas de seta). A x 20 900; B x 22 800; C 16 300; D, 19 500.

Fig. 34. Imunomarcação da GS em células de floema de folha de batateira. Em folhas estioladas (A) a marcação é muito escassa no citoplasma de células de companhia da nervura central. Após 4 horas de exposição à luz (B e C), a marcação é já abundante no citoplasma destas células (B) e aparece também em nervuras secundárias em células de parênquima floémico (C) que apresentam microcorpos com inclusões cristalinas (IC). Ao fim de 7 dias de exposição à luz (D) a marcação é visível no citoplasma em grande abundância e no cloroplasto, que apresenta sistema lamelar diferenciado em grana e lamelas estromáticas e retículo periférico (seta). EC, elemento de tubo crivoso; N, núcleo. A x 21 600; B x 25 000; C, 19 200; D, x 23 900.


33
A
PL
B
C
D


34
EC
N
A
N
B
IC
C
N
D

Em plantas com 7 dias de iluminação a marcação nas células do floema era visível não só no citosol em densidade muito elevada (Fig. 34-D), mas paralelamente nos plastídios das mesmas células, os quais apresentavam um sistema lamelar bem desenvolvido com grana e lamelas estromáticas e um retículo periférico típico dos cloroplastos das células de companhia (McCauley e Evert, 1989).

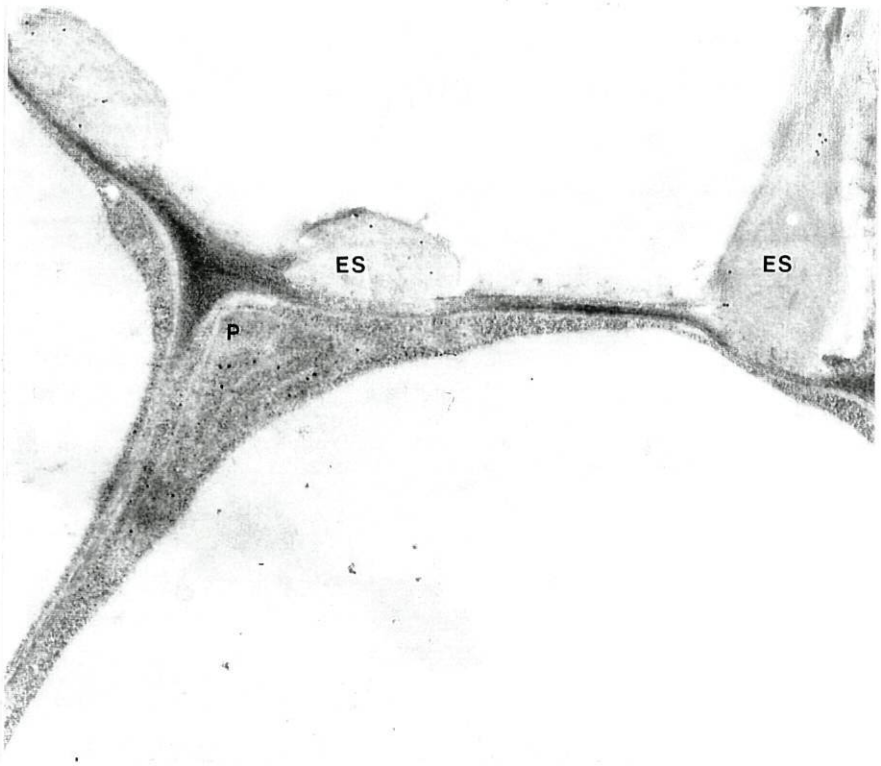
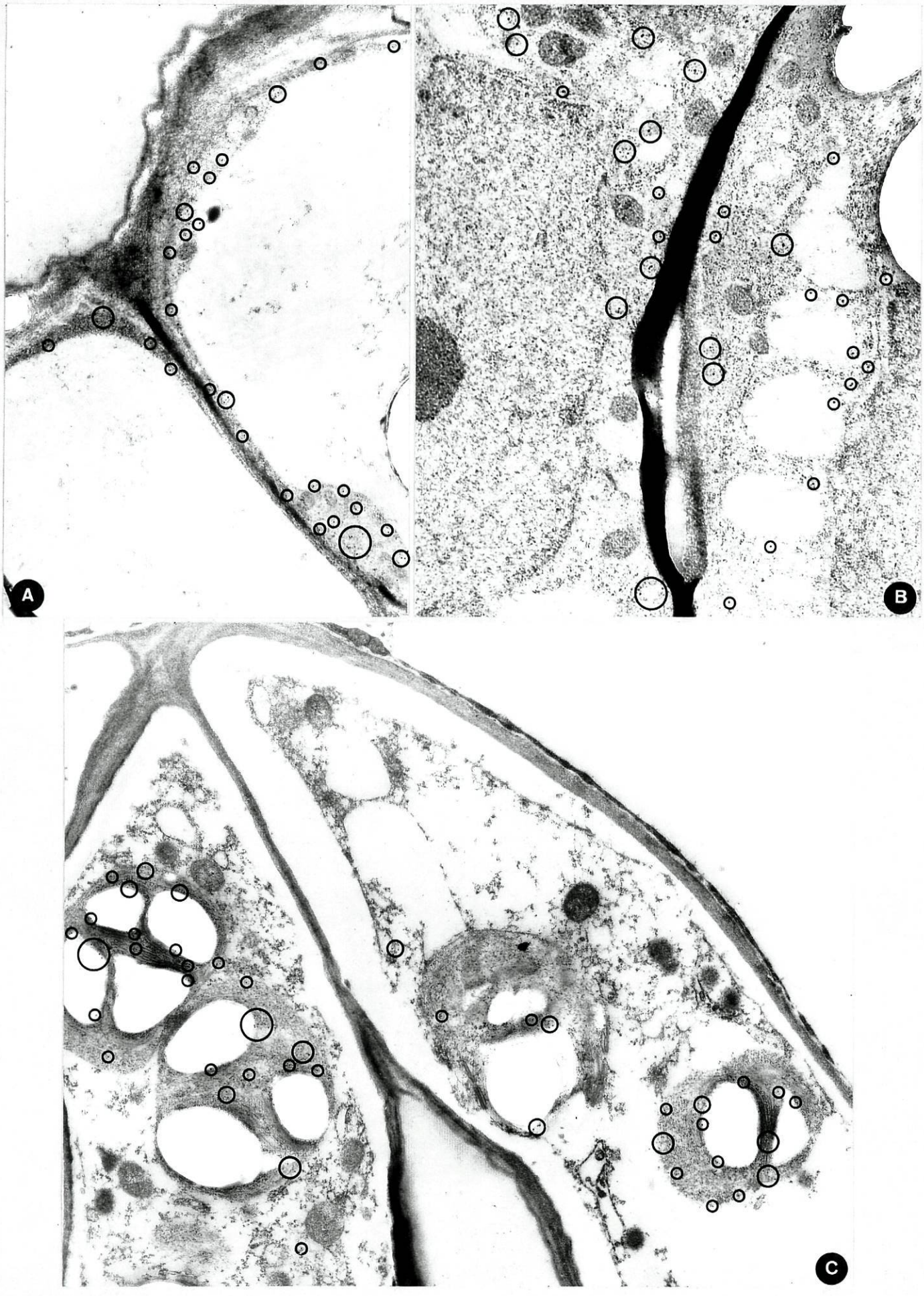


Fig. 35. Localização da GS em células do parênquima xilémico de folha de batateira (24 h de iluminação). A marcação localiza-se no plastídio, estando praticamente ausente no citoplasma. Algumas partículas de ouro podem ser observadas nos espessamentos secundários das paredes de xilema possivelmente devido a interacções de natureza iónica entre os anticorpos e aquelas estruturas. ES, espessamentos secundários; P, plastídio. x 14 600.

A glutamina sintetase encontrava-se presente em plastídios do parênquima xilémico tal como se pode observar na Fig. 35 (24 h de iluminação).

Nos espessamentos secundários das paredes do xilema podem observar-se partículas de ouro coloidal, que não são resultado de marcação inespecífica aleatória ou "ruído de fundo" mas que se ligam preferencialmente a esta estrutura. Esta marcação é detectável quer no material tratado com anticorpos primários, quer no material controlo pelo que é possível que corresponda a uma ligação inespecífica, possivelmente de natureza iónica, das IgG aos referidos espessamentos. Com a optimização de condições de incubação (presença de Tween no tampão de incubação e nas lavagens, lavagens mais frequentes e com agitação, etc.) esta marcação nas paredes do xilema tendia a ser mais reduzida, mas não completamente eliminada.

Fig. 36. Localização da GS em células oclusivas dos estomas ao fim de 4 h (A), 24 h (B) e 7 dias (C) de exposição à luz. Em A e B a marcação encontra-se dispersa no citoplasma das células oclusivas que se podem observar em corte transversal (A) e em corte paradermal. Também em corte paradermal observa-se a marcação mais circunscrita aos plastídios ao fim de 7 dias de iluminação (C). A, x 10 000; B, 15 500; C, 11 250.


A
B
C

Paralelamente foi feito um estudo da epiderme nos mesmos intervalos de tempo referidos anteriormente, tendo-se verificado que ao fim de 4 h a marcação surgia nas células oclusivas dos estomas, representadas em corte transversal na Fig. 36-A, estando as partículas de ouro localizadas essencialmente no citoplasma. Igualmente ao fim de 24 h as partículas de ouro localizavam-se no citoplasma e nos plastídios das células oclusivas que se podem observar em corte paradermal na Fig. 36-B. Ainda em corte paradermal das células oclusivas, observa-se que a marcação está mais circunscrita aos cloroplastos ao fim de 7 dias de exposição à luz (Fig. 36-C).

ISOFORMAS DA GS EM FOLHAS DE OUTRAS SOLANACEAE

Em face dos resultados obtidos com folhas de *Solanum tuberosum* em que se detectaram não só polipeptídeos da GS cloroplastidial (GS2) mas, também, da GS citosólica (GS1) e que por meio de imunocitoquímica ultraestrutural se observou uma localização diferencial destas duas isoformas da GS, encontrando-se a GS2 nos cloroplastos das células do mesófilo e a GS1 no citoplasma das células do floema, investigou-se a ocorrência destas isoformas em outras Solanaceae, nomeadamente tabaco (*Nicotiana tabacum*) e tomateiro (*Lycopersicon esculentum*).

Tabaco

Nas folhas de *Nicotiana tabacum* tinha sido descrita a existência de apenas a GS cloroplastidial (McNally et al, 1983).

No presente trabalho, a composição em isoformas da GS em folhas de tabaco, e a sua localização, foi investigada por técnicas imunológicas, utilizando os mesmos anticorpos anti GS1 de feijoeiro utilizados na localização de GS em folhas de batateira.

Extractos totais de proteínas solúveis de folha (incluindo a nervura central) e extractos de nervuras excisadas, foram separados por SDS-PAGE e electrotransferidos para nitrocelulose (Fig. 37). Os anticorpos reconheceram dois polipeptídeos da GS respectivamente de 44 e 39 kDa que foram considerados, por analogia com trabalhos anteriores, respectivamente subunidade cloroplastidial (GS2) e citosólica (GS1). O polipeptídeo da GS de 44 kDa era o predominante nos extractos da folha completa mas um polipeptídeo menor, de 39 kDa, era particularmente abundante nos extractos de nervura central sugerindo uma associação deste polipeptídeo com os tecidos vasculares.

Fig. 37. Detecção imunológica de peptídeos da GS em extractos de nervura (A) e folha inteira (B) de tabaco. Para cada amostra foi utilizada igual quantidade de proteína (20 μg).

A presença da GS em tecidos vasculares foi posteriormente investigada por técnicas de "tissue printing" e imunocitoquímica ultraestrutural. Em impressões de secção transversal de folha em nitrocelulose pode observar-se que a marcação estava particularmente localizada no floema, quer abaxial quer adaxial, embora em algumas imagens fosse predominante no floema adaxial (Fig. 38).

A nível ultraestrutural foi possível confirmar a presença de uma GS citosólica localizada em células do floema na nervura central. Uma marcação densa pode ser observada no citoplasma de células de companhia do floema, estando ausente em outras células de parênquima floémico e em elementos crivosos (Fig. 39-A).

A GS foi também localizada nos cloroplastos das células do mesófilo, não se detectando marcação no citosol ou em outros organelos nestas células (Fig. 39-B). Marcação para a GS foi também observada em plastídios do parênquima vascular. Nas secções controlo, em que se substituiu o anticorpo primário por soro não imune de coelho, a marcação era praticamente inexistente.

Tomateiro

Em folhas de tomateiro a GS apresentava uma distribuição idêntica à das outras Solanaceae estudadas. No mesófilo a GS localiza-se exclusivamente nos cloroplastos não se detectando marcação significativa no citosol destas células (Fig. 40-A). Nos tecidos vasculares a marcação para GS aparecia abundantemente no citosol de células do floema (Fig. 40-B).

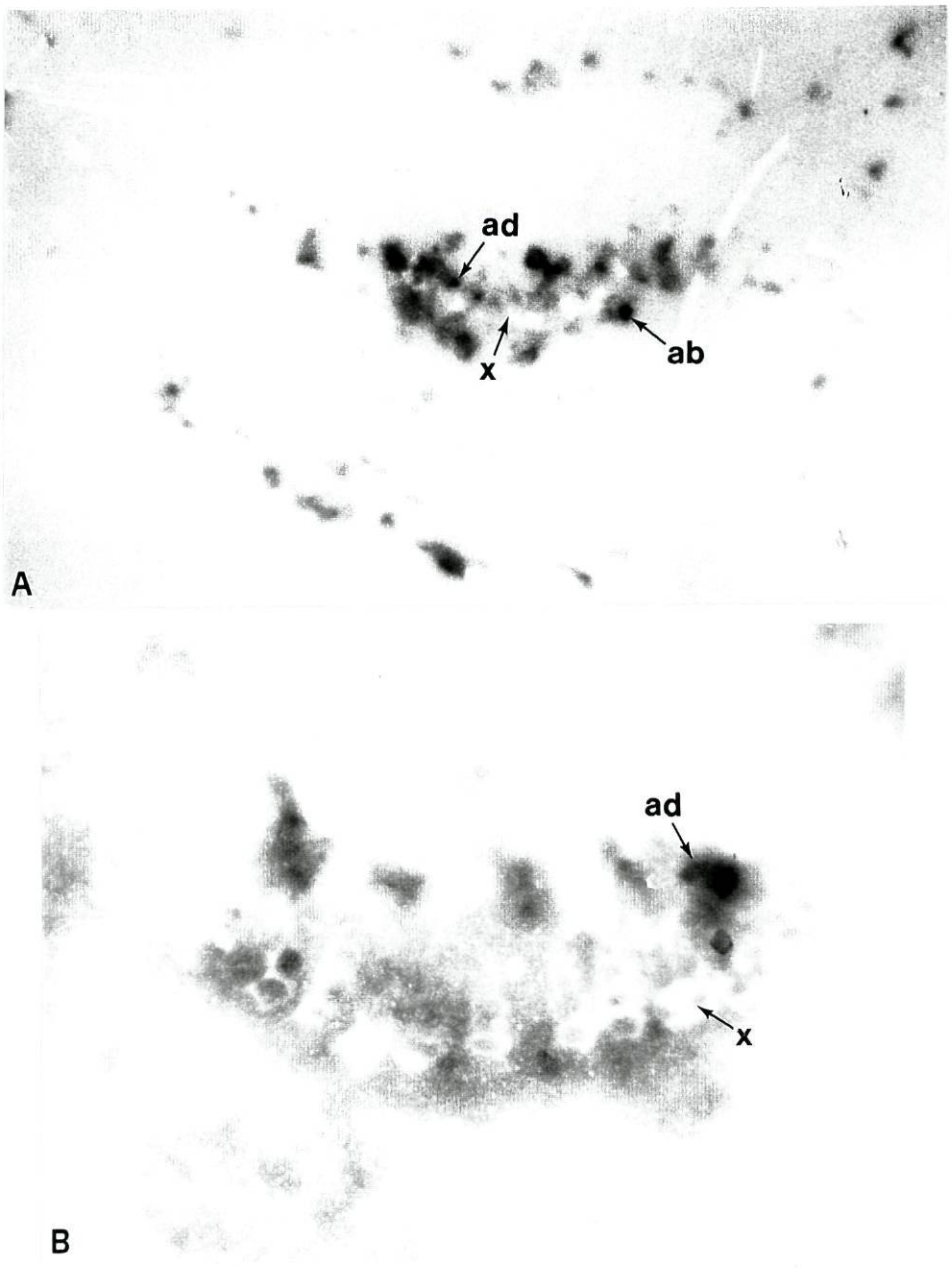


Fig. 38. Localização da GS em secções transversais da nervura central de folha de tabaco impressas em nitrocelulose. A, a marcação distribui-se na zona do floema adaxial (ad) e abaxial (ab) mas aparece particularmente intensa na zona do floema adaxial (ad) na imagem B, mais ampliada, onde são visíveis as células de xilema (x). A, x 84; B, x 200.

LOCALIZAÇÃO DA GS EM FOLHAS E TECIDO CALOSO DE UMA NÃO SOLANACEAE (GIRASSOL)

A não detecção da GS1 em folhas de Solanaceae em trabalhos anteriores poderia estar relacionada com o facto de, nestas plantas, a GS citosólica poder estar muito confinada aos tecidos vasculares ou mesmo ao floema adaxial. Deste modo, foi feito um estudo da localização da GS em folhas e tecido caloso de uma não-Solanacea (girassol) em que a presença de GS1 e GS2 nas folhas tinha sido detectada por cromatografia de troca iónica (Cabello et al, 1991).

No mesófilo, a GS encontrava-se igualmente circunscrita aos cloroplastos, não se observando marcação no citoplasma destas células (Fig. 41-A). Nos tecidos vasculares encontrava-se marcação muito dispersa em células de parênquima floémico, particularmente em veias secundárias, não se notando uma acumulação intensa de marcação nas células de companhia do floema nas nervuras centrais, como observado nas Solanaceae (Figs. 41-B e C). Nas plantas de girassol, a marcação parece, assim, mais dispersa pela folha, mas não foi feito um estudo sistemático da localização da GS em veias secundárias.

No tecido caloso, a GS apresentava-se no citoplasma de células vacuolizadas e também em plastídios, alguns com desenvolvimento apreciável do sistema membranoso. Em alguns casos, a marcação aparece em células que aparentam ser células de floema em diferenciação (Fig. 41-D).

INFLUÊNCIA DA CARÊNCIA DE AZOTO NA ACTIVIDADE E PADRÃO DAS ISOFORMAS DA GS EM FOLHAS DE BATATEIRA

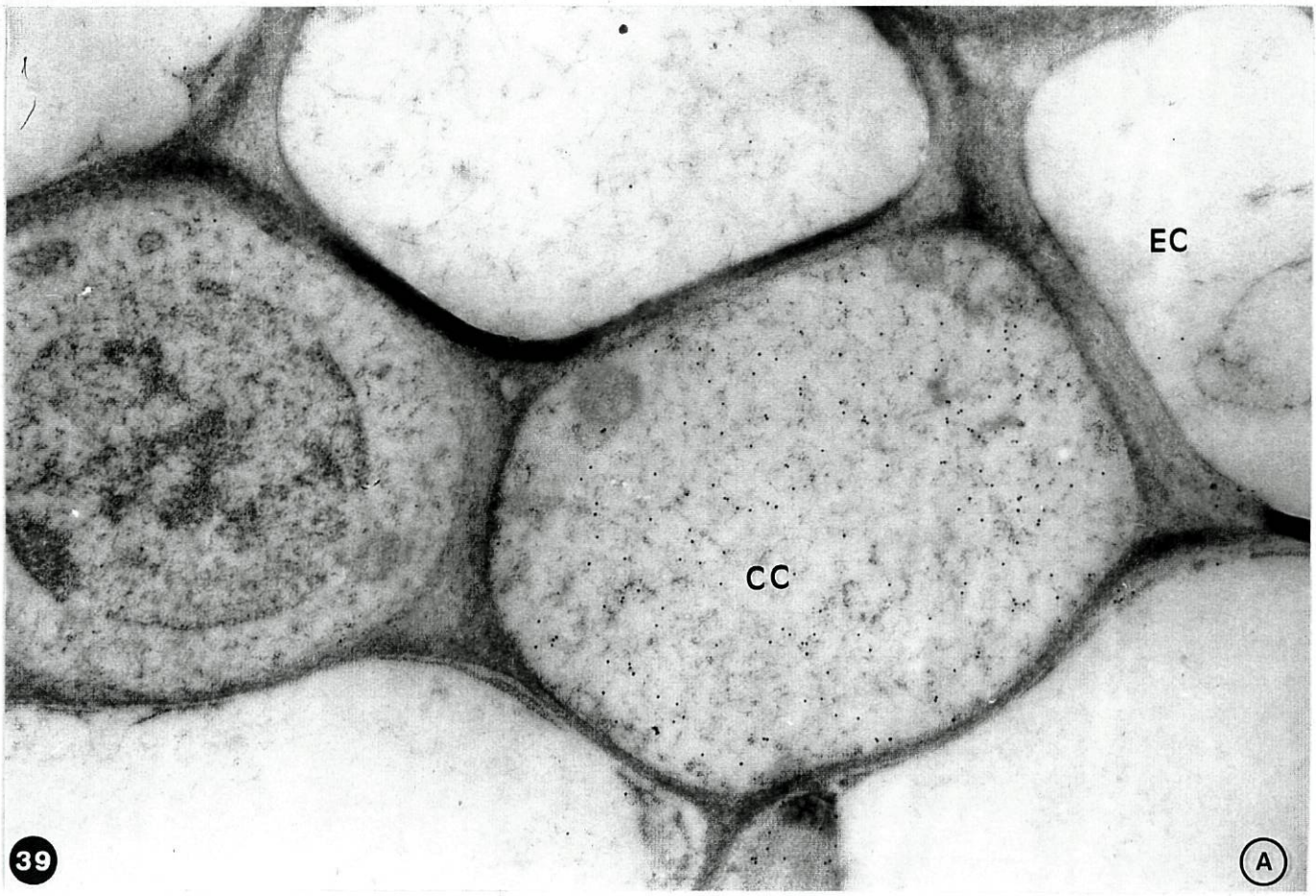
Os resultados anteriores demonstraram que nas folhas da batateira, assim como de outras Solanaceae, existe, além da GS cloroplastidial, uma GS citosólica localizada nas células de companhia do floema. A presença de uma GS citosólica em tecidos condutores, sugeria um papel relevante desta isoforma na mobilização de azoto para as zonas em crescimento. As condições que regulam a expressão da GS citosólica têm sido pouco abordadas, principalmente em não leguminosas, e não são conhecidas as condições que regulam a expressão da forma da GS presente nos tecidos vasculares.

Na literatura tinha sido descrito um aumento da GS1 em situações de senescência (Kawakami e Watanabe, 1988) mas não foi feita a localização desta isoforma.

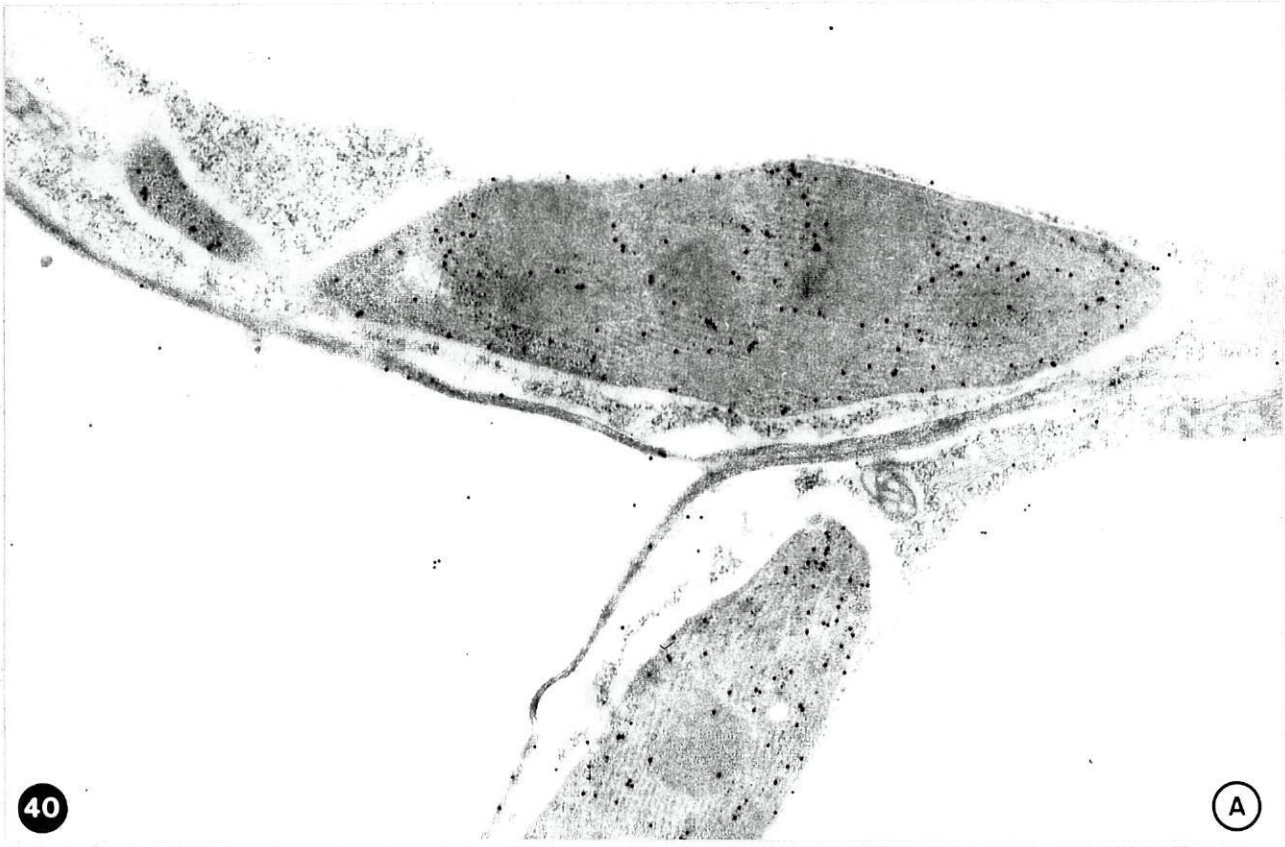
Fig. 39. Localização da GS em folha de tabaco. A, no floema a marcação localiza-se especificamente nas células de companhia (CC) não se observando partículas de ouro no elemento de tubo crivoso (EC) e em outras células do parênquima floémico. B, nas células do mesófilo a marcação aparece confinada aos cloroplastos. A x 21 000; B x 22 400.

Fig. 40. Localização da GS em folha de tomateiro. Uma grande densidade de partículas de ouro está confinada aos cloroplastos no mesófilo (A) e está dispersa no citoplasma de células de floema (B). M, mitocôndrias. A, x 25 000; B, x 40 000.

Fig. 41. Localização da GS em folhas (A-C) e tecido caloso (D) de girassol. No mesófilo (A) a marcação pelo ouro coloidal encontra-se no estroma cloroplastidial. No floema não se verifica uma acumulação de marcação no citoplasma de células de companhia (B) encontrando-se partículas de ouro dispersas em células de parênquima floémico nas veias secundárias (C). Em D pode observar-se marcação no citoplasma de uma célula de floema de tecido caloso. A, x 18 500; B, x 25 500; C, x 17 000. D, x 14 400.

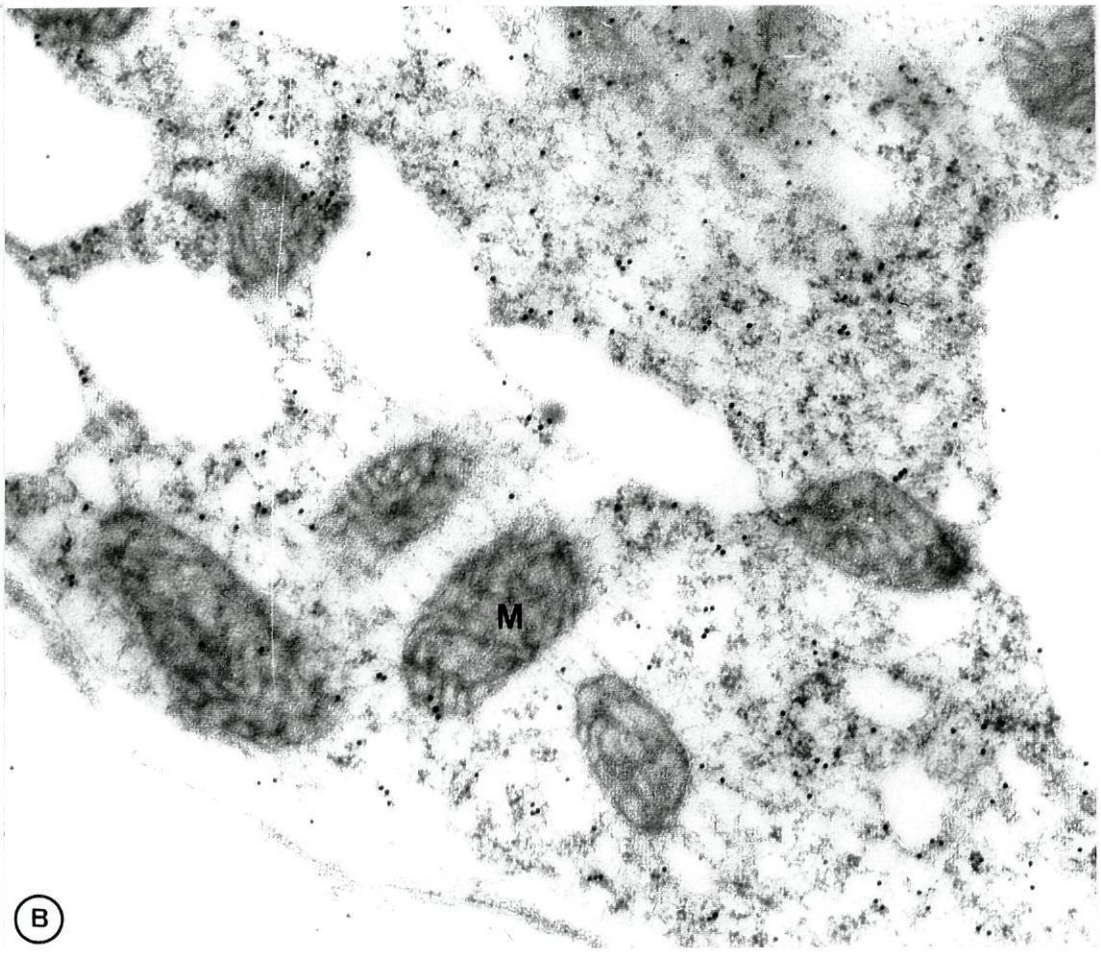

EC
CC
39
A

B

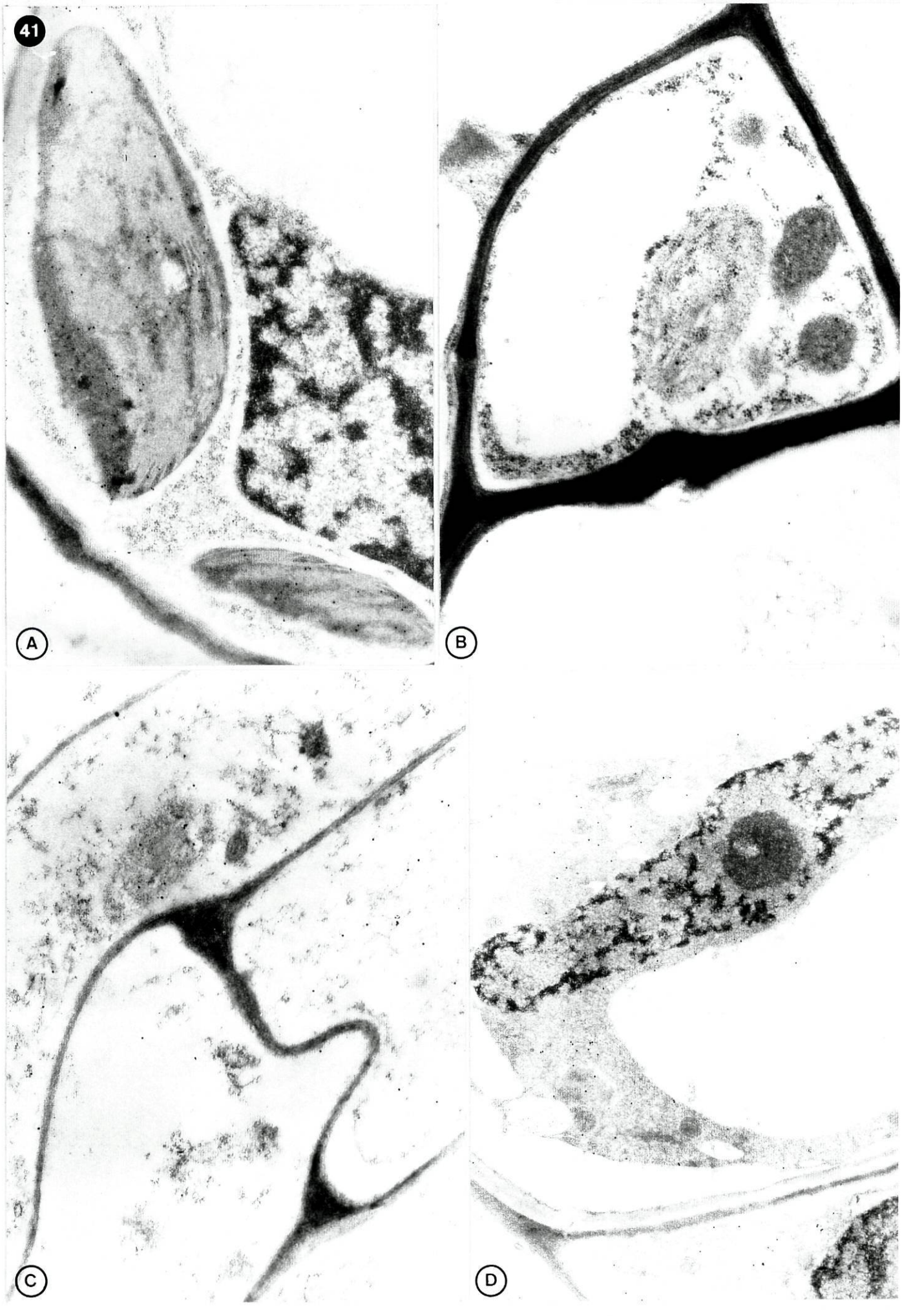


40

A



B


41
A
B
C
D

Na abordagem daquele problema, estudou-se o padrão de polipeptídeos da GS e a actividade da GS em plantas submetidas a carência de azoto (-N) em comparação com as plantas controlo (N). As plantas controlo (N) foram regadas com solução de Hoagland e as plantas submetidas a carência de azoto foram regadas com uma solução de Hoagland modificada de modo a omitir os iões $NO3^-$ e $NH4^+$. As análises foram efectuadas ao fim de 4 semanas após a colocação dos tubérculos nas semeadeiras.

Sabendo que o azoto é remobilizado das folhas maduras para as mais jovens, as alterações no padrão de expressão da GS foram também estudadas em folhas de diferentes idades nos dois lotes de plantas. Paralelamente foram estudadas as alterações no teor total de proteínas solúveis e no padrão de proteínas solúveis separadas por SDS-PAGE. Com o objectivo de relacionar as alterações bioquímicas verificadas com o tipo de tecidos/células em que ocorriam, foi feita, também, uma análise por imunocitoquímica ultraestrutural de folhas dos dois lotes (-N e N).

Actividade da GS

Nos dois lotes de plantas foram colhidas amostras das 2ªs, 5ªs e 7ªs folhas a contar do ápice.

Por comodidade representam-se nas figuras por ordem de emergência da mais antiga (nº 1) para a mais jovem (nª 3).

A folha mais antiga (nº1) do lote -N estava num estado avançado de senescência com clorose acentuada e destacando-se com muita facilidade da planta.

A actividade global da GS, expressa por unidade de peso fresco e de tempo, no lote submetido a carência de azoto (-N) era inferior ao controlo (N) nas folhas mais maduras mas esta diferença anulava-se em folhas muito jovens (folhas nº 3 dos dois lotes), que apresentavam actividades de GS equivalentes (Fig. 42). No lote -N, as folhas mais antigas (nº 1) mostravam um grau muito elevado de senescência, não tendo a actividade da GS expressão.

Quer no lote controlo (N), quer no lote submetido a carência de azoto (-N), a actividade total da GS era maior nas folhas mais maduras, diminuindo para as mais jovens (Fig. 42).

Proteínas solúveis

O teor em proteínas solúveis, expresso por unidade de peso fresco, era superior nas folhas mais jovens de ambos os lotes, diminuindo nas folhas mais antigas (Fig. 43). As diferenças entre os lotes verificavam-se nas folhas maduras, em que o teor proteico era inferior no lote -N. Tal como acontecia com a actividade da GS, não existiam diferenças significativas nas proteínas solúveis nas folhas mais jovens de ambos os tratamentos.

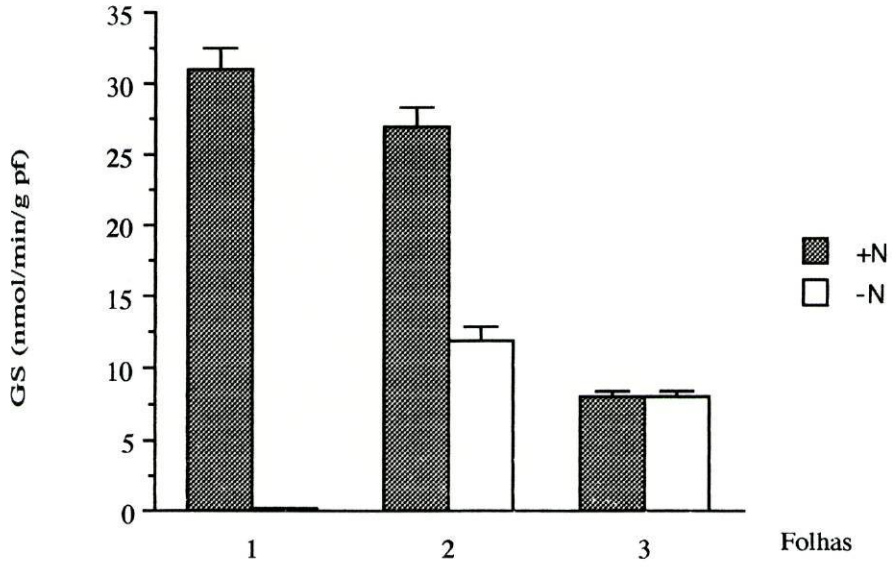


Fig. 42. Actividade total da GS em extractos de folhas de batateira em diferentes graus de desenvolvimento, (1, 2 e 3 por ordem de emergência) de plantas controlo (+N) e de plantas submetidas a carência de azoto (-N). A actividade da GS está expressa em nmoles de γ-glutamil-hidroxamato por minuto por grama de peso fresco.

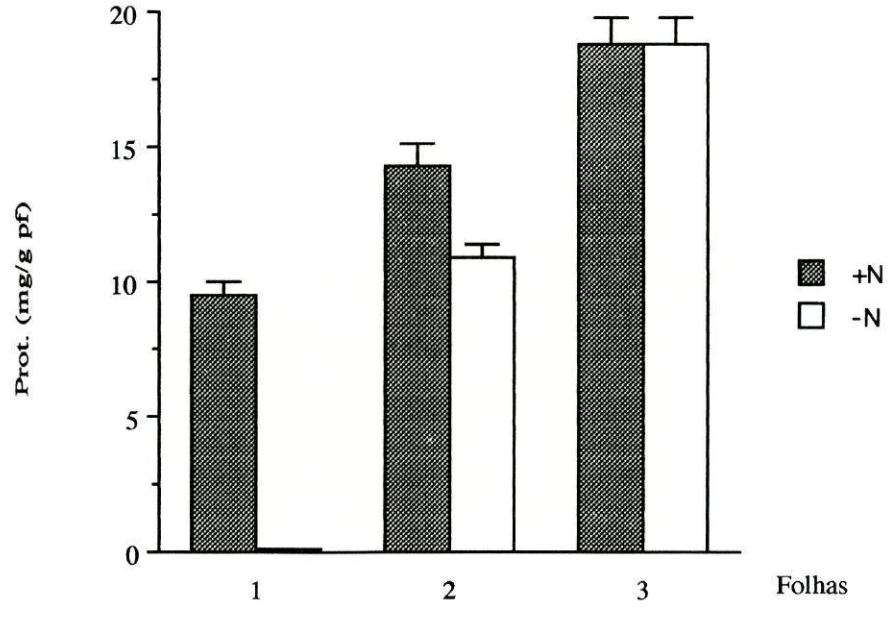


Fig. 43. Proteínas solúveis em extractos de folhas de batateira em diferentes graus de desenvolvimento, (1, 2 e 3 por ordem de emergência) de plantas controlo (+N) e de plantas submetidas a carência de azoto (-N). O teor proteico está expresso em mg de proteína por grama de peso fresco.

Análise das subunidades da GS

Uma vez que era difícil separar as duas actividades por cromatografia de troca iónica convencional ou por electroforese em gel nativo, estudou-se as alterações na quantidade relativa dos polipeptídeos das duas isoformas por imunodetecção, numa abordagem já usada por outros autores (Kawakami e Watanabe, 1988).

Proteínas solúveis de extractos totais de folhas em diferentes graus de desenvolvimento de plantas controlo (+N) e plantas -N foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para nitrocelulose após o que se procedeu à detecção dos polipeptídeos da GS com anticorpos anti-GS. Foram feitos ensaios em que se usou a mesma quantidade de proteína para cada amostra, mas uma vez que as proteínas solúveis totais também decrescem com o tratamento -N, em outras electroforeses utilizou-se também o volume correspondente à mesma quantidade de tecido e portanto ao mesmo peso fresco. Este modo de expressão (relativo ao peso fresco), quer da actividade da GS quer da abundância de polipeptídeos, também tido sido utilizado por outros autores (Kamachi et al, 1991; Kamachi et al, 1992a; Pérez-Rodríguez e Valpuesta, 1996; Schoerring et al, 1993; Yamaya et al, 1992).

Utilizando como base a mesma quantidade de peso fresco, a análise por "Western blot" das alterações no padrão das subunidades da GS cloroplastidial e citosólica revelaram que a carência de azoto teve um efeito diferencial nas duas isoformas. O tratamento não afectou do mesmo modo a GS cloroplastidial e a GS citosólica, como se pode ver na (Fig. 44-A) em que há uma predominância da GS cloroplastidial nas folhas mais jovens em ambos os lotes, mas este padrão vai-se invertendo nas folhas mais antigas. Esta inversão é mais rápida no lote -N. No lote -N é patente que as condições de tratamento afectam negativamente a GS cloroplastidial cuja banda aparece mais ténue em relação ao controlo. A banda correspondente à subunidade citosólica não sofre este efeito, mantendo-se praticamente constante. A folha mais antiga (nº 1), aparece com ambas as bandas mais ténues, possivelmente por estar num estado mais avançado de senescência. A proporção relativa da GS1 em relação à GS2 em todas as folhas é maior no lote -N do que no controlo. Assim, verificou-se que os polipeptídeos da GS1 e da GS2 respondiam de modo diferente à idade da folha e à situação de carência de azoto.

Para esclarecer melhor o efeito da carência de N sobre a forma citosólica da GS e dado que a literatura refere quer uma constância ao longo da senescência, quer um aumento, conforme a base em que é expressa (Kawakami e Watanabe, 1988) procedeu-se a outra experiência em que as plantas foram submetidas durante mais tempo a carência de azoto. Folhas com o mesmo grau de desenvolvimento foram retiradas de um planta mantida em condições normais de nutrição azotada e a outra submetida a carência de azoto; a folha desta planta evidenciava já sinais de senescência. Volumes de extracto correspondentes ao mesmo peso fresco foram utilizados para separação electroforética das proteínas. Na Fig. 44-B pode ver-se que a inversão de padrão de bandas é muito nítida e que esta alteração se deve não só a uma diminuição da GS cloroplastidial mas a um incremento da GS1 que seria provavelmente aumentado se fosse utilizada a mesma quantidade de proteína na electroforese de ambas as amostras.

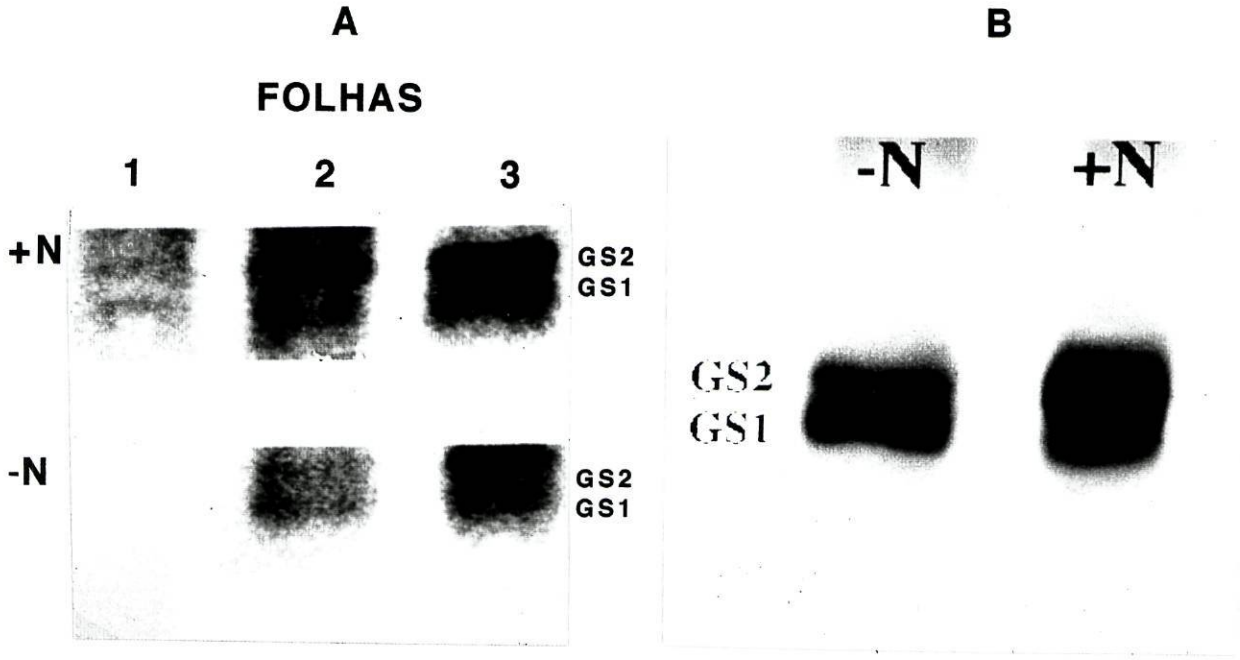


Fig. 44. A. Análise dos padrões de isoformas da GS em folhas de batateira em diferentes graus de desenvolvimento, (1, 2 e 3 por ordem de emergência) de plantas controlo (+N) e de plantas submetidas a carência de azoto (-N). As folhas mais velhas (nº1) do lote -N estavam demasiado senescentes para ser analisadas. B. Padrões de isoformas da GS em duas folhas com o mesmo grau de desenvolvimento, provenientes de outra experiência com plantas submetidas a carência de azoto (-N) e o respectivo controlo (+N). As proteínas solúveis presentes em extractos totais de folha foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para nitrocelulose onde foram detectadas com anticorpos anti-GS. Foram utilizados volumes de extracto correspondentes a igual peso fresco das amostras.

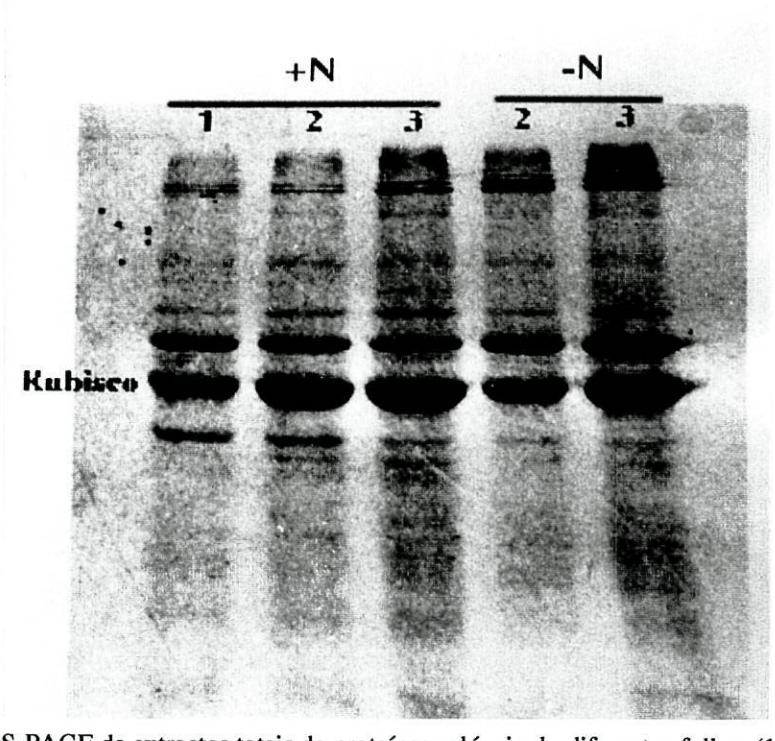


Fig. 45. SDS-PAGE de extractos totais de proteínas solúveis de diferentes folhas (1, 2 e 3) de material controlo (+N) e em carência de azoto (-N). Foram utilizados volumes de extracto correspondentes a igual peso fresco das amostras. As proteínas no gel foram visualizadas com azul de Coomassie. A banda correspondente à subunidade maior da RuBisCO (56 kDa) é evidente na imagem.

Análise por SDS-PAGE de polipeptídeos solúveis e RuBisCO

Paralelamente, realizou-se a análise dos polipeptídeos solúveis dos extractos foliares por SDS-PAGE seguido de coloração por azul de Coomassie (Fig. 45). A subunidade maior da RuBisCO, de 55k Da é facilmente identificada na imagem. O nível de RuBisCO é um dos marcadores associados ao cloroplasto funcional, sendo usado no diagnóstico do estado do cloroplasto. Na figura pode ver-se que o nível de RuBisCO variava com a idade da folha, diminuindo nas folhas mais velhas. A RuBisCO era também afectada negativamente pela carência de azoto sendo a diferença entre os dois lotes particularmente evidente em folhas maduras (nº 2), não se verificando diferença apreciável nas folhas mais jovens (nº 3) em ambos os tratamentos.

Assim, em condições normais, uma folha verde a fotossintetizar, apresenta uma preponderância muito elevada da GS cloroplastidial. A GS citosólica ganha preponderância nas folhas mais velhas. A carência de azoto, além de afectar negativamente a GS cloroplastidial, parece não afectar ou mesmo levar a um aumento da expressão da forma citosólica.

Imunocitoquímica

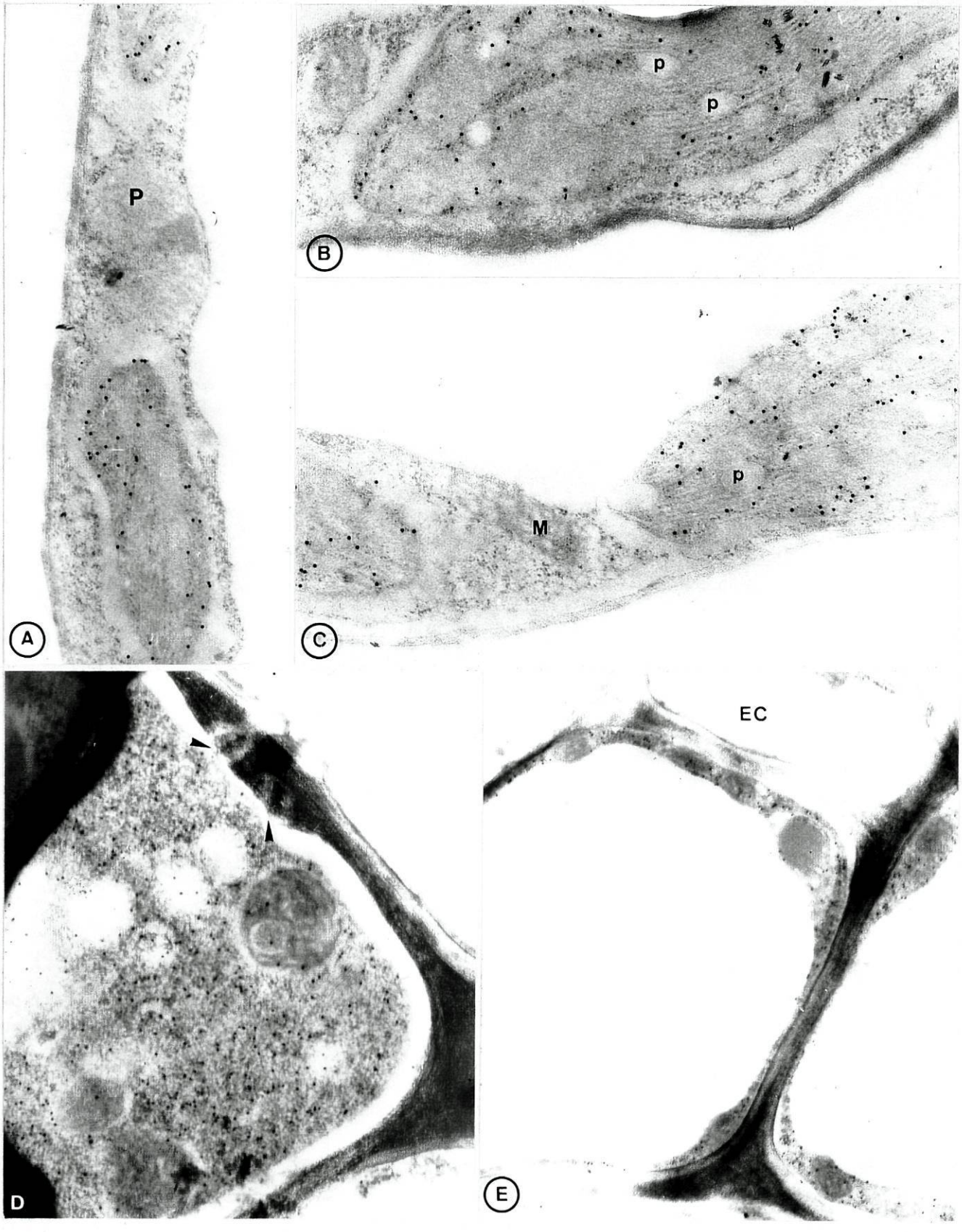
Procedeu-se a análise por imunocitoquímica das folhas dos dois lotes de plantas (+N e -N), a fim de investigar se ocorriam alterações na expressão a nível celular da GS, que se pudessem correlacionar com as alterações bioquímicas verificadas.

No lote -N o padrão de marcação parece ser semelhante ao padrão de distribuição da GS observado em folhas crescidas em condições normais de nutrição azotada.

No mesófilo a marcação para a GS encontra-se especificamente nos cloroplastos. Estes apresentam sintomas típicos (Bould et al, 1983) de carência de azoto tal como acumulação de amido e abundância de plastoglóbulos, mas a marcação para a GS é ainda bastante abundante nestes organelos (Fig. 46 A-C). Não ocorre marcação no citoplasma destas células. Cloroplastos do parênquima floémico também se encontravam marcados.

Na nervura central, a marcação apresentava-se no citoplasma de células do floema, possivelmente nas células de companhia, de um modo específico, não se encontrando em outras células de parênquima floémico. Na Fig. 46-D pode ver-se uma célula com aspecto típico de célula de companhia, com citoplasma muito denso, comunicando com o elemento crivoso por plasmodésmios ramificados do lado da célula de companhia. Contudo, na maior parte das vezes, as células marcadas são muito vacuolizadas, com o citoplasma reduzido a uma estreita faixa adjacente à parede e onde são visíveis algumas mitocôndrias (Fig. 46-E).

Fig. 46. Imunomarcação da GS em folhas de plantas submetidas a carência de azoto. No mesófilo (A-C) a marcação localiza-se nos cloroplastos, que apresentam numerosos plastoglóbulos (p), não se observando partículas de ouro no citosol, paredes celulares, peroxissomas (P) e mitocôndrias (M). No floema (D-E) pode observar-se uma elevada densidade de marcação no citoplasma das células de companhia, algumas das quais se apresentam bastante vacuolizadas (E). EC, elemento de tubo crivoso; pontas de seta, plasmodésmios ramificados do lado da célula de companhia. A, x 22 000. B, x 29 000; C, x 26 500; D, x 33 125; E, x 18 000.


P
A
p
p
B
M
p
C
D
EC
E

ESTUDO DA GS EM ÓRGÃOS NÃO VERDES DE BATATEIRA

Detecção de polipeptídeos da GS em extractos de órgãos não verdes

Proteínas solúveis totais foram extraídas de raízes, brolhos e tubérculos, separadas por SDS-PAGE (20 μg de proteína por amostra) e transferidas para nitrocelulose, onde se procedeu à imunodetecção de polipeptídeos da GS (Fig. 47).

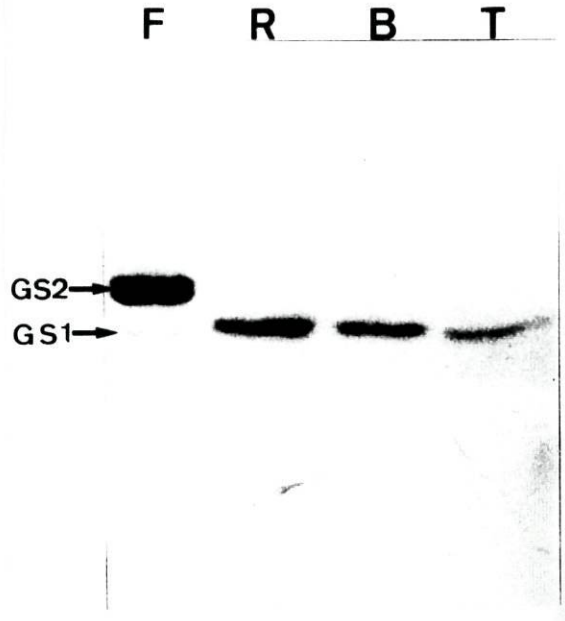


Fig. 47. Análise dos polipeptídeos da GS em raiz (R), brolhos (B) e tubérculos (T) de batateira. Em F pode observar-se, para comparação, o padrão de polipeptídeos da GS em folha. As proteínas solúveis presentes em extractos totais foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para nitrocelulose, que foi incubada com anticorpos anti-GS. Para visualização das bandas utilizou-se anticorpo secundário conjugado com peroxidase.

Em extractos de raízes, brolhos e tubérculos foi possível detectar uma só banda de cerca de 42 kDa, possivelmente correspondente a uma subunidade citosólica da GS. Na figura está também representado o padrão de subunidades de GS em folha, para comparação. Enquanto a banda correspondente à GS1 é dificilmente detectável em extractos de folha, já aparece com bastante intensidade nos órgãos não verdes, particularmente nas raízes.

Alterações da GS em tubérculos durante o abrolhamento e desenvolvimento da planta

Com fornecimento de solução nutritiva

Nesta experiência foram utilizados tubérculos mantidos aproximadamente a 4-8°C até serem utilizados.

Tubérculos a abrolhar naturalmente, com brolhos de aproximadamente 0,5 cm foram colocados em vermiculite dando origem ao desenvolvimento de plantas que foram regadas com solução de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950). Os tubérculos foram plantados em alturas

diferentes de modo a que as análises fossem efectuadas simultaneamente em tubérculos com diferentes tempos após a plantação.

Efectuou-se o estudo da actividade da GS em tubérculos em início de abrolhamento, antes da plantação, e em tubérculos que deram origem a plantas em diferentes períodos após a plantação. Paralelamente determinou-se nos mesmos tubérculos o teor em proteínas solúveis pelo método de Bradford. A utilização do azul de Coomassie é um dos métodos recomendados para quantificação de proteína solúvel ou "verdadeira" proteína incluindo albumina e globulina (Desborough, 1985).

Assim, uma actividade elevada foi detectada no tubérculo em início de abrolhamento, verificando-se ainda um aumento da actividade da GS, uma semana após a plantação e depois um decréscimo acentuado até às 4 semanas após a plantação; a actividade da GS não tinha já expressão no tubérculo 8 semanas após a plantação (Fig. 48).

O teor em proteína solúvel era também mais elevado no tubérculo em início de abrolhamento e apresentava um decréscimo pouco acentuado uma semana após a plantação, diminuindo sucessivamente nos tubérculos com mais tempo após a plantação (Fig. 49).

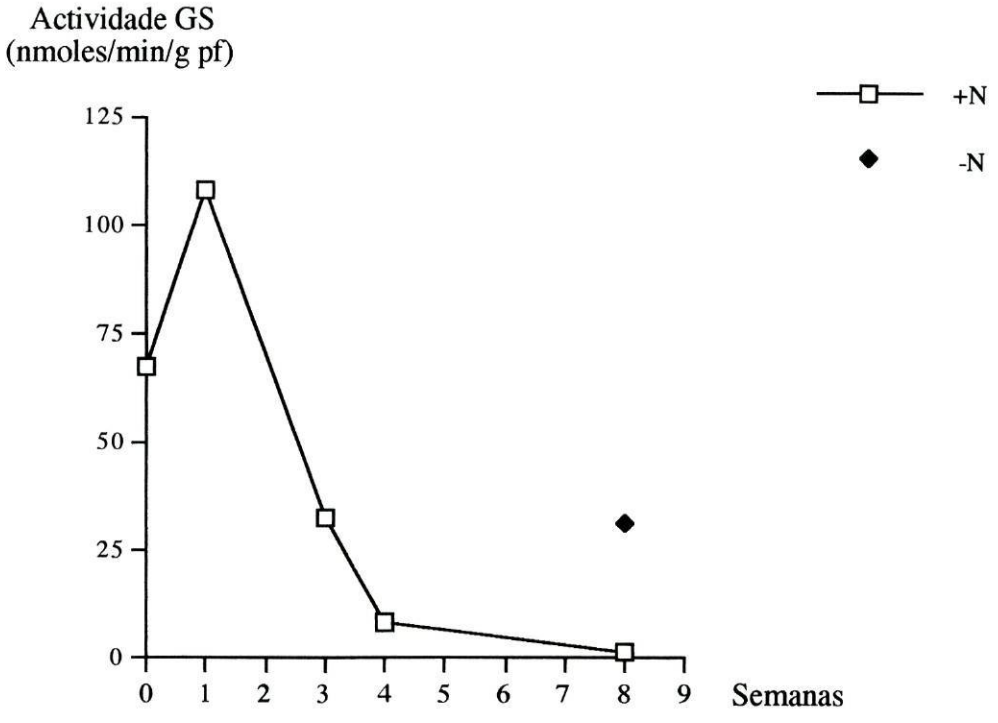


Fig. 48. Actividade total da GS em tubérculos em início de abrolhamento, antes da plantação (0 semanas) e em tubérculos que deram origem a plantas em diferentes períodos de tempo após a plantação. A actividade da GS está expressa em nmoles de γ-glutamil-hidroxamato por minuto por grama de peso fresco. Quadrados abertos - tubérculos regados com solução nutritiva após a plantação. Losango a cheio - tubérculos aos quais não foi fornecida solução nutritiva após a plantação.

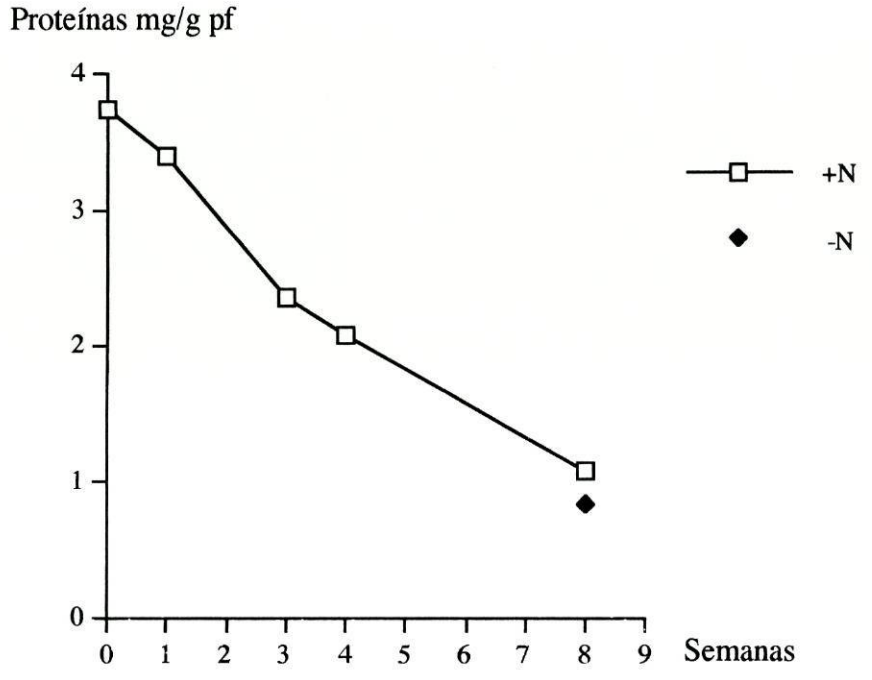


Fig. 49. Proteínas solúveis em extractos de tubérculos em início de abrolhamento, antes da plantação (0 semanas) e de tubérculos que deram origem a plantas em diferentes períodos de tempo após a plantação. O teor proteico está expresso em mg de proteína por grama de peso fresco. Quadrados abertos - tubérculos regados com solução nutritiva após a plantação. Losango a cheio - tubérculos aos quais não foi fornecida solução nutritiva após a plantação.

Paralelamente, extractos de alguns tubérculos foram utilizados para i) análise do padrão total dos polipeptídeos solúveis e ii) detecção dos polipeptídeos da GS após transferência para nitrocelulose. As análises foram efectuadas no tubérculo a abrolhar antes de ser colocado em vermiculite (nº 1) e nos tubérculos que deram origem a plantas, respectivamente 3 semanas (nº 2) e 8 semanas (nº 3) após a plantação.

Extractos dos tubérculos referidos foram submetidos a SDS-PAGE, tendo sido utilizado, de cada amostra, o volume correspondente ao mesmo peso fresco. Após transferência para nitrocelulose e incubação com anticorpos anti-GS, verificou-se que a intensidade de polipeptídeos da GS detectados apresentava um paralelismo com a actividade da GS observada nos mesmos tubérculos: a banda correspondente à GS era mais intensa no tubérculo em início de abrolhamento (Fig. 50); a intensidade era ligeiramente menor 3 semanas após plantação e desenvolvimento de uma planta a quem era fornecida exogenamente solução nutritiva completa; a banda era muito pouco intensa 8 semanas após plantação e desenvolvimento de uma planta também regada com solução nutritiva completa.

Um duplicado do gel utilizado para transferência foi usado para analisar o padrão total de polipeptídeos solúveis nos mesmos extractos. Estes foram separados por SDS-PAGE e corados por Azul de Coomassie. O volume de extracto utilizado corresponde a igual peso fresco de cada amostra.

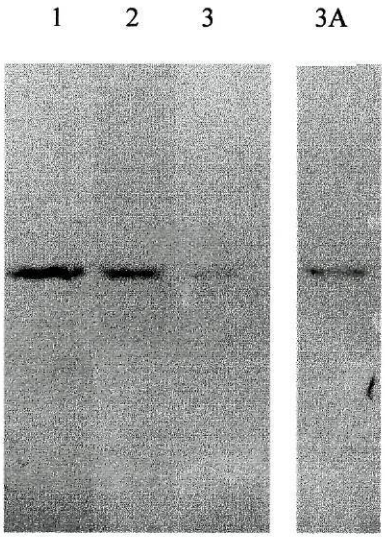


Fig. 50. Variação nos níveis de polipeptídeos da GS em tubérculos a abrolhar antes da plantação (1), 3 semanas após a plantação (2) e 8 semanas após a plantação (3), com fornecimento de solução nutritiva; 3A, tubérculo 8 semanas após a plantação, sem fornecimento de solução nutritiva. Extractos de tubérculos foram submetidos a SDS-PAGE, tendo sido utilizados volumes de extracto correspondentes a igual peso fresco de amostra. Os polipeptídeos da GS foram detectados na nitrocelulose com anticorpos anti-GS, conforme anteriormente descrito.

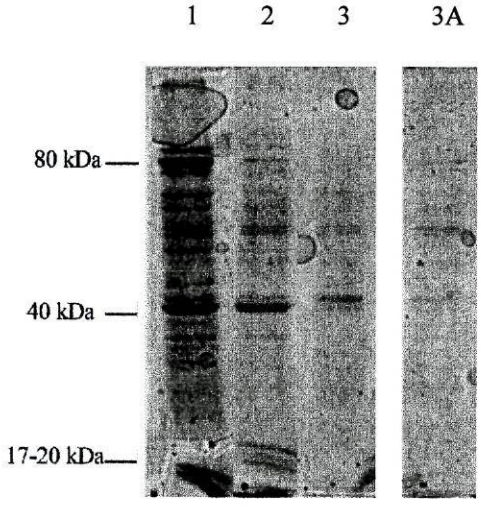


Fig. 51. Padrão total de polipetídeos solúveis em extractos das amostras referidas na figura anterior, separados por SDS-PAGE e corados com azul de Coomassie. 1, tubérculos a abrolhar antes da plantação; 2 e 3, tubérculos respectivamente 3 semanas após a plantação (2) e 8 semanas após a plantação (3), com fornecimento de solução nutritiva; 3A, tubérculo 8 semanas após a plantação, sem fornecimento de solução nutritiva.

O padrão de polipeptídeos no tubérculo a abrolhar é semelhante ao padrão descrito para tubérculos maduros (Desborough, 1985) apresentando uma concentração de bandas entre 35 e 40 kDa, entre 17 e 20 kDa e também cerca de 80 kDa (Fig. 51). A banda mais intensa, de aproximadamente 40 kDa corresponde possivelmente a uma subunidade da patatina que é a proteína de reserva predominante em tubérculos maduros, podendo representar 40% da proteína solúvel em tubérculos maduros.

Verificaram-se várias alterações qualitativas e quantitativas no padrão de polipeptídeos nos tubérculos que deram origem a plantas e que provavelmente acompanham o processo de senescência dos tubérculos. No geral, a intensidade das bandas diminuiu, e o número de bandas também parece diminuir, o que está de acordo com o teor observado de proteínas solúveis. A banda de 80 kDa tornou-se menos intensa mas a banda de cerca de 40 kDa, possivelmente correspondente à patatina, mantinha aparentemente a mesma intensidade relativa em tubérculos 3 semanas após a plantação; 8 semanas após a plantação a intensidade desta banda era já muito fraca. As bandas de 17-20 kDa também já não eram visíveis (Fig. 51).

A tendência da variação da actividade da GS e do teor em proteínas solúveis manteve-se em vários ensaios.

Sem fornecimento de solução nutritiva

Um dos tubérculos nas mesmas circunstâncias iniciais dos descritos anteriormente, foi colocado em vermiculite mas as regas foram efectuadas apenas com água, não havendo portanto fornecimento exógeno de nutrientes. Ao fim de 8 semanas foram feitas análises paralelas às descritas anteriormente para os outros tubérculos: i) actividade da GS (Fig. 48); ii) teor em proteínas solúveis (Fig. 49); iii) detecção de polipeptídeos da GS (Fig. 50) e iv) análise dos polipeptídeos solúveis totais por SDS-PAGE (Fig. 51). A comparação destes resultados com a amostra nº 3 proveniente de um tubérculo com o mesmo tempo após a plantação, mas a quem foi fornecida solução nutritiva exogenamente revela que:

i. o teor em proteínas solúveis era inferior

ii. a intensidade das bandas no gel de SDS corado com Coomassie era bastante inferior

Contudo:

iii. a actividade da GS nos extractos era superior

iv. a intensidade da banda corresponde ao polipeptídeo da GS era também superior em "Western blots"

• Assim, a GS mostra-se bastante activa em tubérculos no início do abrolhamento apresentando um aumento de actividade no "arranque" inicial após a plantação, mas vai perdendo expressão em tubérculos que deram origem a plantas às quais foi fornecida exogenamente solução nutritiva.

• Contudo, em tubérculos que deram origem a plantas às quais não foi fornecida solução nutritiva, a GS mantem-se activa por mais tempo e a proteína da GS também é detectada com maior intensidade, embora o tubérculo estivesse mais senescente, com menor teor de proteínas de reserva presente.

Localização da GS nos tecidos de tubérculo e brolho

A GS foi localizada imunologicamente em impressões de tecido em nitrocelulose. Com este método foi possível observar a distribuição da GS em grandes áreas de tecido mas também permitiu verificar a sua localização em grupos restritos de células com um grau razoável de resolução.

Na Fig. 52 está representada a secção longitudinal de um tubérculo jovem, em desenvolvimento, podendo observar-se a marcação na zona vascular próximo do hilo ou região proximal do tubérculo que é a zona de ligação ao rizoma. A periferia do tubérculo também se encontra marcada.

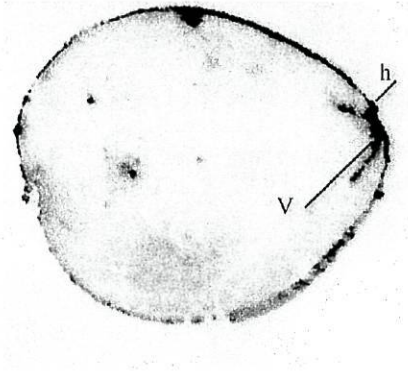
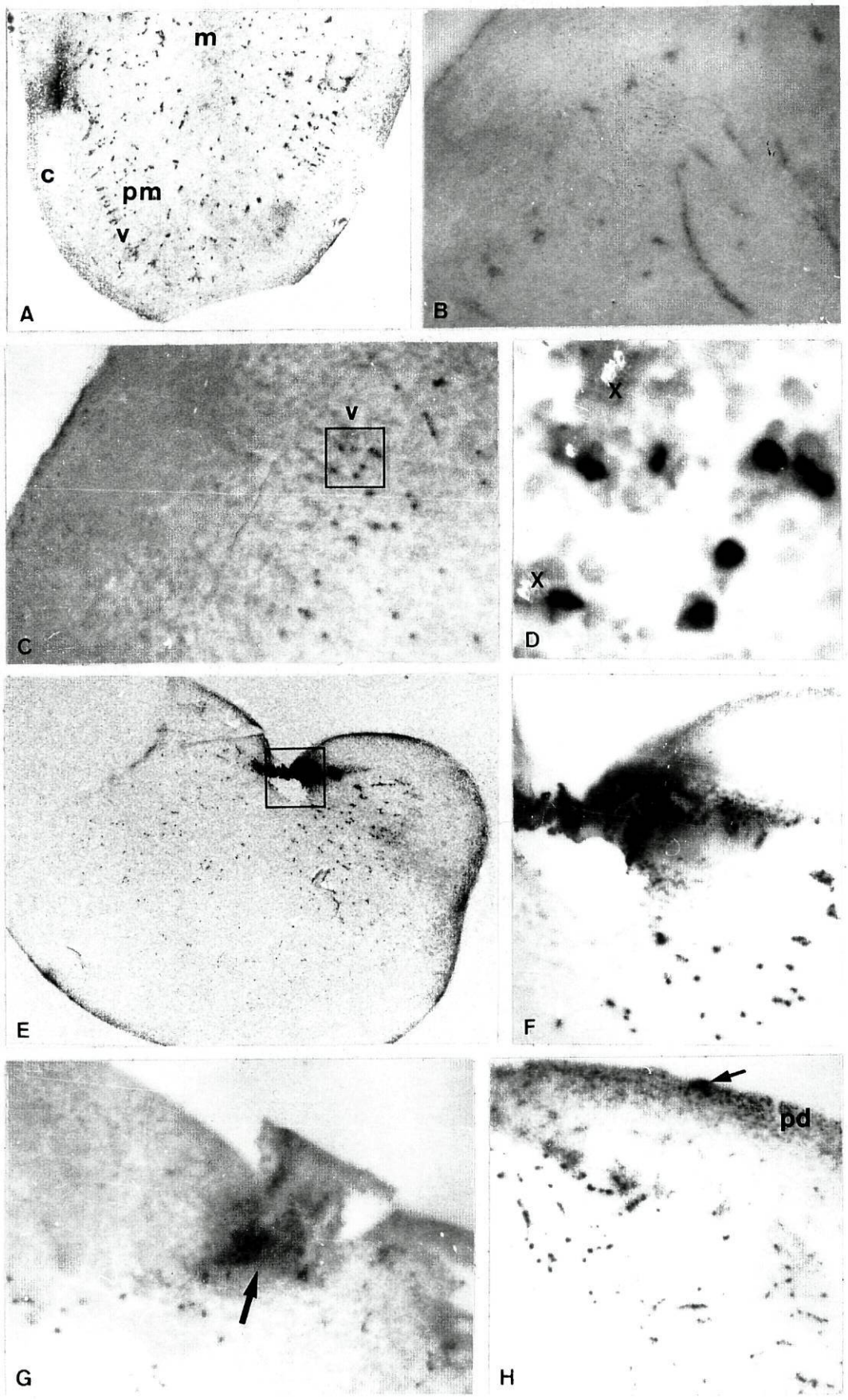


Fig. 52. Localização da GS em secção longitudinal de tubérculo em desenvolvimento por impressão de tecidos em nitrocelulose. A marcação está localizada na zona vascular (V) próxima do hilo (h) e à periferia do tubérculo. x 2,7.

Em secções transversais de tubérculos maduros (Fig. 53) a marcação apresenta um localização precisa e bem definida circunscrita a grupos de células, por vezes em fiadas, dispersos na zona perimedular, interna ao anel vascular. Este padrão de distribuição corresponde à localização do floema interno nos tecidos do tubérculo. O floema interno ocupa uma extensa área nos tecidos do tubérculo, consistindo em grupos de células de floema que se localizam no parênquima da região perimedular, podendo ocorrer ramificações e anastomose entre eles (Cutter, 1992). Nas Figs. 53 B e C pode observar-se a marcação ocorrendo em agrupamentos celulares formando traços orientados radialmente. A localização da marcação em relação ao xilema é bem evidente em ampliações mais altas (ver pormenor na Fig. 53-D).

Fig. 53. Localização da GS em secções transversais de tubérculo maduro impressas em nitrocelulose. A, aspecto geral evidenciando a marcação localizada na porção interna do anel vascular (v) e dispersa na zona perimedular (pm); uma zona densamente marcada aparece também na região basal de um brolho (seta). A marcação aparece por vezes em fiadas orientadas radialmente (B). A localização da marcação na zona interna ao anel vascular (C) é evidente no pormenor mais ampliado (D) da imagem anterior, em que se observa a posição das células marcadas em relação às células de xilema (x) facilmente identificadas na figura. Uma coloração muito intensa é também observada na zona do "olho" (E), que se observa em pormenor em F, e na base de um brolho (G). Em H, a marcação surge também na periderme (pd) em zonas bem localizadas (seta). c, córtex; m, medula. A x 2,2; B, x 4; C x 7; D x 48; E, x 2; F x 5; G, x 7; H x 6.


m
c
pm
v
A
B
v
C
X
X
D
E
F
G
pd
H

A marcação era ainda muito intensa na base do brolho (possivelmente na zona dos feixes vasculares que para aí se dirigem) (Figs. 53-A e G), nos "olhos" (Figs. 53-E e F) e em zonas muito localizadas à periferia do tubérculo (Fig. 53-H).

Na Fig. 53-E pode ver-se um "olho", mais fundo em relação à superfície do tubérculo, e em maior ampliação (Fig. 53-F) a marcação muito intensa na zona do gomo e primórdios foliares.

Nos brolhos, a marcação era muito intensa no floema interno tal como se pode ver em secção transversal pela sua localização em relação ao xilema (Fig. 54-A e B). Na Fig. 54-C pode ver-se o desenvolvimento de pequenos brolhos laterais a partir do brolho principal e é nítida a marcação nos ápices destes pequenos brolhos (Fig. 54-D).

Assim, para além de uma marcação muito intensa restrita ao floema interno em tubérculos e brolhos, observou-se marcação em zonas meristemáticas primárias tais como os gomos nos "olhos" do tubérculo e ápices de brolhos. As zonas com marcação intensa e muito localizada à periferia podem representar locais de emergência de brolhos.

Distribuição da GS em tecidos de tubérculo dormente e de tubérculo em grau avançado de abrolhamento

Foi feito o estudo da distribuição da GS em tecidos de tubérculos dormentes adquiridos na altura e que não apresentavam qualquer sinal morfológico de desenvolvimento de brolhos.

Foram ainda utilizados tubérculos de semente armazenados na obscuridade à temperatura ambiente e apresentando brolhos abundantes e bastante desenvolvidos e a pele enrugada.

O padrão e intensidade de marcação eram nitidamente diferentes nos tubérculos que se encontravam nas duas situações fisiólogicas diferentes.

Nos tubérculos sem brolhos, a marcação era muito pouco intensa, localizando-se próximo do anel vascular (Fig. 55) e pouco dispersa pela zona perimedular. De uma maneira geral, também não se observava marcação à periferia, embora numa imagem se observe uma pequena zona mais marcada, o que pode indicar um início de actividade da GS em zonas meristemáticas periféricas.

Nos tubérculos com brolhos a marcação era muito intensa e abundante no floema interno, abrangendo uma extensa área na região perimedular em grupos de células formando fiadas e ramificações. A marcação aparecia também muito intensa ao longo de "ramificações" em direcção aos brolhos (Fig. 55), provavelmente nos feixes vasculares que para aí se dirigem, estendendo-se depois à periferia, na zona do "olho".

Este padrão de distribuição da GS nos tecidos do tubérculo a abrolhar pode ser comparado com a distribuição dos respectivos mRNAs (ver secção posterior, Fig. 85), que se localizam principalmente em zonas da periferia, com padrão semelhante ao observado para a proteína, na zona do olho e dos gomos com primórdios foliares.

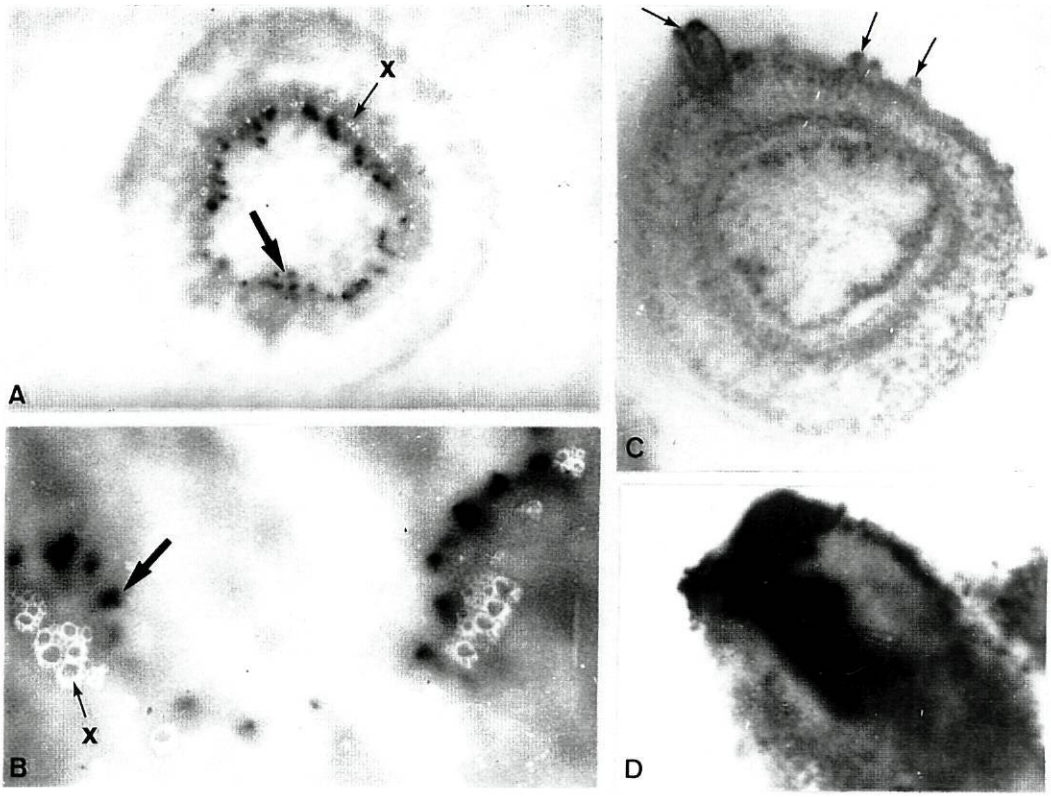


Fig. 54. Localização da GS em secções transversais de brolhos impressas em nitrocelulose. A, a marcação é muito intensa na zona do floema interno (setas espessas) cuja posição em relação ao xilema (x) é evidente em maior ampliação (B). C, a marcação é aparente em zonas apicais (pequenas setas) de pequenos brolhos que se desenvolvem lateralmente a partir do brolho principal e em D pode ver-se, em maior ampliação, a marcação na região mediana e apical de um brolho lateral, em secção longitudinal. A x 16; B x 44; C x 5,5; D, x 40.

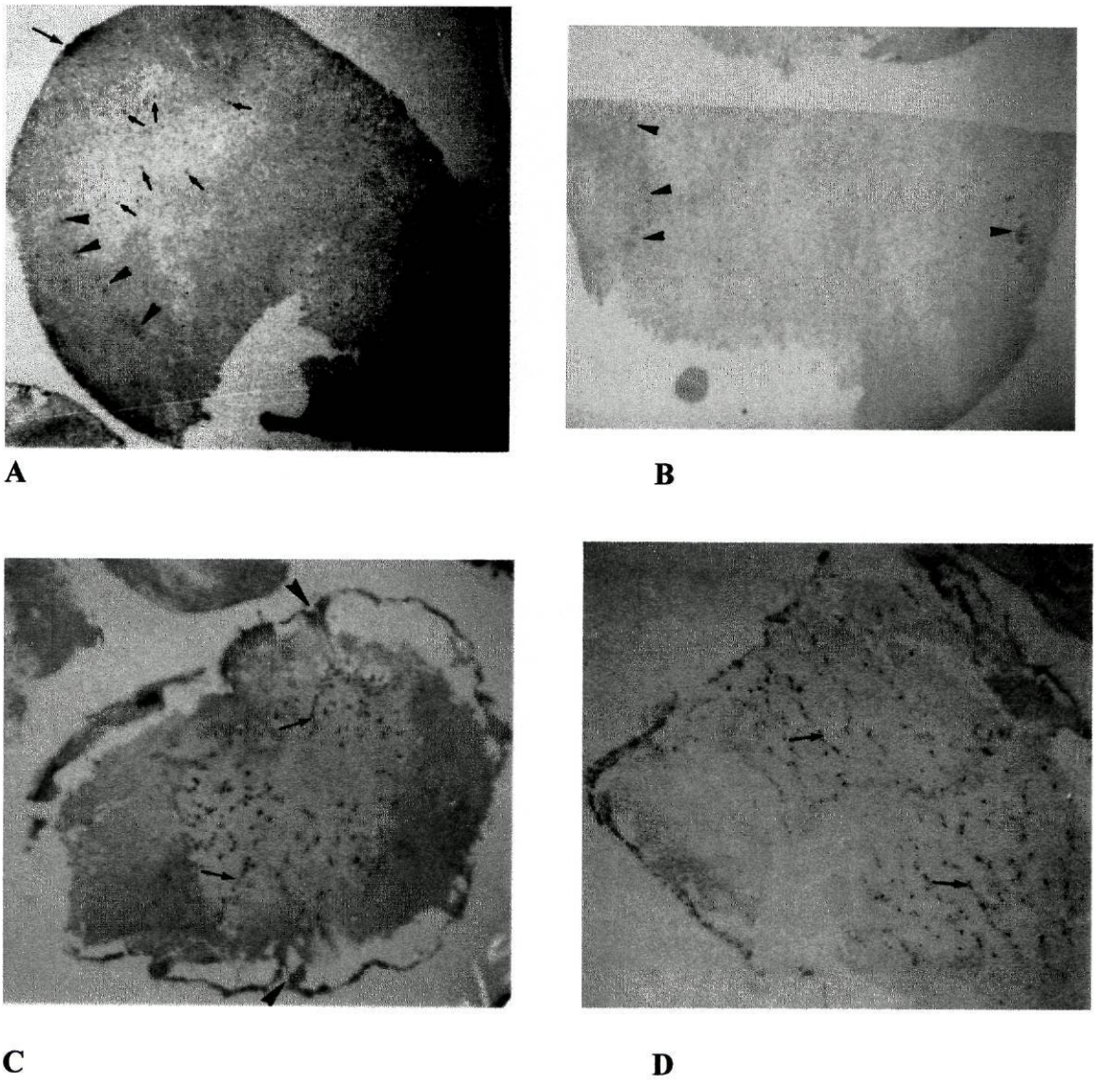


Fig. 55. Distribuição da GS em tecidos de tubérculo dormente (A e B) e em grau avançado de abrolhamento (C e D) impressos em nitrocelulose. Em tubérculos dormentes a marcação é pouco intensa em secção transversal (A) e longitudinal (B) encontrando-se próxima do anel vascular (pontas de seta) e em pequenas manchas dispersas na região perimedular (setas); a marcação também é visível na periferia do tubérculo em zonas localizadas (seta). Em secção transversal de tubérculo em grau avançado de abrolhamento (C) a marcação é muito intensa no floema interno estendendo-se por uma extensa área da zona perimedular em grupos de células formando por vezes fiadas (setas). A marcação é também visível ao longo de ramificações em direcção aos brolhos (pontas de seta); em secção longitudinal (D) a marcação pode ver-se em fiadas (setas) dispostas longitudinalmente acompanhando possivelmente os feixes de floema interno.

Localização da GS em células de tecido vascular de tubérculo por imunocitoquímica ultraestrutural

Os resultados até aqui apresentados, apontavam para a existência nos tubérculos de uma forma citosólica de GS, com padrão de distribuição correspondente ao floema interno. Para avaliar a localização subcelular da GS bem como identificar o tipo de células em que se localiza e portanto onde ocorrem as reacções de assimilação da amónia proveniente de diferentes vias metabólicas, foi feita uma abordagem por imunocitoquímica ultraestrutural.

Ensaios de retenção da antigenicidade da GS após fixação

Com as condições de fixação de tubérculo inicialmente ensaiadas (paraformaldeído 2%, glutaraldeído 0,5 %) a preservação ultraestutural era deficiente, pelo que se testou o grau de retenção de antigenicidade da GS após fixação com concentrações maiores de glutaraldeído. Um bom método para prever a antigenicidade do tecido fixado é testar a reactividade do anticorpo em antigénios imobilizados em nitrocelulose (Moore, 1995). Para isso, submeteram-se vários extractos de tubérculo, em duplicado (20 µg de proteína) a SDS-PAGE, após o que se procedeu à electrotransferência para membrana de nitrocelulose. Esta foi dividida a meio contendo cada metade as mesmas amostras, em igual sequência e quantidade. Metade da membrana foi incubada em PBS enquanto outra metade foi submetida a tratamento com glutaraldeído 2% em PBS, durante 2h. Seguidamente, ambas as metades foram processadas para detecção imunológica de polipeptídeos da GS. Na Fig. 56 pode observar-se que as bandas na parte da nitrocelulose tratada com glutaraldeído 2% eram mais intensas do que na metade correspondente, não tratada, pelo que a concentração de glutaraldeído usada não só não afectava a antigenicidade, como pelo seu efeito de fixar a proteína à membrana permitia a obtenção de um sinal mais forte (de notar que por rotina não era utilizado metanol no tampão de transferência; o metanol é utilizado para fixar a proteína à membrana mas também tem a desvantagem de dificultar a remoção das proteínas do gel).

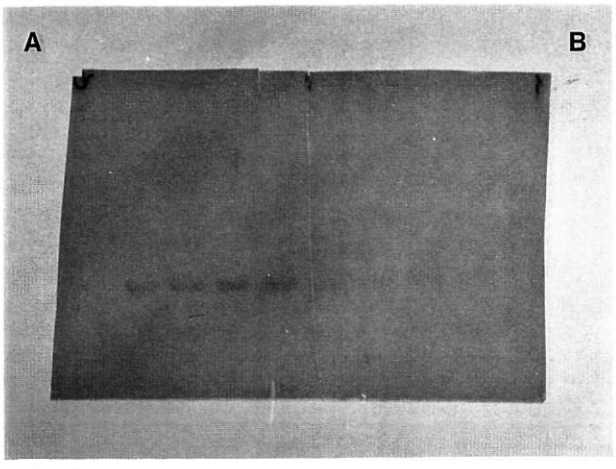


Fig. 56. Ensaio de reconhecimento pelo anticorpo anti-GS do antigénio imobilizado em membrana de nitrocelulose. Extractos de tubérculo foram separados por SDS-PAGE e transferidos para membrana de nitrocelulose. Metade da membrana foi submetida a tratamento com glutaraldeído 2% em PBS durante 2h (A) enquanto outra metade foi incubada em PBS (B). Seguidamente, ambas as metades foram processadas para detecção imunológica de polipeptídeos da GS.

Contudo, a fixação dos tecidos pelo glutaraldeído pode também inibir a detecção do antigénio porque torna mais difícil o acesso dos reagentes na malha formada pelas reacções entre o glutaraldeído e as proteínas. Deste modo, em fixações posteriores utilizou-se paraformaldeído 3-4% e glutaraldeído 0,5-1%.

Além das dificuldades encontradas na preservação da ultraestrutura, durante a obtenção de cortes os grãos de amido destacavam-se muito facilmente do tecido circundante, quer em secções de LR White, quer em secções de Unicryl.

Imunocitoquímica

Foram feitos cortes semi-finos a fim de escolher ao microscópio óptico a zona do tubérculo a estudar a nível ultraestrutural.

Na Fig. 57 está representada parte da secção transversal de um tubérculo na zona do floema interno. Na figura podem observar-se grupos de células de reduzidas dimensões consistindo em elementos crivosos e células de companhia, rodeadas por células "especializadas" de parênquima, de maiores dimensões em que não são visíveis grãos de amido; as células de parênquima de reserva apresentam grãos de amido de grandes dimensões.

A análise por imunocitoquímica ultraestrutural centrou-se nos grupos de células de floema, tendo-se observado marcação abundante no citoplasma de células de parênquima floémico, muito vacuolizadas, que apresentavam numerosas mitocôndrias e retículo endoplasmático. Apesar do citoplasma estar reduzido a uma faixa muito estreita, a densidade de partículas era elevada, quer junto à parede, quer entre os organelos (Fig. 58). É possível que as células de parênquima floémico onde se detectou marcação sejam células de companhia dada a abundância de mitocôndrias, embora fossem altamente vacuolizadas. Não foi verificada marcação nos amiloplastos.

Produção de microtubérculos *in vitro* para posteriores estudos da GS

O desenvolvimento de tubérculos *in vitro* permite obter um sistema controlado em que podem ser facilmente manipuláveis condições ambientais e diferentes variáveis que se pretendam introduzir.

Com a produção de microtubérculos in vitro, procurou estabelecer-se um sistema estável e controlado de obtenção de tubérculos, onde fosse expressa a GS, de modo a permitir futuros estudos de regulação da GS associada à tuberização e da expressão da GS nestes órgãos em diferentes condições de cultura e ainda isolamento da proteína e/ou mRNA da GS que se expressa nestes órgãos para posterior caracterização.

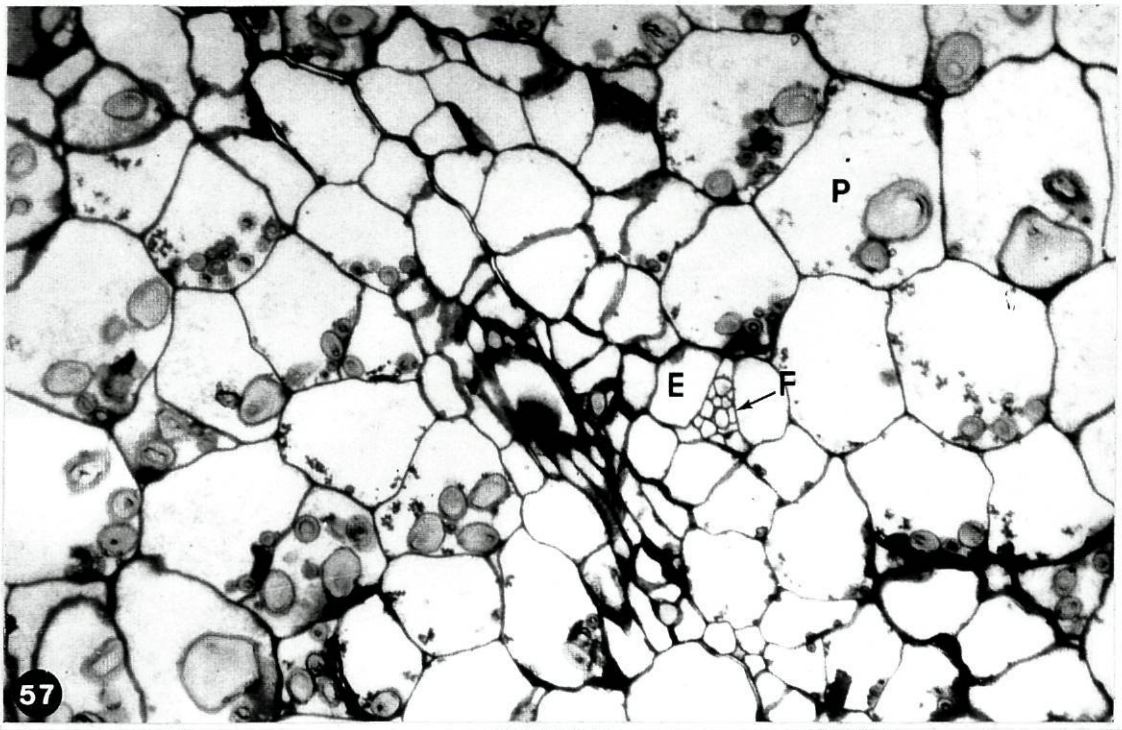
Os tubérculos produzidos *in vitro*, apesar das pequenas dimensões que atingem (cerca de 1 cm) são fisiologicamente maduros e as suas proteínas de reserva têm o mesmo padrão electroforético dos crescidos no campo (Espinoza et al, 1986). Têm também o mesmo aspecto morfológico e basicamente a mesma estrutura (Peterson et al, 1985).

Fig. 57. Parte de secção transversal de tubérculo na zona do floema interno. Grupos de células de floema (F) de reduzidas dimensões encontram-se rodeadas por células "especializadas" de parênquima (E), de maiores dimensões em que não se observam grãos de amido. Nas células de parênquima de reserva (P), são visíveis grãos de amido de grandes dimensões. x 200

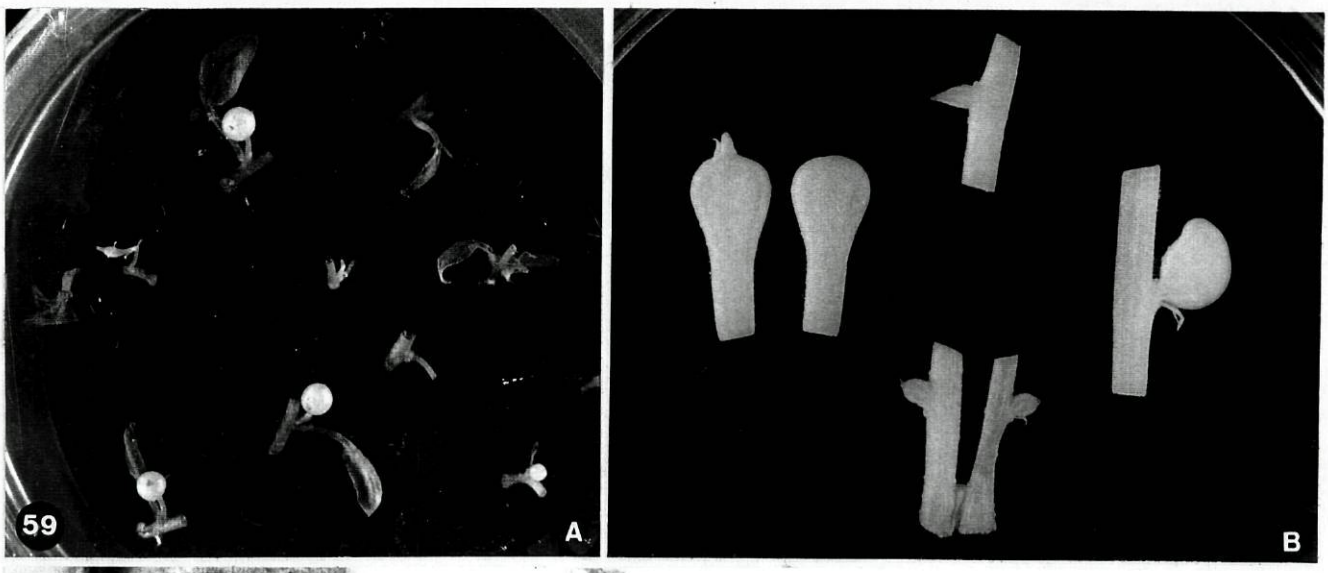
Fig. 58. Localização por ouro coloidal da GS em células de tubérculo incluídas em Unicryl. Em A e B a marcação abundante pode ser observada na estreita faixa de citoplasma, muito densa, adjacente à parede de uma célula de floema. Em C são visíveis partículas de ouro no citoplasma adjacente à parede e entre as mitocôndrias (M). A, x 28 000; B, x 28 000; C, x 22 400.

Fig. 59. A e B, aspecto dos microtubérculos desenvolvidos *in vitro*. Os microtubérculos podem ser observados em posição terminal e axilar nos segmentos caulinares.

Fig. 60. Localização da GS em microtubérculos *in vitro* por imunocitoquímica ultraestrutural. A marcação está dispersa pelo citoplasma (A-C) mas pode também ser observada em pequenos plastídios (P). A, x 40 000; B, 38 x 750; C, 49 000.


P
E
F
57

M
58
A
B
C


59
A
B

P
60
A
B
C

O método utilizado, e que se tem mostrado adequado à maioria das variedades estudadas, consistiu na utilização de segmentos mononodais de caule maduro que foram incubados em regime de fotoperíodo de 12 horas, em meio favorável à produção de novos caules. A partir destes novos caules foram isolados segmentos monodais que foram incubados na obscuridade em meio MS suplementado com benzilaminopurina (BAP), cloreto de clorocolina (CCC) e sacarose. Para a indução do tubérculo é necessária a adição de sacarose entre 6-8% e a presença de citocininas que constituem o estímulo indutor da tuberização reforçado pelo CCC (Hussey e Stacey, 1984).

Na Fig. 59 podem observar-se tubérculos formados ao fim de 4 semanas. Os tubérculos formavam-se quer em posições terminais quer axilares (Fig. 59-B). Nesta fase mediam em média 0,4 cm mas foi possível obter tubérculos com cerca de 1,2 cm.

A localização da GS em tecidos de microtubérculo por imunocitoquímica ultraestrutural revelou que a GS se localizava essencialmente no citoplasma de algumas células (Fig. 60). Na Fig. 60-C pode ver-se que uma das células apresenta marcação dispersa pelo citoplasma, enquanto a outra célula não apresenta qualquer marcação. Alguma marcação, se bem que reduzida, foi também observada em pequenos plastídios (Fig. 60-C).

A detecção imunológica da GS em extractos de microtubérculo *in vitro* revelara uma banda de aproximadamente 42 kDa, possivelmente correspondente a uma subunidade citosólica, que comigrava com bandas detectadas em extractos de tubérculos crescidos em vaso, mas mostrava maior intensidade (Fig. 61). Igual quantidade de proteína foi utilizada para cada amostra.

Assim, foi possível detectar a GS em microtubérculos crescidos *in vitro* tendo sido identificada uma subunidade da GS citosólica em extractos proteicos separados por SDS-PAGE; nos tecidos de microtubérculo a GS expressa-se no citoplasma de algumas células, embora possa ser também detectada com baixa intensidade nos plastídios.

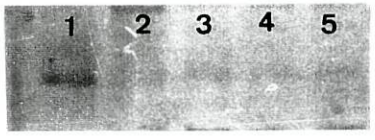


Fig. 61. Imunodetecção de polipeptídeos da GS em extractos de microtubérculos crescidos *in vitro* (1) e comparação com a banda detectada em extractos de tubérculos crescidos em vaso (2-5). As proteínas presentes nos extractos (20 µg) foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para nitrocelulose.

CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE cDNA DE FOLHA DE BATATEIRA EM LAMBDA gt11 *Sfi-Not*

Com o objectivo de abordar a caracterização da família de genes de GS da batateira foi construída uma biblioteca de cDNA de folha de batateira em fago Lambda gt 11*Sfi-Not*. A partir dessa biblioteca, poderiam ser isolados e caracterizados clones de cDNA de GS que constituíssem sondas específicas permitindo i) determinar a complexidade e organização da família de genes da GS; ii) caracterizar o padrão de expressão dos genes correspondentes da GS, em vários órgãos e em diferentes contextos fisiológicos, nomeadamente por "Northern blot" ou hibridização *in situ*; iii) pesquisar clones de DNA genómico em bibliotecas genómicas para identificação de regiões promotoras e estudos de regulação; iv) utilizar os cDNAs isolados para estudos de sobreexpressão ou inibição de expressão.

A clonagem de cópias de DNA complementar (cDNA) de mRNAs de uma grande variedade de tipos de células e tecidos é hoje uma técnica central da biologia molecular moderna. Os clones de cDNA não possuem intrões e podem ser expressos em bactérias.

Os processos que envolvem a *construção* de bibliotecas de cDNA e *isolamento* de clones de interesse é um processo complexo que envolve vários passos enzimáticos e uma série de manipulações que envolvem i) a extracção de RNA por métodos que preservem a sua integridade, ii) o isolamento de mRNA, iii) a síntese de cDNA de cadeia dupla, iv) a inserção de cDNA num vector apropriado para propagação em estirpe hospedeira adequada. Os clones que possuem o cDNA correspondente ao mRNA de interesse são identificados por meio de sondas de ácidos nucleicos ou por anticorpos no caso de se utilizarem sistemas de expressão.

A construção de bibliotecas altamente representativas é essencial para o isolamento de clones de DNA genómico ou de cDNA, a partir de organismos complexos. Os vectores baseados no bacteriófago lambda mostraram-se de grande importância na construção de bibliotecas, devido, principalmente, à elevada eficiência com que as células são infectadas por partículas fágicas obtidas por empacotamento *in vitro* do DNA fágico recombinado e pela possibilidade de rastrear os bacteriófagos a partir de uma elevada densidade de placas fágicas utilizando, quer sondas de ácidos nucleicos, quer anticorpos (Jendrisak et al, 1987).

Extracção de RNA de folha

O RNA foi extraído de folhas verdes, incluindo a nervura central, por métodos envolvendo o LiCl. Para além das dificuldades inerentes à extracção de RNA devido à presença de RNAses endógenas e exógenas, existe ainda a necessidade, no caso das plantas, de proceder de modo a evitar a contaminação por polissacarídeos. A qualidade e quantidade do cDNA sintetizado dependem essencialmente da integridade do mRNA usado como molde. Desse modo, antes da síntese de cDNA é crucial testar a pureza e integridade do mRNA (Watson e Demmer, 1995).

Rendimento: O rendimento das extracções de RNA foi de aprox 500 μg/g de folha.

Pureza: As preparações de RNA apresentavam um grau de pureza elevado possuindo uma razão Abs260/Abs280 entre 1,775 e 2,06.

Integridade: A integridade do RNA extraído foi rapidamente testada, após cada preparação, por electroforese em gel de agarose (não desnaturante). Na Fig. 62 (A e B) são visíveis as bandas correspondentes aos RNAs ribossomais eucarióticos 28S e 18S sendo por vezes visível um segundo par de bandas correspondendo possivelmente aos RNAs ribossomais cloroplastidiais 23S e 16S (Fig. 62-B). Não se observa acumulação de material na zona de baixos pesos moleculares, o que seria indicativo de degradação.

Isolamento de mRNA

O mRNA foi isolado a partir do RNA total, com o sistema PolyATtract (Promega) utilizando esferas magnéticas como suporte sólido. Neste sistema uma sonda de oligo(dT) biotinilada hibridiza com a região 3' poli(A) presente nos mRNAs eucarióticos maduros e os híbridos formados são capturados pelas partículas recobertas por estreptavidina que são precipitadas por meio de um magneto.

Obteve-se mRNA de boa qualidade (Fig. 63) que se apresenta como uma mancha contínua entre 0,5 e 8 kb, com uma acumulação próxima dos 2 kb .

O rendimento foi aproximadamente 8 μg de poli(A) RNA/mg de RNA total.

Síntese e clonagem do cDNA

Para síntese e clonagem de cDNA utilizou-se o sistema RiboClone (Promega) que se baseia na utilização de RNAse H para criação de descontinuidades na cadeia de mRNA, cujos fragmentos são utilizados como iniciadores e substituídos na síntese da segunda cadeia de cDNA. Este método (Gubler e Hoffman 1983; Okayama e Berg, 1982) mostrou-se superior ao método clássico em que a segunda cadeia de cDNA era iniciada por uma estrutura em "gancho de cabelo" criada na extremidade 3' do cDNA. Após a síntese da segunda cadeia de cDNA a estrutura secundária era removida por acção da nuclease S1, com perda de informação correspondente à extremidade 5' do mRNA (Sambrook et al, 1989). É de notar, contudo, que com o método que utiliza a RNase H, alguns nucleótidos correspondendo à extremidade 5' do mRNA, são perdidos durante a síntese da segunda cadeia de cDNA (Sambrook et al, 1989).

A primeira cadeia de cDNA foi sintetizada pela AMV transcriptase reversa em condições que inibem a formação de estruturas secundárias a 3' ("hairpin") e como iniciador-adaptador utilizou-se um oligodesoxinucleotídeo que consiste num oligo(dT) adjacente a um local único de restrição (*Not*I), que permite a posterior inserção orientada do cDNA no vector (Apêndice 1.3, Fig. A1.5). Seguidamente, utilizou-se RNAse H para criar descontinuidades na cadeia de mRNA hibridizada. As porções de mRNA funcionaram como iniciadores para a síntese e reparação da segunda cadeia de DNA pela DNA polimerase I e *E coli* DNA ligase. A T4 DNA polimerase foi utilizada para remover extremidades protuberantes a 3' criando uma molécula de cDNA de cadeia dupla com extremidades a direito ("blunt").

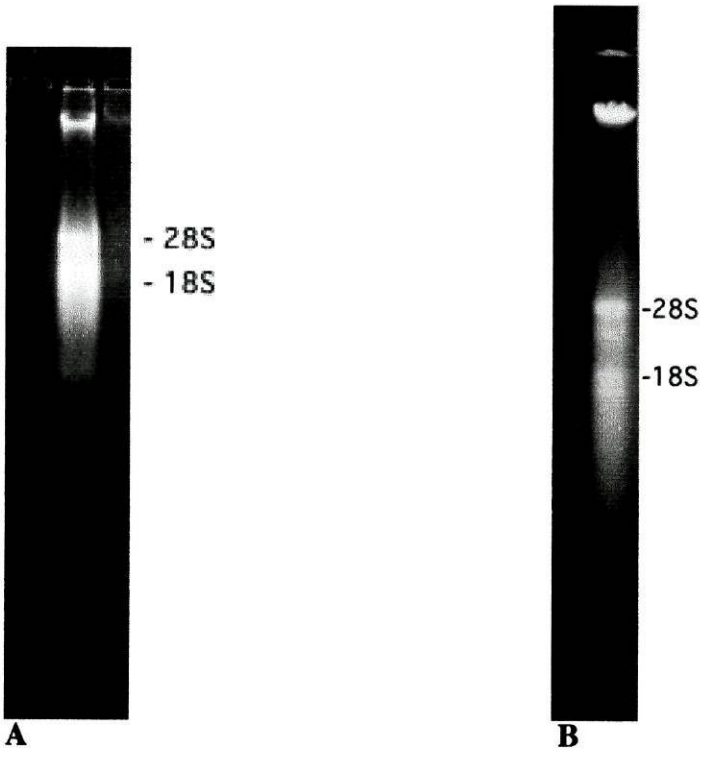


Fig.62. A-B. Electroforese em gel de agarose não desnaturante (1,5 %) de RNA total extraído de folhas de *Solanum tuberosum*, corado com brometo de etídio. As bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S são visíveis nas imagens e em B, podem ainda observar-se um segundo par de bandas, correspondentes aos RNAs ribossomais cloroplastidiais 23S e16S.

Fig 63. Electroforese em gel de agarose não desnaturante (1,5%) do mRNA (5 μg) purificado pelo sistema PolyATtract. Observa-se uma mancha contínua entre os 0,5 e 8 kb com uma acumulação próxima dos 2 kb.

Eficiência da reacção de síntese

A eficiência da síntese das duas cadeias de cDNA foi testada por:

i) incorporação de marcador radioactivo na reacção de síntese e medição em contador de cintilações da radioactividade incorporada nos ácidos nucleicos (precipitados por TCA)

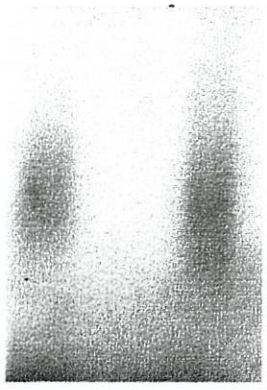
ii) determinação do tamanho do cDNA marcado radioactivamente, por electroforese em agarose em condições alcalinas.

A uma alíquota da mistura da reacção de síntese da primeira cadeia de DNA adicionou-se um marcador radioactivo, ^{32}PdCTP, cuja incorporação na cadeia pode ser medida através da precipitação diferencial dos ácidos nucleicos por TCA. A leitura, em contador de cintilações, da cpm no total da reacção e da cpm incorporada (precipitada por TCA) permite estimar a percentagem de mRNA convertido em cDNA. O mesmo procedimento é realizado em relação à segunda cadeia para determinar a percentagem de conversão em cDNA de cadeia dupla. Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 2. Os valores aproximam-se do esperado para a primeira cadeia (10-30%) e segunda cadeia (>50%) (Watson e Demmer, 1995).

Tabela 2. Eficiência de síntese de ambas as cadeias do cDNA

Conversão de mRNA a cDNA:	9,01%
Conversão do cDNA em cadeia dupla	80,25%

Os produtos da reacção das duas reacções com marcador foram seguidamente submetidos a electroforese em gel desnaturante (alcalino) de agarose (Sambrook et al, 1989). Na Fig. 64 pode ver-se a autorradiografia do gel após electroforese dos produtos da reacção de síntese da 1ª e da 2ª cadeia de cDNA. Os produtos da reacção distribuem-se uniformemente, aparecendo como uma mancha que abarca vários tamanhos, conforme o esperado (Watson e Demmer, 1995).



1 2

Fig. 64. Autorradiografia do resultado da electroforese em gel de agarose (1,4%) em condições alcalinas do cDNA marcado com [^{32}P]. Alíquotas da reacção de síntese da primeira (pista 1) e da segunda (pista 2) cadeia de cDNA foram submetidas a extracção com fenol e precipitação com etanol e tratadas com tampão de amostra alcalino. Após electroforese, o gel foi envolvido em película aderente e exposto a filme de raios-X.

Ligação de adaptadores de EcoRI

O cDNA de cadeia dupla foi considerado adequado para clonagem, pelo que se procedeu à ligação de adaptadores de *Eco*RI às extremidades do cDNA. O excesso de adaptadores foi removido por cromatografia. O cDNA assim obtido foi seguidamente digerido com *Not*I, tendo como resultado moléculas com uma extremidade *Eco*RI a 5' e outra *Not*I a 3', o que permite a inserção orientada do cDNA no vector.

Ligação do cDNA ao vector

O cDNA foi ligado aos braços desfosforilados do fago Lambda gt11 *Sfi-Not* submetido a dupla restrição com as enzimas *Eco*RI e *Not*I. O fago Lambda gt11 *Sfi-Not* (Apêndice 1.3) é um derivado do fago Lambda gt11 que permite a expressão de polipeptídeos de fusão com a β-galactosidase. Deste modo, permite a selecção dos clones de interesse por meio de sondas de nucleótidos ou por anticorpos.

As condições de ligação foram as adequadas à formação de concatâmeros de DNA de fago, que á e substrato ideal para a reacção de empacotamento *in vitro*.

Foram testadas duas reacções de ligação com diferentes proporções molares de vector:cDNA, respectivamente 1:1,5 (Ligação 1) e 1:3 (Ligação 2). Teoricamente numa reacção de ligação seriam necessários 2 braços de vector (uma molécula de vector) para uma molécula de cDNA (Sambrook et al, 1989) mas na prática, nem todas as moléculas de cDNA são susceptíveis de ligação, pelo que se torna necessário variar as proporções relativas de modo a obter a melhor eficiência de clonagem.

Empacotamento dos fagos e obtenção das bibliotecas

Os fagos resultantes das reacções de ligação de cDNA ao vector (Ligação 1, Ligação 2 e ligação de DNA controlo) foram empacotados *in vitro* por meio do sistema GIGAPACK II (Stratagene). As duas reacções de ligação variavam na proporção de cDNA: vector, que foi respectivamente 1:1,5 e 1:3.

Utilizaram-se os seguintes controlos:

i) empacotamento do fago selvagem para avaliar a eficiência da reacção de empacotamento *in vitro*;

ii) empacotamento da ligação de uma molécula controlo de DNA (que acompanha o vector) aos braços do vector para avaliar a eficiência da reacção de ligação do DNA de inserção ao vector.

Para determinar a qualidade e complexidade das bibliotecas (Huynh et al, 1985), utilizou-se uma alíquota de cada mistura resultante do empacotamento, fizeram-se diluições, e infectaram-se estirpes adequadas de *E. coli*, procedendo-se à contagem do nº de placas fágicas resultantes, para calcular os parâmetros abaixo indicados. Para a determinação desses parâmetros utilizou-se a estirpe de *E. coli* LE 392, excepto no caso da determinação da percentagem de recombinantes, em que se utilizou a estirpe de *E. coli* Y1090 que permite a identificação visual dos

recombinantes (Apêndice 1.2). A estirpe de *E. coli* LE393 (Promega) (Apêndice 1.2) não permite a selecção visual dos recombinantes, mas permite a obtenção de títulos mais elevados. Uma vez que se utilizaram braços do vector desfosforilados e digeridos com duas enzimas de restrição diferentes, a percentagem de religação esperada é mínima, e por isso em situações que em que se pretendia um elevado título, como amplificação da biblioteca, rastreio de elevado número de fagos com sonda de cDNA, obtenção de lisados de fago, utilizou-se esta estirpe, de acordo, com recomendações do fornecedor ("Promega protocols and applications guide", 1991).

Título - expresso em pfu/ml (pfu, "plaque forming units") expressa o nº de partículas fágicas capazes de infectar e dar origem a placas de lise, por mililitro da mistura resultante do empacotamento.

Eficiência da reacção de empacotamento in vitro - expressa em pfu/μg de fago Lambda selvagem; a eficiência deve ser, em geral, superior a 4 x 10^8 pfu/μg de DNA. No sistema utilizado, (Gigapack II, Stratagene) são esperadas eficiências da ordem de 10^9 pfu/μg. Com DNA que foi submetido a digestão com enzimas de restrição e religado, as eficiências de empacotamento são inferiores (na ordem de 10 a 100 vezes).

Eficiência de ligação do DNA controlo aos braços do vector - expressa em pfu/μg de braços; a eficiência deve ser superior a 10^7 pfu/μg de braços de Lambda gt11. Se se verificam eficiências inferiores, e a eficiência de empacotamento do lambda selvagem está dentro do esperado, pode significar que a reacção de ligação não decorreu de modo eficiente. Para o cDNA esperam-se eficiências menores, uma vez que nem todos os produtos de reacção de ligação são susceptíveis de serem empacotados, sendo de esperar 5-9 x 10^6 pfu/μg braços (Promega Protocols and applications Guide, 1991).

Esta reacção serve também para controlar a ligação preferencial dos braços do vector ao fragmento de inserção fosforilado em vez da religação dos braços do vector. A percentagem de recombinantes obtidos com o DNA controlo deverá ser superior a 95%.

Eficiência da clonagem de cDNA - calculada a partir do número de recombinantes obtido e é expressa em pfu (recombinantes)/μg de cDNA; deve ser superior a 10^6 pfu/μg de cDNA.

Percentagem de recombinantes - apesar de se esperar uma baixa percentagem de religação dos braços do vector, calculou-se a percentagem de recombinantes plaqueando os fagos em estirpe Y1090 e em meio contendo IPTG e X-Gal. Os fagos recombinantes dão origem a placas de lise transparentes enquanto que os braços religados dão origem a placas de lise azuis (Apêndice 1.3). A percentagem de recombinantes determina-se pela percentagem de placas transparentes no total de placas de lise (azuis + transparentes).

Tamanho da biblioteca - número total de fagos recombinantes independentes, presentes na biblioteca primária. Uma biblioteca com 10^5 a 10^7 recombinantes deverá conter sequências representando RNAs raros (Huynh et al, 1985). Calcula-se, multiplicando o título (pfu/ml) pelo volume final da biblioteca primária (em ml) e este valor pela percentagem de recombinantes/100.

Tabela 3. Determinação da qualidade e complexidade das bibliotecas obtidas

LIGAÇÃO 1
Quantidade de DNA utilizada: 2 μg de vector e 0,1 μg de cDNA (razão molar aproximada 1:1,5)

Percentagem de recombinantes: 70% de placas transparentes

Tamanho: 2,8 x 10^6 (número de recombinantes independentes)

DNA empacotado	Título (pfu/ml)	Eficiência de empacotamento (pfu/μg vector)	Eficiência de clonagem do cDNA (nºrec/μg de cDNA)
Lambda selvagem	5,4 x 10^8	2,7 x 10^9	
DNA controlo ligado ao vector	2 x 10^8	2 x 10^8	5 x 10^8
cDNA ligado ao vector	7,5 x 10^6	1,1 x 10^6	1,5 x 10^7

LIGAÇÃO 2
Quantidade de DNA utilizada: 1 μg de vector e 0,1 μg de cDNA (razão molar aproximada 1:3)

Percentagem de recombinantes: 75%

Percentagem de recombinantes com o DNA controlo: 98%

Tamanho: 2,4 x 10^6 (número de recombinantes independentes)

DNA empacotado	Título (pfu/ml)	Eficiência de empacotamento (pfu/μg vector)	Eficiência de clonagem do cDNA (nºrec/μg de cDNA)
DNA controlo ligado ao vector	2,3 x 10^8	2,3 x 10^8	
cDNA ligado ao vector	6 x 10^6	1,7 x 10^6	1,3 x 10^7

Os resultados obtidos, expressos na Tabela 3, permitiram concluir que as reacções de ligação e de empacotamento foram eficientes, obtendo-se eficiências elevadas de 2,7 x 10^9 pfu/μg DNA para o fago selvagem e cerca de 2 x 10^8 pfu/μg de braços para o empacotamento da ligação com DNA controlo. Obtiveram-se 98% de recombinantes com o DNA controlo o que evidenciava uma ligação preferencial dos braços ao DNA de inserção. Com o cDNA obtiveram-se cerca de 70-75 % de recombinantes.

As eficiências de clonagem para o DNA controlo foram elevadas, correspondendo a cerca de 5 x 10^8 pfu (recombinantes)/μg de DNA de inserção. As eficiências de clonagem do cDNA foram inferiores, da ordem dos 1,3 a 1,5 x 10^7 pfu (recombinantes)/μg de cDNA. É de notar

que nem todo o cDNA é eficientemente ligado; e mesmo depois de ligado, nem todos os recombinantes são susceptíveis de empacotamento. Contudo, o número de recombinantes independentes de cada biblioteca é elevado (2,4-2,8 x 10^6), devendo ser suficiente para o isolamento de sequências pouco abundantes.

Uma biblioteca com cerca de 10^5-10^7 recombinantes deveria teoricamente conter sequências representando mRNAs pouco abundantes (Huynh et al, 1985). mRNAs pouco abundantes são definidos como estando presentes em cerca de 20 cópias por célula ou menos (Watson e Demmer, 1995).

Amplificação da Biblioteca 1

Uma das bibliotecas obtidas foi amplificada em estirpe LE392 (Apêndice 1.2), de acordo com as recomendações do fornecedor, dado que permite a obtenção de títulos mais elevados. É preciso ter em conta que a amplificação de biblioteca em Lambda gt11 pode levar a uma redução de recombinantes com crescimento limitado. Embora possam ser utilizadas estirpes que inibam a expressão do promotor *lac*, podem ser, contudo, produzidos ainda que a níveis muito baixos, peptídeos de fusão, mesmo na ausência de IPTG. Estes produtos podem ser tóxicos e inibir o crescimento dos fagos ou da estirpe hospedeira, tendo como resultado que os respectivos recombinantes crescem mais lentamente; o cDNA de interesse pode também ser mais instável no vector dando origem a distorções na representação dos recombinantes na biblioteca (Watson e Demmer, 1995). Deste modo, apenas uma biblioteca (Biblioteca 1) foi amplificada na estirpe recomendada LE 392 de *E. coli*, permanecendo a possibilidade de eventualmente efectuar rastreios directamente a partir da biblioteca primária (Biblioteca 2).

É de notar que o *tamanho* da biblioteca amplificada não corresponde ao seu *título* (Sambrook, et al 1989). O tamanho é determinado pelo número de placas recombinantes independentes (presentes na biblioteca primária) que são amplificadas. O título é o nº de partículas fágicas por volume de biblioteca amplificada e deverá ser 10^{10}-10^{11} pfu/ml.

Pretendia-se rastrear >10^6 placas fágicas recombinantes; assim, da biblioteca primária, plaquearam-se 20 placas com 50000-75000 fagos:

Obtiveram-se 200 ml de suspensão de bacteriófago que foi dividida em alíquotas as quais foram armazenadas a -70°C, após adição de DMSO para 7%.

Uma alíquota desta biblioteca foi utilizada para determinação do *título* da biblioteca amplificada que era 1,3 x 10^{12}.

Rastreio da biblioteca

O fago Lambda gt11 e seus derivados foram desenhados para permitir a expressão do DNA inserido no gene *lacZ* numa proteína de fusão com a β-galactosidase, que pode ser reconhecida por meio de anticorpos. Para que a proteína desejada se expresse é necessário que o DNA esteja inserido na orientação correcta e na grelha de leitura correcta, o que significa que a probabilidade de um clone positivo ser expresso é de 1 em 6 (Huynh et al, 1985). Contudo, no

Lambda gt 11 *Sfi-Not* utilizado neste trabalho todas as moléculas de cDNA estão inseridas na mesma orientação relativamente ao gene *lacZ*, o que duplica a probabilidade da expressão de proteína de fusão.

Uma vez que se possuíam anticorpos anti-GS de feijoeiro que reconheciam com elevada especificidade a glutamina sintetase em extractos de folhas de batateira, foi inicialmente planeado fazer um primeiro rastreio da biblioteca utilizando esses anticorpos. Contudo, testes preliminares revelaram que o antisoro anti GS de feijoeiro reconhecia várias bandas em extractos totais de *E. coli* submetidos a SDS-PAGE e transferidos para nitrocelulose (Fig. 65). Assim, para poder utilizar estes anticorpos no rastreio de bibliotecas, estes teriam que ser purificados, tendo que ser previamente adsorvidos em extractos de *E. coli* em coluna.

Deste modo, esta abordagem foi deixada para segundo plano e deu-se prioridade ao rastreio por sonda de cDNA.

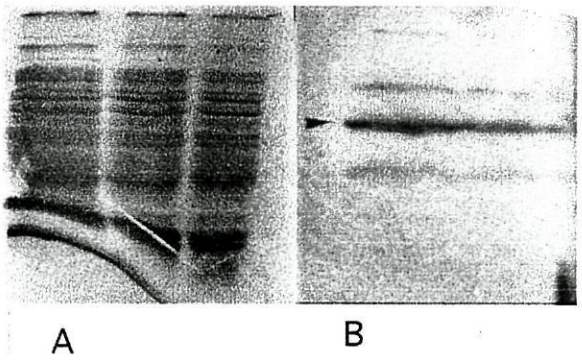


Fig. 65. A. SDS-PAGE dos polipeptídeos totais de *E. coli*, corados com azul de Coomassie. **B.** Resultado da incubação de anticorpos anti-GS e feijoeiro com polipeptídeos de extracto de *E. coli*, após separação por SDS-PAGE e transferência para nitrocelulose. Os anticorpos reconhecem várias bandas nos extractos de *E. coli*.

Obtenção de sonda homóloga de cDNA de GS através de PCR

Desenho de iniciadores

Através de consultas a bancos de dados, foram comparadas sequências conhecidas de cDNA de GS citosólica e cloroplastidial de várias plantas (Fig. 66). Para o alinhamento utilizou-se o programa CLUSTAL integrado na aplicação PC-GENE e apenas as sequências presentes na base de dados EMBL (Apêndice 2.2).

Após alinhamento das sequências nucleotídicas foi escolhida uma zona bem conservada entre cDNAs de subunidades citosólicas e cloroplastidiais de GS, na região codificante, de aproximadamente 400 bp para amplificação por PCR. Foram desenhados dois iniciadores, com base em sequências assinaladas na Fig. 66, para a reacção de PCR, contendo cada um, um local *Eco*RI, para posterior clonagem, com a seguinte sequência (5'--->3'):

Iniciador a 5': GSR1-(GAATTC)TCCTGCTGGCGAGCC

Iniciador a 3': GSR2-(GAATTC)TGTGAGCACCTGCACC

```
PVGSR1      ATCTTGGTTATTTGTGATGCTTACACTCCAGCTGGAGAACCCATTCCCACTAACA  438
PVGSG1      ATCCTGGTTATGTGTGATGCTTACACTCCTGCTGGGGAACCCATCCCTACCAATA  384
PSGSCY1A    ATCTTGGTTATGTGTGATGCATACAGTCCTGCTGGAGAACCAATTCCCACTAACA  395
NPGS        ATCTTGGTCATGTGTGATGCTTATACTCCTGCTGGCGAGCCTATCCCGACAAACA  331
            *** **** **.********.** * ***.***** **.** ** ** ** ** *
                                    GSF1

PVGSR1      AGAGGCACAATGCTGCCAAGATATTCAGCAATCCTGATGTTGTTGCTGAAGAACC  493
PVGSG1      AGAGACATAATGCGGCAAAGATATTTAGCAATCCTGAAGTTGTTGCTGAAGAACC  439
PSGSCY1A    AAAGACACGCAGCTGCTAAGGTTTTTAGCCATCCTGATGTTGTTGCTGAAGAAAC  450
NPGS        AGAGGCATGCTGCTGCCAAGATCTTCAGCAACCCCGATGTTGTTGCTGAGGAACC  386
            *.**.** . .**.** ***.* ** *** * ** **.***********.*** *

PVGSR1      CTGGTACGGTATTGAGCAGGAATACACCTTGTTGCAGAAAGAAGTGAACTGGCCT  548
PVGSG1      CTGGTATGGCATTGAGCAGGAATATACCTTGTTGCAGAAAGATGTTCAGTGGCCT  494
PSGSCY1A    ATGGTATGGTATAGAGCAGGAATACACCTTGTTGCAGAAAGACATCAATTGGCCT  505
NPGS        CTGGTATGGTATTGAGCAAGAATACACCTTGTTGCAAAGGGATATTAACTGGCCT  441
             ***** ** **.*****.***** **********.*..** .*  * ******

PVGSR1      GTTGGGTGGCCTGTTGGTGGTTTCCCTGGACCTCAGGGACCTTACTATTGTGGTG  603
PVGSG1      GTTGGATGGCCTCTTGGTGGTTTTCCTGGGCCCCAGGGACCATACTATTGTGGTA  549
PSGSCY1A    CTTGGTTGGCCAGCTGGTGGTTATCCTGGACCTCAGGGACCATATTATTGCAGTG  560
NPGS        CTGGGCTGGCCTATTGGAGGCTTCCCTGGACCTCAGGGACCATACTACTGTGGAA  496
             *.** *****.  ***.** *. *****.** ********.** ** ** .*..

PVGSR1      TTGGTGCTGACAAGGCTTTTGGGCGTGACATTGTTGACGCACATTACAAAGCCTG  658
PVGSG1      TTGGTGCTAACAAGGCTTTCGGGCGTGATATTGTTGATTCACATTACAAAGCATG  604
PSGSCY1A    TTGGTGCTGACAAGGCTTTTGGCCGTGACGTTGTTGAGGCACATTACAAAGCCTG  615
NPGS        CCGGAGCTGATAAGGCCTTTGGACGTGATATTGTGGACTCCCATTACAAGGCTTA  551
              **.***.* ***** ** ** ***** .****.** .* ********.** *.

PVGSR1      TGTCTATGCTGGCATCAACATCAGTGGAATTAATGGAGAGGTGATGCCTGGTCAG  713
PVGSG1      TCTTTATGCGGGCATTAACATAAGTGGAATTAATGGAGAAGTGATGCCTGGTCAA  659
PSGSCY1A    TCTTTTTGCCGGCATCAACATCAGTGGAATCAATGGAGAAGTCATGCCTGGTCAA  670
NPGS        TCTTTATGCTGGGATTAACATCAGTGGTATCAACGGAGAAGTCATGCCCGGACAG  606
            * * *.*** ** ** ***** *****.** ** *****.** ***** **.**.

PVGSR1      TGGGAATTCCAAGTTGGACCTGCAGTTGGGATCTCAGCTGGTGACGAGTTGTGGG  768
PVGSG1      TGGGAATTCCAAGTTGGTCCATCAGTAGGCATCTCTGCTGCTGACGAGTTATGGG  714
PSGSCY1A    TGGGAATTTCAAGTTGGTCCCTCAGTCGGTATCTCTGCTGGTGATGAGATATGGG  725
NPGS        TGGGAATTCCAAGTCGGACCTTCTGTTGGCATCTCAGCCGGTGATGAAGTGTGGG  661
            ******** ***** **.** .*.** ** *****.** * *** **..*.****

PVGSR1      TAGCTCGTTACATCTTGGAGAGGATCACTGAGGTTGCTGGTGTGGTGCTTTCCTT  823
PVGSG1      TTGCCCGTTACATTTTGGAGAGAATCACTGAGATTGCTGGAGTGGTGCTTTCGTT  769
PSGSCY1A    TTGCTCGCTACATTTTGGAGAGGATCACTGAGGTTGCTGGTGTGGTTCTTACCTT  780
NPGS        TAGCTCGTTACATTCTTGAGAGGATTGCGGAGATAGCTGGAGTGGTTGTGTCATT  716
            *.** ** *****  *.*****.** .*.***.*.*****.*****. *..* **

PVGSR1      TGACCCCAAGCCAATCAAGGGTGATTGGAATGGTGCTGGTGCTCACACCAACTAC  878
PVGSG1      TGACCCTAAACCAATTCAGGGTGATTGGAATGGTGCTGGTGCTCACACGAATTAC  824
PSGSCY1A    TGACCCTAAACCAATTAAGGGTGACTGGAATGGTGCTGGTGCTCACACAAACTAC  835
NPGS        TGACCCCAAGCCTATTCCGGGTGATTGGAACGGTGCAGGTGCTCACACAAACTAC  771
            ****** **.**.**   ****** ***** *****.********** ** ***
                                                GSR1
```

Fig. 66. Alinhamento de parte de sequências nucleotídicas de cDNAs de GS de várias plantas. Os nucleótidos perfeitamente conservados estão assinalados com um "*" na linha inferior e os nucleótidos considerados "bem conservados", de acordo com parâmetros definidos no programa, estão assinalados com um ponto, ".", na linha inferior. As sequências utilizadas para desenhar oligonucleótidos iniciadores estão sublinhadas na sequência de cDNA de NPGS. Sequências utilizadas: 1)PVGSR1, mRNA (PR-1) de glutamina sintetase de *Phaseolus vulgaris*; 2) PVGSG1, mRNA da subunidade gama (citosólica) de glutamina sintetase de *Phaseolus vulgaris*; 3) PSGSCY1A, mRNA de glutamina sintetase (GS1, citosólica) de *Pisum sativum*; 4) NPGS, glutamina sintetase cloroplastidial de *Nicotiana plumbaginifolia* [1].

[1] A sequência NPGS listada no banco de dados EMBL, versão em CD-ROM, integrada na aplicação PC-GENE versão 18.0 de Dezembro de 1996, encontra-se actualmente no GenBank, com o mesmo número de acesso (M19055) e com o nome TOBCPGS.

Utilizando cDNA total de folha de batateira como molde e os referidos oligonucleótidos iniciadores, procedeu-se a vários ensaios para apurar as condições da reacção de PCR de modo a obter apenas uma banda visível em gel de agarose após electroforese dos produtos de PCR (Fig. 67). As condições ideais obtiveram-se reduzindo a quantidade de cDNA molde na reacção para 0,5 ng e a concentração dos iniciadores para 0,1 μM.

Clonagem dos produtos de PCR

Após o PCR tornava-se necessário clonar o seu produto. Embora os produtos de PCR possam ser usados directamente em muitas aplicações a sua clonagem evita que se tenha de repetir a reacção de PCR e é particularmente importante quando o fragmento de DNA amplificado se destina a ser utilizado como sonda ou em controlos positivos (Levis, 1995). É também de notar, que embora seja visível apenas uma banda após electroforese dos produtos de PCR, esta pode corresponder a várias fragmentos diferentes de DNA amplificado, enquanto que após clonagem somente um fragmento está presente, podendo ser caracterizado com rigor.

A banda correspondente ao DNA amplificado por PCR foi extraída do gel de agarose e o DNA eluído foi clonado nos plasmídios pBS (Stratagene) e pBluescript II SK (Stratagene) (Apêndice 1.3) de acordo com duas estratégias diferentes: i) o fragmento amplificado por PCR foi isolado por electroforese e digerido na agarose com *Eco*RI a fim de criar extremidades compatíveis para inserção no local de clonagem múltipla do vector e inserido no plasmídio pBS; ii) tirando partido do facto de a Taq DNA polimerase poder adicionar um dATP extra nas extremidades do produto de PCR, o DNA amplificado foi extraído da agarose e inserido directamente no vector pSK o qual foi previamente cortado no local *Eco*RV e ao qual foram adicionados dTTP. Foram transformadas estirpes TG2 e DH5α de *E. coli* (Apêndice 1.2) tendo sido obtidas colónias brancas (possivelmente contendo plasmídio recombinante) apenas na estirpe DH5α, de bactérias transformadas com os dois tipos de vectores.

Certificação do cDNA clonado

i) "Southern blotting" do produto de PCR. Parte do produto da reacção de PCR foi submetido a electroforese e transferido para membrana de nylon, tendo-se procedido à hibridização com uma sonda heteróloga correspondente a cDNA de GS de feijoeiro (β1) marcada com ^{32}P. Na Fig. 68 pode ver-se que a sonda reconhece uma banda de tamanho aproximado de 460 bp.

ii) Análise das colónias contendo plasmídio recombinante por "colony screening". As colónias brancas obtidas após transformação com plasmídio contendo o fragmento de DNA amplificado, foram repicadas ordenadamente para uma placa de meio L-agar. Após incubação, procedeu-se à transferência do DNA das colónias para filtro Whatmann que foi posteriormente hibridizado com a sonda heteróloga de feijoeiro (β1) anteriormente referida. Na Fig. 69 pode obervar-se um forte sinal positivo correspondente a algumas colónias. Seis colónias (A, B, C, D e E) foram usadas para fazer cultura em meio líquido e armazenar a -70°C.

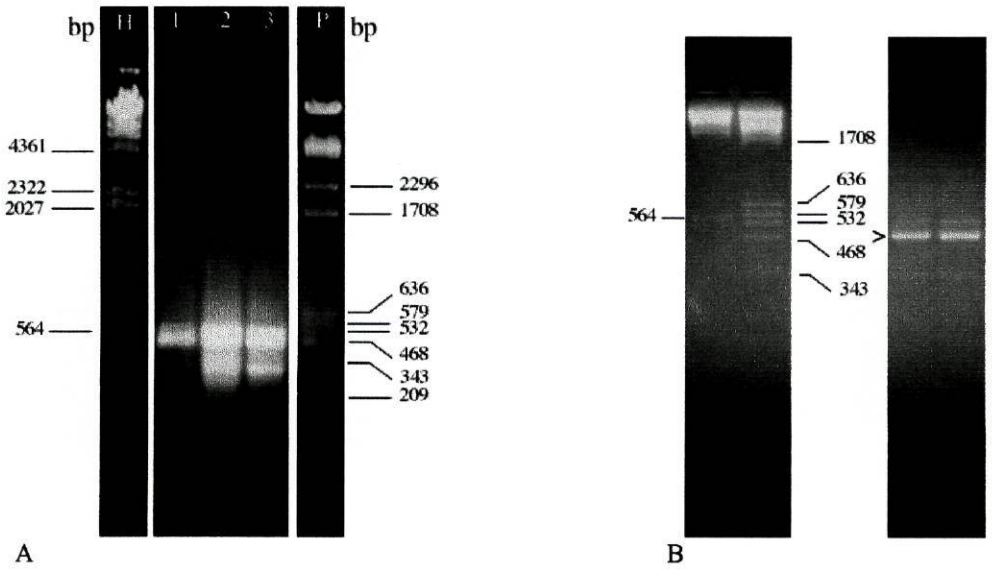


Fig. 67. Ensaios para apurar as condições da reacção de PCR de modo a obter apenas uma banda, após electroforese dos produtos do PCR. **A.** Electroforese dos produtos de PCR em gel de agarose Seaplaque 1%. Como molde utilizou-se 1 ng de cDNA nas pistas 1, 2 e 3 e iniciadores nas concentrações de 0,1 uM, 0,2 uM e 0,5 uM respectivemente nas pistas 1, 2 e 3. Como marcadores de peso molecular utilizou-s DNA de fago lambda cortado com *Pvu*II (P) e *Hin*dIII (H). **B.** Electroforese dos produtos de PCR em gel de agarose Nusieve 4%. Utilizaram-s 0,5 ng (pista1) e 1 ng (pista 2) de cDNA e os iniciadores foram utilizados na concentração de 0,1 uM em ambos os casos. Na pista P encontra-se DNA de fago lambda cortado com *Pvu*II e na pista H encontra-se DNA de fago lambda cortado com *Hin*dIII. A banda assinalada com uma seta foi excisada do gel para posterior clonagem do DNA.

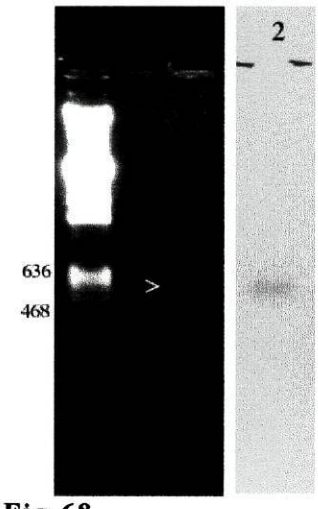


Fig.68

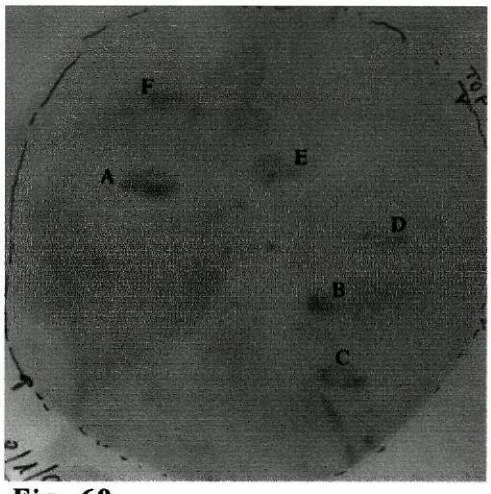


Fig. 69

Fig. 68. "Southern blot" do produto do PCR. O produto da reacção de PCR foi submetido a electroforese e transferido para membrana de nylon que foi a hibridizar com uma sonda de cDNA de GS de feijoeiro. Na pista 1 está assinalada a banda, corada com brometo de etídeo no gel de agarose, antes da transferência. A sonda reconhece uma banda com cerca de 460 bp visível na autorradiografia (pista 2). Na pista P encontra-se DNA de fago lambda cortado com *Pvu*II.

Fig. 69. Análise das colónias contendo plasmídeo recombinante. Colónias brancas obtidas após a transformação foram repicadas ordenadamente para placa com meio, e após incubação, o DNA foi transferido para papel de filtro que foi a hibridizar com uma sonda de cDNA de GS de feijoeiro. Seis colónias visíveis na autorradiografia produziram um sinal mais forte (A, B, C, D e E) e foram repicadas para meio líquido e guardadas a -70°C.

iii) Sequenciação parcial

A partir de um dos clones (D), isolou-se plasmídio recombinante, pSK-D, e procedeu-se à sequenciação parcial do cDNA inserido pelo método de Sanger. O plasmídio recombinante tinha sido obtido por clonagem em pBluesript SK II do produto do PCR pelo método ii) anteriormente descrito. Na Fig. 70 pode observar-se parte da sequência lida e a sua comparação manual com uma parte da sequência de cDNA de GS de *Nicotiana plumbaginifolia,* NPGS (ver Fig. 66). A elevada homologia verificada, permitiu concluir que o cDNA clonado correspondia a parte de uma sequência de mRNA de GS de batateira e foi, assim, considerado adequado para ser utilizado como sonda no rastreio da biblioteca de cDNA.

```
N. plumbaginifolia (318)TATCCCGACAAACAAGAGGCATGCTGCTGCCAAGATCTTCAGCAACCCCGATGTTGTTGCTG
cDNA de batateira        CATCCCAACAAACAAGAGGCACGCCGCTGCCAAGGTCTTCTGCCACCCTGATGTGGCTGCTG

AGGAACCCTGGTATGGTATTGAGCAAGAATACACCTTGTTGCAAAGGGATATTAACTGGCCTCTGGGCTGGCCTATTGGAGGCTTC
AGGAACT-TGGTATGGTATTGAC--AGA-TAT-CCTTGCTGCAAAGGAGGTC--ACTGGCCTCTGGA-TGGCC-ATTGGTGG
```

Fig. 70. Comparação manual de parte da sequência do cDNA de batateira amplificado por PCR com os iniciadores GSF1 e GSR1 e posteriormente clonado em pBluescipt SK e parte da sequência NPGS de cDNA de *Nicotiana plumbaginifolia.* A porção sequenciada é a imediatamente adjacente ao iniciador GSF1 (ver Fig. 5). As bases idênticas entre as duas sequências estão sublinhadas na linha inferior.

Rastreio da biblioteca de cDNA de folha

Isolamento e caracterização do fago λ14.A1.2

Uma vez que o rastreio da biblioteca foi feito por sonda de cDNA, utilizou-se, de acordo com instruções do fornecedor, a estirpe de *E. coli* LE 392 que tende a produzir títulos mais elevados ("Promega protocols ans aplications guide", 1991). Esta estirpe foi utilizada quando se pretendiam títulos elevados (por exemplo, amplificação, 1° rastreio, obtenção de lisado de fago) mas em noutras situações, por exemplo obtenção de placas fágicas para amplificação do fragmento de inserção por PCR, utilizou-se a estirpe Y1090, pois pode ser plaqueada em meio contendo ampicilina.

Numa primeira fase, rastrearam-se cerca de 2 x 10^5 fagos e foi identificada uma placa fágica (fago 14) que hibridizava com a sonda. Como sonda, utilizou-se o fragmento de cDNA obtido por restrição com *Eco*RI do plasmídio pSK-D, onde foi clonado o produto de amplificação por PCR com os iniciadores GSF1 e GSR1. Após três fases de purificação, foram recolhidas duas placas fágicas completamente isoladas (fagos λ14.A.1.1 e λ14.A.1.2) que hibridizavam fortemente com a sonda de cDNA (Fig. 71). O fago λ14.1.2 foi utilizado para análises posteriores.

i) Análise do tamanho do fragmento de inserção por PCR: o fragmento de inserção do fago λ14.A.1.2 foi amplificado por PCR, utilizando como iniciadores oligonucleótidos correspondentes a sequências do vector flanqueando o local de clonagem (Dorfman, 1993; Simon e Schorr, 1992). Na Fig. 72 pode observar-se que o fago isolado continha um fragmento de inserção cujo tamanho foi estimado em cerca de 1,2 kb. A banda correspondente foi isolada do gel de agarose e utilizada posteriormente como sonda em "Northern blotting" e "Southern blotting".

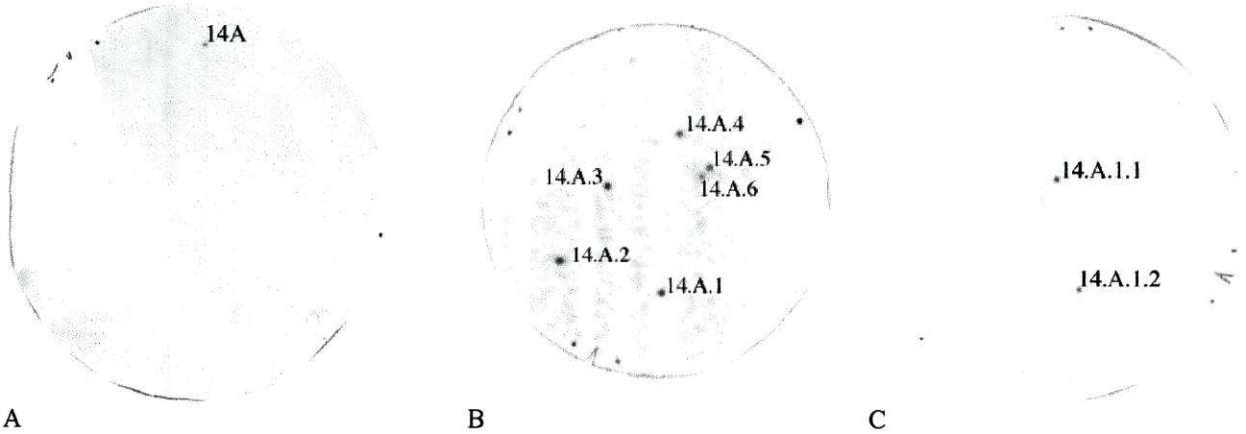


Fig. 71. Rastreio da biblioteca de cDNA de folha em Lambda gt11 *Sfi-Not* e isolamento dos fagos λ14.A.1.1 e λ14.A.1.2 com a sonda homóloga de cDNA obtida por PCR e marcada com ^{32}P, conforme descrito no texto. No 1° rastreio (A) a sonda hibridizava com uma placa fágica (14A). A zona contendo a placa fágica positiva foi removida e os fagos foram plaqueados a densidades sucessivamente mais baixas no 2ª (B) e 3° rastreio (C). Após a terceira fase de purificação (3° rastreio) a partir do fago 14, foram isoladas duas placas fágicas puras (14.A.1.1 e 14.A.1.2) que hibridizavam fortemente com a sonda.

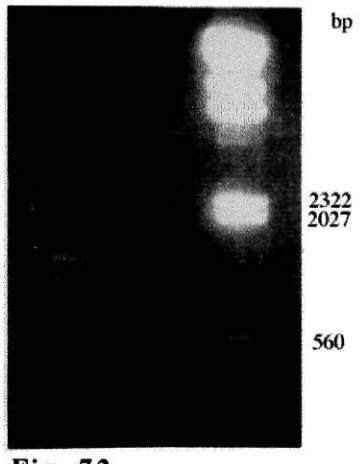


Fig. 72

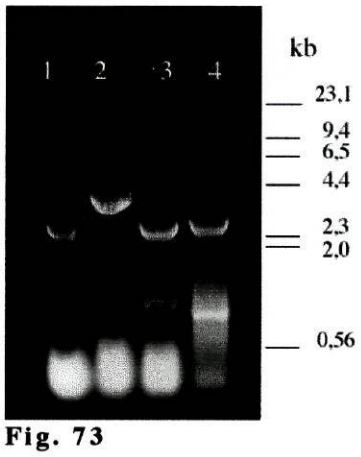


Fig. 73

Fig. 72. Electroforese do produto de amplificação por PCR do fragmento de inserção do fago λ14.A.1.2 em agarose 0,9%, corado com brometo de etídeo. Para amplificação do cDNA inserido no fago utilizaram-se iniciadores específicos para sequências do fago Lambda gt11 que flanqueiam o local de inserção. O tamanho do fragmento amplificado, assinalado com uma seta à esquerda da figura, foi estimado em cerca de 1,2 kb. Como marcador, utilizou-se o DNA de Lambda cortado com *Hin*dIII.

Fig. 73. Análise dos produtos da reacção de restrição do plasmídio pSK-14.A.1.2 em gel de agarose 0,8%. O plasmídio pSK-14.A.1.2 foi submetido a restrição simples com as enzimas *Eco*RI (pista2) e *Hin*dIII (pista4) e a restrição dupla com as enzimas *Eco*RI e *Not*I (pista 3). Na pista 1 está o plasmídeo pSK cortado com *Eco*RI, para comparação. A restrição simples do plasmídio pSK-14.A.1.2 om a enzima *Eco*RI linariza o plasmídeo; a restrição dupla com *Eco*RI e *Not*I leva à excisão do fragmento de inserção com aprox. 1,2 kb e a restrição com *Hin*dIII leva à excisão de um fragmento de cerca de 1000 bp.

ii) O fragmento de inserção foi excisado do fago com as enzimas *Eco*RI e *Not*I e clonado no plasmídio pBluescript SK (pSK-14.A.1.2) digerido com as mesmas enzimas. A análise de restrição do pSK-14.A.1.2 revelou que a restrição com *Eco*RI apenas linearizava o plasmídio, enquanto que a restrição dupla com *Eco*RI e *Not*I, levava à excisão do fragmento de inserção (Fig. 73). A enzima *Hin*dIII corta no interior do fragmento de inserção, como se pode observar pela obtenção de um fragmento com cerca de 1000 bp após restrição do pSK-14.A.1.2 com esta enzima. A localização de uma sequência de reconhecimento da *Hin*dIII na posição 972 do cDNA foi confirmada posteriormente por sequenciação.

iii) Uma sequenciação preliminar da extremidade 5' do cDNA inserido no pBluescript revelou uma forte homologia com sequências conhecidas de cDNA de GS, mas também revelou que este clone era parcial, não contendo a região 5' não traduzida e parte da sequência codificante.

iv) Para verificar se a excisão com *Eco*RI, de algum modo poderia ter fragmentado o cDNA, procedeu-se à sua excisão do fago com enzimas de menor frequência de corte (*Sfi*I e *Not*I) e subclonagem em plasmídio pGEM11Zf(+) (Promega). A posterior sequenciação das extremidades 5' e 3' do cDNA inserido revelou-se idêntica ao anteriormente verificado para o fragmento de cDNA isolado por restrição dupla com as enzimas *Eco*RI e *Not*I, pelo que se concluiu que a excisão do cDNA com as enzimas *Eco*RI e *Not*I não tinha fragmentado o cDNA. Este resultado foi ainda confirmado com a sequenciação directa da extremidade 5' do fragmento de inserção do fago amplificado por PCR, utilizando como iniciador uma sequência que hibridizava com a região do fago imediatamente adjacente ao local de clonagem múltipla.

Isolamento e caracterização do fago λJ9A12.2

Na expectativa de obter clones mais longos de cDNA, foi feito novo rastreio da biblioteca, tendo posteriormente sido isolado o fago λJ9A12.2.

Para confirmar a reacção das placas fágicas com a sonda foi feito um "dot blot" em que lisados dos fagos λ14.A.1.2 e λJ9A12.2 foram aplicados numa membrana de "nylon" que foi depois hibridizada com a sonda usada no rastreio da biblioteca. A sonda hibridizava com o DNA de ambos os fagos como pode observar-se na Fig. 74. Contudo, o fago λJ9A12.2 revelou possuir um fragmento de inserção de menores dimensões (aprox. 0,9 kb) do que o do λ14.A.1.2, tal como se pode ver pela análise por electroforese dos fragmentos de inserção de ambos os fagos, amplificados por PCR (Fig. 75).

O fragmento de inserção foi excisado do fago com as enzimas *Sfi*I e *Not*I e subclonado em plasmídio pGEM11Zf(+) (Promega). Quando se procedeu à sequenciação preliminar deste clone conclui-se que sequências do cDNA J9A12.2 se sobrepunham às do cDNA 14.A.1.2, tendo-se concluído que representavam o mesmo mRNA.

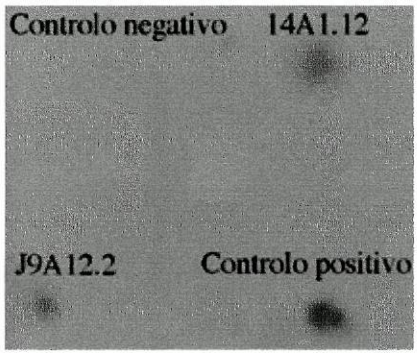


Fig. 74. "Dot blot" dos lisados dos fagos λJ9.A12.2 e λ14.A.1.2. Os lisados de fago foram aplicados em membrana de nylon e hibridizados com a mesma sonda de cDNA usada no rastreio da biblioteca. A sonda hibridiza com o DNA de ambos os fagos.

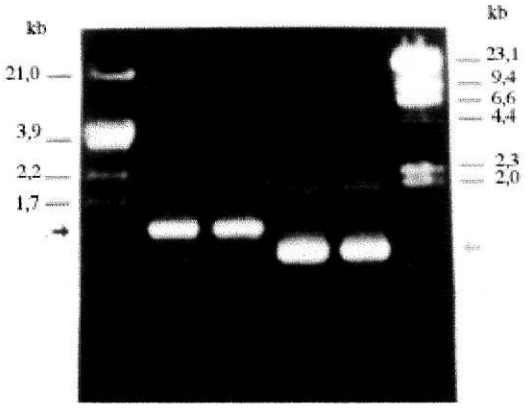


Fig. 75. Electroforese do produto de amplificação por PCR dos fragmentos de inserção dos fagos λJ9.A12.2 (pistas 1 e 2) e λ4.A.1.2. (pistas 3 e 4).

Sequenciação dos clones de cDNA de GS e análise de homologias

O cDNA 14.A.1.2 foi completamente sequenciado tendo sido utilizados na sequenciação além dos iniciadores M13 "universal" e M13 "reverso", que hibridizam com sequências presentes nos plasmídios usados, oligonucleotídeos iniciadores descritos na Tabela 4.

Os iniciadores GSF1 e GSF2, como já anteriormente descritos, foram usados para a síntese da sonda de cDNA por PCR e foram desenhados com base em sequências de cDNA de GS contidas nos bancos de dados e incluem cada um, um local *Eco*RI (GAAATTC). Os restantes iniciadores foram desenhados com base em sequências internas do cDNA 14A.1.2.

Tabela 4. Iniciadores utilizados na sequenciação do cDNA 14.A.1.2

Iniciadores a 5' (5-->3')

Nome	Sequência	posição no cDNA
GSF1	GAATTCTCCTGCTGGCGAGCC	81-95
GSF2	AATTGAGGGTGACTGGAACGGTGC	507-530
GSF3	GGAGTTGCTAACCGTGGTTGC	712-732

Iniciadores a 3' (Sequência complementar 5'-->3')

Nome	Sequência	posição no cDNA
GSR1	GAATTCTGTGAGCACCTGCACC	526-541
GSR2	TTGGATCGAGTGAGAGGACAACTCC	478-502
GSR3	AAGGGAATCTCAACAAGGTACAAGC	974-999

Na Fig. 76 estão representados ambos os clones e a estratégia de sequenciação utilizada.

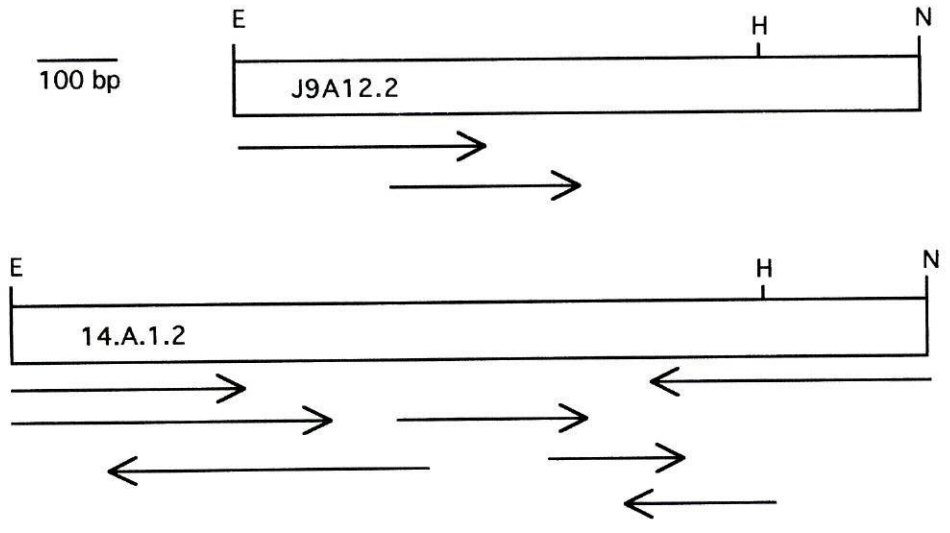
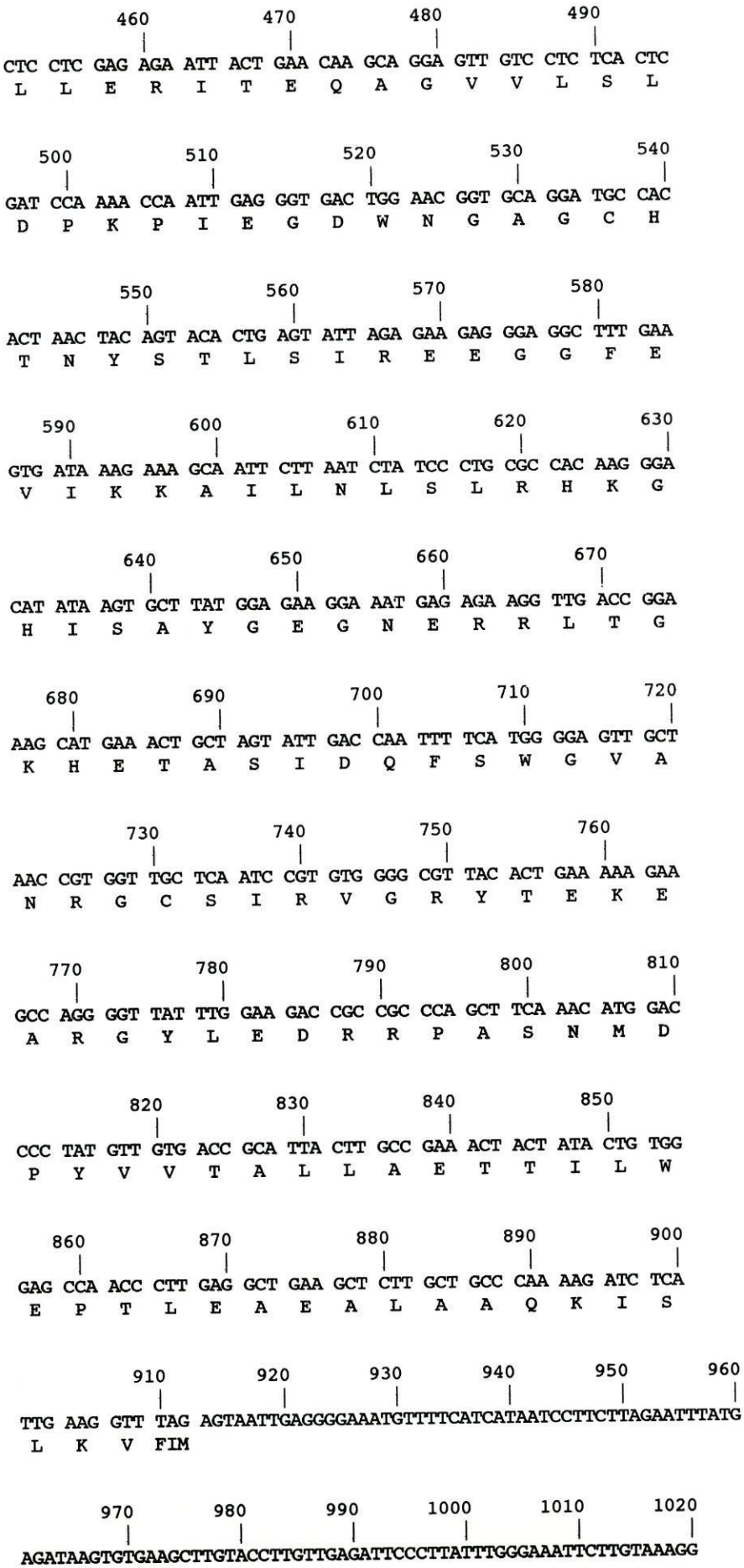


Fig. 76. Estratégia de sequenciação dos cDNAs 14.A.1.2 e J9A12.2. As setas indicam a direcção e a extensão das sequências determinadas. E, *Eco*RI, H, *Hin*dIII, N, *Not*I.

Análise da sequência de nucleotídeos

Na Fig. 77 está representada a sequência completa de nucleotídeos do cDNA 14.A.1.2 e da sequência de aminoácidos deduzida a partir daquela (as abreviaturas de aminoácidos estão descritas no Apêndice 2.1).

```
                10                  20                  30                  40
                |                   |                   |                   |
GTC ATT CTA TAT CCT CAG GCA ATA TTC AAA GAC CCT TTC CGT GGT
 V   I   L   Y   P   Q   A   I   F   K   D   P   F   R   G

    50                  60                  70                  80                  90
    |                   |                   |                   |                   |
GGT AAC AAC ATC TTG GTT ATC TGT GAT ACC TAC ACA CCA GCT GGA
 G   N   N   I   L   V   I   C   D   T   Y   T   P   A   G

                100                 110                 120                 130
                |                   |                   |                   |
GAG CCA ATT CCT ACA AAC AAA CGC CAT AAA GCT GCT CAA ATT TTT
 E   P   I   P   T   N   K   R   H   K   A   A   Q   I   F

    140                 150                 160                 170                 180
    |                   |                   |                   |                   |
AGC GAC CCA AAA GTT GCA TCT CAA GTT CCA TGG TTT GGA ATA GAA
 S   D   P   K   V   A   S   Q   V   P   W   F   G   I   E

                190                 200                 210                 220
                |                   |                   |                   |
CAA GAG TAC ACC TTA CTC CAG CCA AAT GTT AAC TGG CCC TTA GGT
 Q   E   Y   T   L   L   Q   P   N   V   N   W   P   L   G

    230                 240                 250                 260                 270
    |                   |                   |                   |                   |
TGG CCT GTT GGA GGC TAT CCT GGC CCA CTA GGT TCT TAC TAC TGT
 W   P   V   G   G   Y   P   G   P   L   G   S   Y   Y   C

                280                 290                 300                 310
                |                   |                   |                   |
GGT GCT GGA GTG GAA AAG TCA TTT GGC CGA GAT ATA TCA GAT GCT
 G   A   G   V   E   K   S   F   G   R   D   I   S   D   A

    320                 330                 340                 350                 360
    |                   |                   |                   |                   |
CAC TAC AAG GCT TGC CTG TAT GCT GGA ATT AAC ATT AGT GGT ACT
 H   Y   K   A   C   L   Y   A   G   I   N   I   S   G   T

                370                 380                 390                 400
                |                   |                   |                   |
AAC GGA GAG GTT ATG CCA GGA CAG TGG GAA TTT CAA GTA GGA CCT
 N   G   E   V   M   P   G   Q   W   E   F   Q   V   G   P

    410                 420                 430                 440                 450
    |                   |                   |                   |                   |
AGT GTT GGA ATT GAA GGT GGA GAT CAT ATC TGG TGT GCT AGA TAC
 S   V   G   I   E   G   G   D   H   I   W   C   A   R   Y
```


460 470 480 490
CTC CTC GAG AGA ATT ACT GAA CAA GCA GGA GTT GTC CTC TCA CTC
L L E R I T E Q A G V V L S L
500 510 520 530 540
GAT CCA AAA CCA ATT GAG GGT GAC TGG AAC GGT GCA GGA TGC CAC
D P K P I E G D W N G A G C H
550 560 570 580
ACT AAC TAC AGT ACA CTG AGT ATT AGA GAA GAG GGA GGC TTT GAA
T N Y S T L S I R E E G G F E
590 600 610 620 630
GTG ATA AAG AAA GCA ATT CTT AAT CTA TCC CTG CGC CAC AAG GGA
V I K K A I L N L S L R H K G
640 650 660 670
CAT ATA AGT GCT TAT GGA GAA GGA AAT GAG AGA AGG TTG ACC GGA
H I S A Y G E G N E R R L T G
680 690 700 710 720
AAG CAT GAA ACT GCT AGT ATT GAC CAA TTT TCA TGG GGA GTT GCT
K H E T A S I D Q F S W G V A
730 740 750 760
AAC CGT GGT TGC TCA ATC CGT GTG GGG CGT TAC ACT GAA AAA GAA
N R G C S I R V G R Y T E K E
770 780 790 800 810
GCC AGG GGT TAT TTG GAA GAC CGC CGC CCA GCT TCA AAC ATG GAC
A R G Y L E D R R P A S N M D
820 830 840 850
CCC TAT GTT GTG ACC GCA TTA CTT GCC GAA ACT ACT ATA CTG TGG
P Y V V T A L L A E T T I L W
860 870 880 890 900
GAG CCA ACC CTT GAG GCT GAA GCT CTT GCT GCC CAA AAG ATC TCA
E P T L E A E A L A A Q K I S
910 920 930 940 950 960
TTG AAG GTT TAG AGTAATTGAGGGGAAATGTTTTCATCATAATCCTTCTTAGAATTTATG
L K V FIM
970 980 990 1000 1010 1020
AGATAAGTGTGAAGCTTGTACCTTGTTGAGATTCCCTTATTTGGGAAATTCTTGTAAAGG

```
      1030        1040        1050        1060        1070        1080
        |           |           |           |           |           |
AATTCAAAATTTAACCAGTTCATCCTAGAAAGAGGTTCCTTAAGACATGAGACTACTTTG

      1090        1100        1110        1120        1130        1140
        |           |           |           |           |           |
GAGTTGAGGTGTAATTGTTGGACTACTTTGAACATCTTTACCTTTCTTTTCTCCAGATGA

      1150        1160        1170        1180        1190
        |           |           |           |           |
ATCCATTTCTCTGAAATTCCAATTGGTGTGATTTTTCCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

Fig. 77. Sequência de nucleótidos e sequência de aminoácidos deduzida do cDNA 14.A.1.2.

Estão representados 1199 nucleotídeos que codificam um polipeptídeo de 303 resíduos de aminoácidos e incluem, após o codão STOP, uma porção de 268 nucleotídeos na região não codificante a 3', mais a cauda poli(A), a partir do nucleótido 1180. Não foram encontradas presumíveis sinais de poliadenilação. Os mRNAs de GS não possuem normalmente a sequência AAUAAA, localizada 10-30 bases a montante do local de poliadenilação em quase todos os mRNAs de eucarióticos (Forde e Cullimore, 1989) ou possuem uma variante, sendo a sequência mais comum AAUAAU/C (Forde e Cullimore, 1989) tendo Lightfoot et al (1988) proposto a sequência AATAT como sinal de poliadenilação num cDNA codificando uma GS plastidial de feijoeiro. Contudo, nenhum destes motivos foi encontrado na sequência 3' não codificante do cDNA 14.A.1.2.

A sequência obtida foi comparada com sequências existentes em bases de dados para busca de homologias, utilizando os algorítmos FASTA (Pearson e Lipman, 1988) e BLAST (Altschul et al, 1990) (Apêndices 2.2-2.5).

O programa FASTA (Apêndice 2.5) utiliza as sequências constando do banco de dados EMBL versão em CD-ROM incluída na aplicação "PC-GENE® Databanks, Release 18.0, December, 1996". A pesquisa de homologias foi feita apenas com as sequências da divisão de plantas (PLN) do EMBL.

O programa BLAST (Apêndice 2.3) foi utilizado através de correio electrónico e utiliza os bancos de dados GenBank, EMBL, DDBJ, PDB (Apêndice 2.2).

Por facilidade de utilização de outras aplicações do PC-GENE (alinhamentos, selecção de subconjuntos de bases de dados e listagem do seu conteúdo) as sequências consideradas em posteriores comparações foram as constantes no EMBL, versão em CD-ROM, incluída na aplicação PC-GENE. Contudo, a tabela de resultados obtida com a aplicação do programa BLAST encontra-se no Apêndice 2.3.

A comparação da sequência completa de nucleótidos do cDNA 14.A.1.2 com sequências de ácidos nucleicos de plantas do EMBL revelou uma homologia elevada com cDNAs codificando subunidades cloroplastidiais de GS, particularmente com a sequência NSGS2AA que representa um mRNA de GS2 de *Nicotiana sylvestris*. Este resultado foi obtido com o programa FASTA (85,9 % de homologia com 993 bases idênticas em 1156) e com o programa

BLAST (88 % de homologia com 809 bases idênticas em 910). De notar que o programa FASTA introduz espaços entre as bases para optimizar o alinhamento de duas sequências enquanto que o programa BLAST alinha duas sequências sem introduzir espaços.

Na Fig. 78 está representado o resultado parcial da aplicação do programa FASTA, encontrando-se listadas as 10 sequências que apresentam maior homologia com o cDNA 14.A1.2. e o alinhamento das sequências cDNA 14.A.1.2 e NSGS2AA.

Nb	Sequence name	InitN	Init1	Opt	Overlap size	Match in overlap (%)	Position in 14.A.1.2
1	NSGS2AA	3087	2941	3324	1156	85.9	1 - 1141
2	PVGSCH	2525	2525	2559	921	82.4	1 - 921
3	PSCHGS2A	2338	2338	2419	921	80.2	1 - 921
4	PSGSR2	2338	2338	2419	921	80.2	1 - 921
5	BNGLUS	2329	2263	2390	924	80.1	1 - 923
6	S69727	2306	2306	2357	939	78.9	1 - 939
7	ZMGS2	2270	2270	2270	924	77.8	1 - 924
8	OSSIGS31	2150	2150	2212	920	77.1	1 - 920
9	HVGLN2	2031	2031	2097	921	75.2	1 - 921
10	HVGLN2R	2031	2031	2097	921	75.2	1 - 921

```
14.A.1.2        1- GTCATTCTATATCCTCAGGCAATATTCAAAGACCCTTTCCGTGGTGGTAA
                   x:::::::::: :::::::::::::: :::::::::::::::::::::::
NSGS2AA       454- GTCATTCTATACCCTCAGGCAATATTTAAAGACCCTTTCCGTGGTGGTAA

14.A.1.2       51- CAACATCTTGGTTATCTGTGATACCTACACACCAGCTGGAGAGCCAATTC
                   ::::::::::::::::::::::: :::::::::::::::::::::::::::
NSGS2AA       504- CAACATCTTGGTTATCTGTGATGCCTACACACCAGCTGGAGAGCCAATTC

14.A.1.2      101- CTACAAACAAACGCCATAAAGCTGCTCAAATTTTTAGCGACCCAAAAGTT
                   :  ::::::::::::::::::::::::: :::::::::::: ::::::::
NSGS2AA       554- CATCAAACAAACGCCATAAAGCTGCTCAGATTTTTAGCGACTCAAAAGTT

14.A.1.2      151- GCATCTCAAGTTCCATGGTTTGGAATAGAACAAGAGTACACCTTACTCCA
                   : :::: :::::::::::::: : ::::::::::::::::::::::::::::
NSGS2AA       604- GTATCTGAAGTTCCATGGTTCGAAATAGAACAAGAGTACACCTTACTCCA

14.A.1.2      201- GCCAAATGTTAACTGGCCCTTAGGTTGGCCTGTTGGAGGCTATCCTGGCC
                    : ::::::: :: ::::: ::::::::::::::::::::::::::::::
NSGS2AA       654- ACAAAATGTGAAGTGGCCTTTAGGTTGGCCTGTTGGAGGCTATCCTGGTA

14.A.1.2      251- CACTAGGTTCTTACTACTGTGGTGCTGGAGTGGAAAAGTCATTTGGCCGA
                   : :  ::: :::::::::   ::::::::: ::: ::::::::::::::
NSGS2AA       704- CTCAGGGTCCTTACTACTTGTGTGCTGGAGCGGATAAGTCATTTGGCCTT

14.A.1.2      301- GATATATCAGATGCTCACTACAAGGCTTGCCTGTATGCTGGAATTAACAT
                   :::::::::::::::::::::::::::::: ::::::::::::::::::::
NSGS2AA       754- GATATATCAGATGCTCACTACAAGGCTTGTCTGTATGCTGGAATTAACAT

14.A.1.2      351- TAGTGGTACTAACGGAGAGGTTATGCCAGGACAGTGGGAATTTCAAGTAG
                   :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::: ::::
NSGS2AA       804- TAGTGGTACTAACGGAGAGGTTATGCCAGGACAGTGGGAATTTCAGGTAG

14.A.1.2      401- GACCTAGTGTTGGAATTGAAGGTGGAGATCATATCTGGTGTGCTAGATAC
                   : :::::::::::: ::::::: ::::::::: :::::::: :: ::::::
NSGS2AA       854- GTCCTAGTGTTGGGATTGAAGCTGGAGATCACATCTGGTGCGCCAGATAC

14.A.1.2      451- CTCCTCGAGAGAATTACTGAACAAGCAGGAGTTGTCCTCTCACTCGATCC
                    :::: :::::::::::::: :::::::::::::: :::::::: :::::
NSGS2AA       904- ATCCTTGAGAGAATTACTGGACAAGCAGGAGTTGTTCTCTCACTTGATCC
```

```
14.A.1.2      501- AAAACCAATTGAGGGTGACTGGAACGGTGCAGGATGCCACACTAACTACA
                   ::::::::::::::: :::::::: ::::: ::::::::::::::::::::
NSGS2AA       954- AAAACCAATTGAGGGCGACTGGAATGGTGCCGGATGCCACACTAACTACA

14.A.1.2      551- GTACACTGAGTATTAGAGAAGAGGGAGGCTTTGAAGTGATAAAGAAAGCA
                   ::::::: ::::: :::::::::.::::: :::::::: ::::::::::::
NSGS2AA      1004- GTACACTAAGTATGAGAGAAGATGGAGGATTTGAAGTAATAAAGAAAGCA

14.A.1.2      601- ATTCTTAATCTATCCCTGCGCCACAAGGGACATATAAGTGCTTATGGAGA
                   : ::: ::::: ::::: :::::::::: ::::::: ::: ::::::::
NSGS2AA      1054- AATCTGAATCTCTCCCTTCGCCACAAGGAGCATATAAATGCATATGGAGA

14.A.1.2      651- AGGAA-ATGAGAGAAGGTTGACCGGAAAGCATGAAACTGCTAGTATTGAC
                    ::::     ::::: :::::: ::::: :::::::::::: :: ::::::
NSGS2AA      1104- GGGAATCCTCGAGAA-GTTGACTGGAAACCATGAAACTGCAAGCATTGAC

14.A.1.2      700- CAATTTTCATGGGGAGTTGCTAACCGTGGTTGCTCAATCCGTGTGGGGCG
                   ::::::::::::::::::    :::::::  ::::::::::::::::
NSGS2AA      1153- AAATTTTCATGGGGAGTTGCATTCCGTGGTGCCTCAATCCGTGTGGGCGC

14.A.1.2      750- TTACACTGAAAAAGAAGCCAGGGGTTATTTGGAAGACCGCCGCCCAGCTT
                   : ::::::: ::  ::: ::  :::::::::::::::::::: :::::::
NSGS2AA      1203- TGACACTGAGAAGCAAGGCAAAGGTTATTTGGAAGACCGCCGTCCAGCTT

14.A.1.2      800- CAAACATGGACCCCTATGTTGTGACCGCATTACTTGCCGAAACTACTATA
                   :::::::::::::::::::::::::: : ::::::::::::::::::::
NSGS2AA      1253- CAAACATGGACCCCTATGTTGTGACTGGATTACTTGCCGAAACTACTATT

14.A.1.2      850- CTGTGGGAGCCAACCCTTGAGGCTGAAGCTCTTGCTGCCCAAAAGATCTC
                   ::::::::::::::  :::::::::::::::::::: :::::: :: :
NSGS2AA      1303- CTGTGGGAGCCAACCAATGAGGCTGAAGCTCTTGCTGCTCAAAAGCTCGC

14.A.1.2      900- ATTGAAG--------GTTTAGAGTAATTGAGGGGAAATGTTTTCATCATAA
                   : ::::: v     :^::  : :: :: :::: : :: :  ::  :::::
NSGS2AA      1353- ACTGAAGGTATGATGTTTTAATTATTTAAGGGCAGAT-TGATC--CATAA

14.A.1.2      943- TCCTTCTTAGAATTTATGA---GATAAGTG-TGAAGCTTGTACCTTGTTG
                   : ::::::::: :: ::::   : ::::::  ::: ::::::::::::::
NSGS2AA      1400- T-CTTCTTAGAGTTCATGATCTGCTAAGTGAAGAAACTTGTACCTTGTTT

14.A.1.2      989- AGATTCCCTTATTTGGGAAATTCTTGTAAAGGAATTCAAAATTTAACCAG
                   :::::   :: :: :::::: :::::::::::::  :: ::::: : :::
NSGS2AA      1449- AGATTGGGTT-TTAGGGAAAATCTTGTAAAGGAA-CCACAATTT-ATCAG

14.A.1.2     1039- TTCATCCTA-GAAAGAGGTTCCTTAAGAC-ATGAGACTACTTTGGAGTTG
                   ::  :::::  :::::::::::::::::: :::::::
NSGS2AA      1496- TTATTCCTATAAAAGAGGTTCCTTAAGACAATGAGAC-------------

14.A.1.2     1087- AGGTGTAATTGTTGG-ACTACTTTGAACATCTTTACCTTTCTTTTCTCCA
                      :::::::::::: :::::::::::::: :::: ::::: ::::::::
NSGS2AA      1532- ---TGTAATTGTTGGAACTACTTTGAACATATTTATCTTTC-TTTCTCCA

14.A.1.2     1136- GATGAA
                   ::::::
NSGS2AA      1579- GATGAA

993 bases of a 1156 nucleotide overlap are identical ( 85.9%)
```

Fig. 78. Resultado parcial da aplicação do programa FASTA, encontrando-se listadas as 10 sequências da divisão plantas do EMBL que apresentam maior homologia com o cDNA total 14.A1.2 e o alinhamento optimizado das sequências cDNA 14.A.1.2 e NSGS2AA. Para explicação dos parâmetros da tabela consultar Apêndice 2.6. Identificação das sequências listadas: NSGS2AA, mRNA de GS2 de *Nicotiana sylvestris*; PVGSCH, mRNA de GS plastidial de *Phaseolus vulgaris*; PSCHGS2A, mRNA de GS2 cloroplastidial de *Pisum sativum*; PSGSR2, mRNA de GS de folha de *Pisum sativum*; BNGLUS, mRNA da GS de *Brassica napus*; S69727, mRNA de GS regulada pela luz de *Arabidopsis thaliana*; ZMGS2, mRNA de GS2 de *Zea mays*; OSSIGS31, mRNA de GS2 cloroplastidial de caules de *Oryza sativa*; HVGLN2, mRNA do percursor de GS de *Hordeum vulgare*; HVLN2R, mRNA de GS2 de *Hordeum vulgare*.

Informações adicionais sobre as referidas sequências (por exemplo nº de acesso, etc.) podem ser encontradas no Apêndice 2.6.

Pelo alinhamento das sequências cDNA 14.A.1.2 e NSGS2AA, pode ver-se que a homologia se inicia no nucleótido 454 da sequência NSGS2AA.

Estes resultados permitiram concluir que o cDNA 14.A.1.2 codifica parte da GS cloroplastidial de *Solanum tuberosum*, mas que se encontra truncado a 5', não possuindo a sequência não traduzida a 5' e parte da região que codifica a extremidade N-terminal da proteína. Por comparação com esta sequência estima-se que o clone de cDNA isolado corresponde a 71,4% do clone completo.

É de notar que, exceptuando a sequência NSGS2AA, as homologias observadas com as outras sequências ocorrem aproximadamente entre os nucleótidos 1-920 da sequência 14.A.1.2, que compreende a zona codificante. O que está de acordo com os resultados obtidos entre sequências de cDNAs GS de várias plantas em que se verifica um elevado grau de homologia, ocorrendo as diferenças principalmente na zona não traduzida a 3' (Forde e Cullimore, 1989). Contudo, era evidente a existência de homologia significativa entre sequências da zona não traduzida a 3' de 14.A.1.2 e NSGS2AA. Procedeu-se, então, à busca de homologias pelo programa FASTA e BLAST, utilizando, para comparação, apenas a sequência não traduzida a 3' até ao local de poliadenilação.

O que é de notar, por ser inesperado, é que a sequência não codificante a 3' (268 bases) apresentava uma elevada percentagem de homologia (75,8 %) com 179 bases idênticas em 236 bases com a região não codificante a 3' da sequência NSGS2AA. A homologia com as outras sequências não é significativa não sendo listada a seguir à sequência NSGS2AA, nenhuma sequência de GS, mesmo das formas cloroplastidiais.

Uma busca de homologias com a mesma sequência a 3' não codificante (268 bases) através do programa BLAST, forneceu a homologia mais elevada de 74 % com 185 bases idênticas em 247, sem introdução de espaços, com a sequência LEU15059 que corresponde a uma sequência parcial de cDNA, contendo a extremidade 3', de GS cloroplastidial de *Lycopersicon esculentum*, obtida do GenBank (Fig. 79). Através do programa BLAST, obtiveram-se homologias de subsequências da região não codificante 14.A.1.2 com subsequências de NSGS2AA (o programa BLAST não inclui espaços para efectuar os alinhamentos) e não forneceu qualquer outra homologia significativa (ver Apêndice 2.3, Fig. A2.2).

O motivo AUUUA, que se pensa estar envolvido desestabilização de transcritos (Walker et al, 1995) pode ser encontrado nas regiões não codificantes a 3' das três sequências, existindo em duas cópias no 14.A.1.2 (954 e 1029) e no cDNA de *Lycopersicon esculentum* (619 e 694) e em três cópias no cDNA de *Nicotiana sylvestris* (posições 1376, 1487 e 1559).

```
>gb|U15059|LEU15059 Lycopersicon esculentum chloroplast glutamine synthetase
          (gs) mRNA, partial cds.
          Length = 824

  Plus Strand HSPs:

 Score = 677 (187.1 bits), Expect = 1.0e-48, P = 1.0e-48
 Identities = 185/247 (74%), Positives = 185/247 (74%), Strand = Plus / Plus

Query:     1 AGTAATTGAGGGGAAATGTTTTCATCATAATCCTTCTTAGAATTTATGAGATAAGTGTGA 60
             ||||  ||||||||||  |||    |  |  | ||||||||||||||||||||||
Sbjct:   578 AGTATATGAGGGGAAATTGTTTTCATAATAATCCTCTTAGAATTTATGAGATAAGTTCTG 637

Query:    61 AGCTTGTACCTTGTTGAGATTCCCTTATTTGGGAAATTCTTGTAAAGGAATTCAAAATTT 120
             |   |    | |  |    || || |  || || ||    |   || | |  ||||||||
Sbjct:   638 AAGCTTGTACCTTGTTGAGTTTCCCTTATTTGGGAAAATCTTGTAAAGGAACCAAAATTT 697

Query:   121 AACCAGTTCATCCTAGAAAGAGGTTCCTTAAGACATGAGACTACTTTGGAGTTGAGGTGT 180
             | |   |    |   ||| ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:   698 ACCAGTTCATCCTAGAAAATAGGTTTCTTAAGACATGAGACTACTTTGGAGTTGAGGTGT 757

Query:   181 AATTGTTGGACTACTTTGAACATCTTTACCTTTCTTTTCTCCAGATGAATCCATTTCTCT 240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:   758 AATTGTTGGACTACTTTGAACATCTTTACCTTTCTTTTCTCCAGATGAATCCATTTCTCT 817

Query:   241 GAAATTC 247
             |||||||
Sbjct:   818 GAAATTC 824
```

Fig. 79. Alinhamento das zonas de elevada homologia entre a sequência não codificante a 3' do cDNA 14.A.1.2 (query) com a sequência parcial de cDNA de GS2 de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), obtida através do programa BLAST. Os motivos ATTTA estão sublinhados.

Análise da sequência de aminoácidos

A análise da sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos permitiu identificar os principais segmentos conservados em todas as sequências de aminoácidos de GS de planta (regiões I, II, III e IV) (Fig. 80) e ainda uma extensão de 16 aminoácidos na extensão C-terminal, característica das subunidades cloroplastidiais da GS (Forde e Cullimore, 1989).

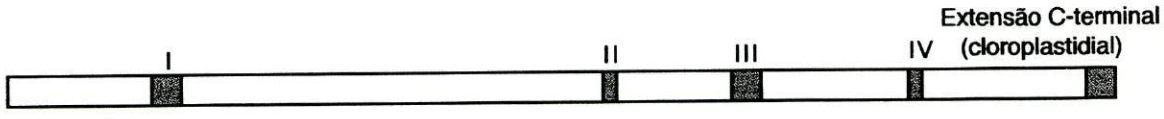


Fig. 80. Diagrama da localização das quatro sequências altamente conservadas nos polipeptídeos da GS e da extensão C-terminal de 16 aminoácidos conservada nos polipeptídeos da GS cloroplastidial.

Na Fig. 81 pode observar-se o resultado do alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida do cDNA 14.A.1.2 com várias sequências de aminoácidos de GS2 e GS1 de várias plantas (as abreviaturas de aminoácidos estão descritas no Apêndice 1).

```
14PROTEINA  ------------------------------------------------------------   0
GLN2_PEA    MA--QILAPSTQWQMRIT------KTSPCATPITSKMWSSLVMKQTKKVAHSAKF   47
GLN4_PHAVU  MA--QILAPSTQWQMRFT------KSSRHASPITSNTWSSLLMKQNKKTS-SAKF   46
GLN2_HORVU  MQVRRDDDGAGGCAGDAVPGGGEGQDGVPARQPAGRVW---GVSRAARA--TSGF   50
GLN2_ORYSA  MA--QAVVPAMQCQVGAVRA-----RPAAAAAAAGGRVW---GVRRTGRG--TSGF   44
GLNC_MAIZE  MA--QAVVPAMQCRVGV-------------KAAAGRVWSA-GRTRTGRGGASPGF   39
GLN1_ORYSA  MAN---------------------------------------------------   3
GLN1_MAIZE  MAS---------------------------------------------------   3
GLN5_MAIZE  MAS---------------------------------------------------   3
GLN1_PEA    MSS---------------------------------------------------   3
GLN2_PHAVU  MSL---------------------------------------------------   3

14PROTEINA  ------------------------------------------------------------   0
GLN2_PEA    RVMAVNSEN-GTINRVEDLLNLDITPFTDSIIAEYIWIGGTGIDVRSKSRTISKP   101
GLN4_PHAVU  RVLAVKSDG-STINRLEGLLNLDITPFTDKIIAEYIWIGGTGIDVRSKSRTISKP   100
GLN2_HORVU  KVLALGPETTGVIQRMQQLLDMDTTPFTDKIIAEYIWVGGSGIDLRSKSRTISKP   105
GLN2_ORYSA  RVMAVSTETTGVVTRMEQLLNMDTTPFTDKIIAEYIWVGGTGIDLRSKSRTISKP   99
GLNC_MAIZE  KVMAVSTGSTGVVPRLEQLLNMDTTPYTDKVIAEYIWVGGSGIDIRSKSRTISKP   94
GLN1_ORYSA  ---------------LTDLVNLNLSDCSDKIIAEYIWVGGSGIDLRSKARTVKGP   43
GLN1_MAIZE  ---------------LTDLVNLDLSDCTDRIIAEYIWIGGTGIDLRSKARTVKGP   43
GLN5_MAIZE  ---------------LTDLVNLDLSDCTDKIIAEYIWVGGSGIDLRSKARTVKGP   43
GLN1_PEA    ---------------LSDLINFNLSDSTEKIIAEYIWVGGSGIDIRSKARTLPGP   43
GLN2_PHAVU  ---------------LSDLINLNLSESTEKIIAEYIWVGGSGMDLRSKARTLPGP   43

                                I
14PROTEINA  ----------===============VILYPQAIFKDPFRGGNNILVICDTYTPA   29
GLN2_PEA    VSHPSEVPKWNYDGSSTGQAPGEDSEVILYPQAIFKDPFRGGNNILVVCDAYTPA   156
GLN4_PHAVU  VEHPSELPKWNYDGSSTGQAPGEDSEVILYPQAIFKDPFRGGNNILVICDAYTPA   155
GLN2_HORVU  VEDPSELPKWNYDGSSTGQAPGEDSEVILYPQAIFKDPFRGGNNILVICDTYTPQ   160
GLN2_ORYSA  VEDPSELPKWNYDGSSTGQAPGEDSEVILYPQAIFKDPFRGGNNILVMCDTYTPA   154
GLNC_MAIZE  VEDPSELPKWNYDGSSTGQAPGEDSEVILYPQAIFKDPFRGGNNVLVICDTYTPQ   149
GLN1_ORYSA  ITDVSQLPKWNYDGSSTGQAPGEDSEVILYPQAIFKDPFRRGDNILVMCDCYTPQ   98
GLN1_MAIZE  ITDPIQLPKWNYDGSSTGQAPGEDSEVILYPQAIFKDPFRKGNHILVMCDCYTPQ   98
GLN5_MAIZE  ITDPSQLPKWNYDGSSTGQAPGEDSEVILYPQAIFKDPFRKGNNILVMCDCYTPQ   98
GLN1_PEA    VSDPAKLPKWNYDGSSTNQAPGKDSEVILYPQAIFKDPFRRGNNILVICDVYTPA   98
GLN2_PHAVU  VDDPAKLPKWNYDGSSTDQAPGDDSEVILYPQAIFKDPFRRGNNILVICDVYTPA   98
                                  ************** *...**.** ***.

14PROTEINA  GEPIPTNKRHKAAQIFSDPKVASQVPWFGIEQEYTLLQPNVNWPLGWPVGGYPGP   84
GLN2_PEA    GEPIPTNKRHRAAEIFSNPKVEAEIPWYGIEQEYTLLQTNVKWPLGWPVGGYPGP   211
GLN4_PHAVU  GEPIPTNKRHRAAEVFSNPRVIAEVPWFGIEQEYTLLQTNVNWPLGWPVGGYPGP   210
GLN2_HORVU  GEPIPTNKRHMAAQIFSDPKVTSQVPWFGIEQEYTLMQRDVNWPLGWPVGGYPGP   215
GLN2_ORYSA  GEPIPTNKRNRAAQVFSDPKVVSQVPWFGIEQEYTLLQRDVNWPLGWPVGGYPGP   209
GLNC_MAIZE  GEPLPTNKRHRAAQIFSDPKVGEQVPWFGIEQEYTLLQKDVNWPLGWPVGGFPGP   204
GLN1_ORYSA  GEPIPTNKRHSAAKIFSHPDVVAEVPWYGIEQEYTLLQKDVNWPLGWPVGGFPGP   153
GLN1_MAIZE  GEPIPTNKRYSAAKVFSHPDVAAEVPWYGIEQEYTLLQKDVSWPLGWPVGGYPGP   153
GLN5_MAIZE  GEPIPSNKRYKAATVFSHPDVAAEVPWYGIEQEYTLLQKDLSWPLGWPVGGYPGP   153
GLN1_PEA    GEPLPTNKRYNAAKIFSHPDVAAEVPWYGIEQEYTLLQKDINWPLGWPIGGYPGK   153
GLN2_PHAVU  GEPLPTNKRYDAAKIFSHPDVVAEVPWYGIEQEYTLLQKDVNWPLGWPLGGYPGP   153
            ***.*.***  ** .**.* * ...**.********.* ...******.**.**

                                                  II
14PROTEINA  LGSYYCGAGVEKSFGRDISDAHYKACLYAGINISGTNGEVMPGQWEFQVGPSVGI   139
GLN2_PEA    QGPYYCAAGADKSFGRDISDAHYKACIYAGINISGTNGEVMPGQWEYQVGPSVGI   266
GLN4_PHAVU  QGPYYCSAGADKSFGRDISDAHYKACLFAGINISGTNGEVMPGQWEYQVGPSVGI   265
GLN2_HORVU  QGPYYCAVGSDKSFGRDISDAHYKACLYAGIEISGTNGEVMPGQWEYQVGPSVGI   270
GLN2_ORYSA  QGPYYCAVGSDKSFGRDISDAHYKACLYAGINISGTNGEVMPGQWEYQVGPSVGI   264
GLNC_MAIZE  QGPYYCAVGADKSFGRDISDAHYKACLYAGINISGTNGEVMPGQWEYQVGPSVGI   259
GLN1_ORYSA  QGPYYCAAGAEKAFGRDIVDAHYKACIYAGINISGINGEVMPGQWEFQVGPSVGI   208
GLN1_MAIZE  QGPYYCAAGADKAFGRDVVDAHYKACLYAGINISGINGEVMPGQWEFQVGPSVGI   208
GLN5_MAIZE  QGPYYCAAGADKAFGRDVVDAHYKACLYAGINISGINGEVMPGQWEFQVGPSVGI   208
GLN1_PEA    QGPYYCGIGADKAYGRDIVDAHYKACLFAGINISGINGEVMPGQWEFQVGPSVGI   208
GLN2_PHAVU  QGPYYCGVGADKAYGRDIVDAHYKACVYAGINISGINGEVMPGQWEFQVGPSVGI   208
             *.***. * .*..***. *******..***.***.**********.********
```

```
                                          III     °
14PROTEINA  EGGDHIWCARYLLERITEQAGVVLSLDPKPIEGDWNGAGCHTNYSTLSIREEGGF  194
GLN2_PEA    EAGDHIWASRYILERITEQAGVVLTLDPKPIEGDWNGAGCHTNYSTKSMREDGGF  321
GLN4_PHAVU  EAGDHIWASRYILERITEQAGVVLSLDPKPIEGDWNGAGCHTNYSTKSMREDGGF  320
GLN2_HORVU  DAGDHIWASRYILERITEQAGVVLTLDPKPIQGDWNGAGCHTNYSTLSMREDGGF  325
GLN2_ORYSA  EAGDHIWISRYILERITEQAGVVLTLDPKPIQGDWNGAGCHTNYSTKSMREDGGF  319
GLNC_MAIZE  EAGDHIWISRYILERITEQAGVVLTLDPKPIQGDWNGAGCHTNYSTKTMREDGGF  314
GLN1_ORYSA  AAADQVWVARYILERVTEVAGVVLSLDPKPIPGDWNGAGAHTNFSTKSMREPGGY  263
GLN1_MAIZE  SAGDEIWVARYILERITEMAGIVLSLDPKPIKGDWNGAGAHTNYSTKSMREAGGY  263
GLN5_MAIZE  SAGDEIWVARYILERITEMAGIVLSLDPKPIKGDWNGAGAHTNYSTKSMREAGGY  263
GLN1_PEA    SAGDEIWAARYILERITEIAGVVVSFDPKPIPGDWNGAGAHANFSTKSMRENGGY  263
GLN2_PHAVU  SAGDEVWAARYILERITELAGAVVSFDPKPIPGDWNGAGAHSNYSTKSMREEGGY  263
            ...*..* .**.***.** ** *...***** ******* *.*. * ..** **.

                                                        °IV
14PROTEINA  EVIKKAILNLSLRHKGHISAYGEGNERRLTGKHETASIDQFSWGVANRGCSIRVG  249
GLN2_PEA    EVIKKAILNLSLRHKIHIEAYGEGNERRLTGKHETASINDFSWGVANRGCSIRVG  376
GLN4_PHAVU  EVIKKAILNLSLRHKEHISAYGEGNERRLTGKHETASINTFSWGVANRGCSIRVG  375
GLN2_HORVU  DVIKKAILNLSLRHDLHIAAYGEGNERRLTGLHETASISDFSWGVANRGCSIRVG  380
GLN2_ORYSA  EVIKKAILNLSLRHDLHISAYGEGNERRLTGLHETASIDNFSWGVANRGCSIRVG  374
GLNC_MAIZE  EEIKRAILNLSLRHDLHISAYGEGNERRLTGKHETASIGTFSWGVANRGCSIRVG  369
GLN1_ORYSA  EVIKKAIDKLALRHKEHIAAYGEGNERRLTGRHETADINTFKWGVANRGASIRVG  318
GLN1_MAIZE  EVIKAAIDKLGKRHKEHIAAYGEGNERRLTGRHETADINTFKWGVANRGASIRVG  318
GLN5_MAIZE  EVIKEAIEKLGRRHREHIAAYGEGNERRLTGRHETADINTFKWGVANRGASIRVG  318
GLN1_PEA    EVIKKAIEKLGLRHKEHIAAYGEGNERRLTGKHETADINVFSWGVANRGSSIRVG  318
GLN2_PHAVU  EVIKKAIEKLGLRHKEHIAAYGKGNERRLTGRHETADINTFSWGVANRGSSVRVG  318
            . ** ** .*. **  **.***.******** ****.*. *.******* *.***

                                                Extensão C-terminal
14PROTEINA  RYTEKEARGYLEDRRPASNMDPYVVTALLAETTILWEPTLEAEALAAQKISLKV  303
GLN2_PEA    RDTEKNGKGYLEDRRPASNMDPYVVTALLAESTLLWEPTLEAEALAAQKIALKV  430
GLN4_PHAVU  RDTEKNGKGYLEDRRPASNMDPYVVTSLLAESTLLWEPTLEAEALAAQKLALKV  429
GLN2_HORVU  RDTEAKGKGYLEDRRPASNMDPYTVTALLAETTILWEPTLEAEALAAKKLALKV  434
GLN2_ORYSA  RDTEAKGKGYLEDRRPASNMDPYVVTALLAETTILWEPTLEAEVLAAKKLALKV  428
GLNC_MAIZE  RDTEAKGKGYLEDRRPASNMDPYIVTGLLAETTILWQPSLEAEALAAKKLALKV  423
GLN1_ORYSA  RDTEKEGKGYFEDRRPASNMDPYVVTGMIAETTLLWKQN----------------  357
GLN1_MAIZE  RDTEREGKGYFEDRRPASNMDPYVVTGMIAETTILWNGN----------------  357
GLN5_MAIZE  RDTEKEGKGYFEDRRPASNMDPYVVTGMIADTTILWKGN----------------  357
GLN1_PEA    RDTEKDGKGYFEDRRPASNMDPYVVTSMIAETTILWKKP----------------  357
GLN2_PHAVU  RDTEKQGKGYFEDRRPASNMDPYVVTSMIAETTILWK-P----------------  356
            * ** ...**.************.**...*..*.**.
```

Fig. 81. Comparação da sequência de aminoácidos deduzida do cDNA 14.A.1.2 (14PROTEINA) com sequências de aminoácidos de polipeptídeos da GS cloroplastidial e citosólica de várias plantas superiores. Para o alinhamento utilizou-se o programa CLUSTAL integrado na aplicação PC-GENE e apenas as sequências presentes na base de dados SWISS-PROT e que obtiveram as melhores pontuações na busca de homologias com o programa FASTA. Os resíduos perfeitamente conservados estão assinalados com asterisco na linha inferior e os resíduos "bem conservados", de acordo com parâmetros definidos no programa, estão assinalados com um ponto, na linha inferior. As zonas correspondentes aos segmentos conservados nas subunidades citosólicas e cloroplastidiais estão sublinhadas e assinaladas de I a IV e a extensão C-terminal de 16 resíduos de aminoácidos, conservada nas subunidades cloroplastidiais, também se encontra sublinhada. Dois resíduos de cisteína característicos das subunidades cloroplastidiais da GS (Forde e Culimore, 1989) estão assinalados com círculo (°) nos segmentos III e IV. As sequências representadas correspondem às subunidades prescursoras da GS2 (cloroplastidial) de *Pisum sativum* (GLN2-PEA), *Phaseolus vulgaris* (subunidade delta) (GLN4_PHAVU), *Hordeum vulgare* (GLN2_HORVU), *Oryza sativa* (GLN2-ORYZA) e *Zea mays* (GLNC_MAIZE) e a subunidades citosólicas (GS1) de *Oryza sativa* (GLN1-ORYZA), *Pisum sativum* (GLN1-PEA), *Zea mays* (GLN1_MAIZE), *Zea mays* (GLN5_MAIZE) e *Phaseolus vulgaris* (subunidade alfa) (GLN2_PHAVU).

No alinhamento pode observar-se que as unidades cloroplastidiais, em relação às citosólicas, possuem cerca de 60 aminoácidos adicionais na região N-terminal (e que contem a pre-sequência necessária para dirigir a proteína para os cloroplastos) e uma extensão C-terminal de 16 aminoácidos, tal como descrito anteriormente (Forde e Cullimore, 1989). Pode observar-se que a sequência de GS2 de batateira não inclui a extremidade N-terminal da proteína apresentado parte do segmento I e os segmentos II, III e IV conservados nas subunidades citosólicas e cloroplastidiais da GS. Contudo, possui os resíduos de cisteína, assinalados com círculo (°) na Fig. 81, característicos das subunidades cloroplastidiais (Forde e Cullimore, 1989) e a extensão de 16 aminoácidos na região C-terminal conservados nestas subunidades. Na extremidade C-terminal 15 dos 16 aminoácidos são idênticos à extensão de GS2 de ervilheira. A terminação em SLKV, que na figura aparece apenas no 14.A.1.2 foi encontrada também na sequência deduzida a partir do cDNA de *Lycopersicon esculentum* e em sequências de GS2 presentes noutras bases de dados, por exemplo a sequência de GS2 de *Brassica napus*, presente na bases de dados PIR.

Nas posições 131, 148 e 171, os resíduos de aminoácidos, respectivamente F, A e E, parecem ser mais conservados nas sequências de GS citosólica sendo mais comum encontrar os resíduos Y, S e Q nas mesmas posições em subunidades cloroplastidiais (Loulakakis et al, 1996). Contudo a análise da sequência publicada (Becker et al, 1992) de aminoácidos deduzida a partir da sequência nucleotídica NSGS2AA (GS2 de *Nicotiana sylvestris*), demonstra que os mesmos resíduos F, A e E estão presentes nas posições equivalentes. Curiosamente, não está presente nesta sequência (deduzida de NSGS2AA) o segundo resíduo de cisteína considerado específico das subunidades cloroplastidiais.

A partir dos resultados do alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida do cDNA 14.A.1.2 com várias sequências de aminoácidos de GS2 e GS1 de várias plantas obteve-se um dendograma que reflecte as relações de semelhança molecular entre as sequências consideradas. O progama utilizado foi o CLUSTAL e as sequências foram as utilizadas no alinhamento da Fig. 81. Na Fig. 82 está representado o dendograma (ou árvore filogenética) obtido podendo verificar-se que a sequência de aminoácidos deduzida do cDNA 14.A.2 (14PROTEÍNA) se inclui no grupo das subunidades cloroplastidiais da GS, embora num ramo distinto das GS cloroplastidiais de leguminosas e de gramíneas.

Pelos resultados obtidos, pode concluir-se que os clones de cDNA isolados (λ14.A.1.2 e λJ9A12.2) correspondem ao mesmo mRNA e codificam um polipeptídeo correspondente à GS cloroplastidial. O gene respectivo é referido como *Gln2*, de acordo com as propostas da Comissão de Nomenclatura dos Genes de Plantas ("Comission on Plant Gene Nomenclature", 1994).

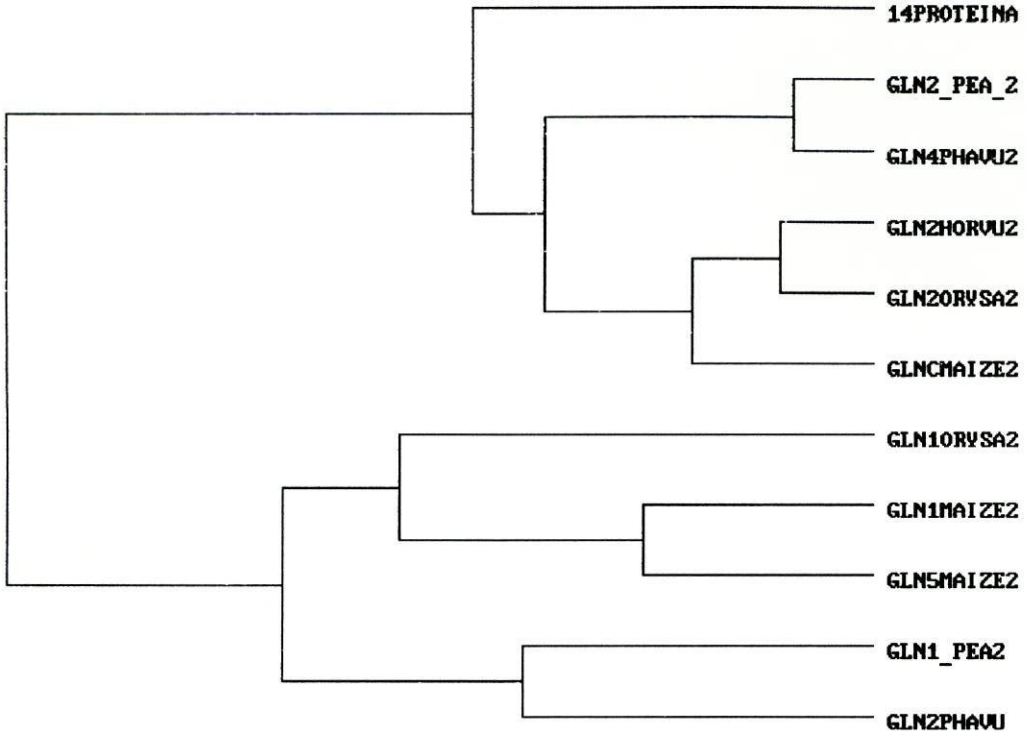


Fig. 82. Dendrograma evidenciando a relação de semelhança molecular entre sequências de aminoácidos de subunidades de GS utilizadas no alinhamento da Fig. 81. Para elaboração do dendrograma utilizou-se o programa CLUSTAL, integrado na aplicação PC-GENE.

ANÁLISE DO DNA GENÓMICO POR "SOUTHERN BLOTTING"

DNA genómico foi extraído de folha de batateira e digerido com as enzimas *Hin*dIII, *Bam*HI e *Eco*RI. Os fragmentos foram submetidos a electroforese em gel de agarose e transferidos para membrana de nylon. A membrana foi hibridizada com duas sondas (Fig. 83).

i) a mesma sonda utilizada no rastreio da biblioteca: o fragmento obtido por PCR a partir do cDNA total de folha com os iniciadores GSF1 e GSR1 e inserido em pSK, foi posteriormente excisado com *Eco*RI, a banda correspondente foi cortada do gel de agarose (Nusieve a 4%) e marcado radioactivamente na agarose. Este fragmento representa uma região bem conservada entre diferentes cDNAs de GS de várias plantas

ii) o fragmento de inserção do fago λ14.A.1.2, amplificado por PCR utilizando como iniciadores sequências específicas do vector, adjacentes ao local de inserção. O fragmento representa uma sonda específica de cDNA de GS cloroplastidial.

A sonda i) não possui locais de restrição para as enzimas utilizadas e a análise de restrição do pSK-14.A.1.2 com as enzimas *Eco*RI, *Bam*HI e *Hin*dIII, demonstrou que apenas a *Hin*dIII cortava o fragmento de inserção. Contudo, por análise por computador dos locais de restrição na sequência do cDNA 14.A.1.2 verificou-se que não existiam sequências de reconhecimento para a *Bam*HI mas que a *Hin*dIII, e a *Eco*RI reconhecem cada uma um local no cDNA. Este resultado tem de ser reverificado, uma vez que o local *Eco*RI encontrado na sequência na posição 1020, não condiz com os resultado obtidos por análise de restrição do plasmídio pSK-14A, em que a digestão com *Eco*RI apenas linearizava o plasmídio (ver Fig. 73) , não se observando a saída de qualquer fragmento do tamanho correspondente ao presumível local de corte. Portanto, assumiu-se que apenas a *Hin*dIII corta no interior do cDNA 14.A.1.2.

Por análise dos resultados, pode observar-se que ambas as sondas reconhecem em geral os mesmos fragmentos, embora com intensidades diferentes. Dois fragmentos *Hin*dIII, e dois fragmentos *Bam*HI são reconhecidos pela sonda i), que reconhece múltiplos fragmentos *Eco*RI de tamanho superior a 2 kb. A sonda 14.A.1.2 reconhece essencialmente os mesmos fragmentos *Bam*HI e *Eco*RI, mas hibridiza com bastante intensidade com uma das bandas *Eco*RI. Uma outra banda *Eco*RI, de grande peso molecular, é também reconhecida pela sonda embora com intensidade um pouco menor. É difícil resolver no gel as bandas *Hin*dIII reconhecidas por esta sonda. Estes resultados sugerem a existência de mais de um gene, pelo menos dois, codificando as subunidades da GS em *S. tuberosum.*

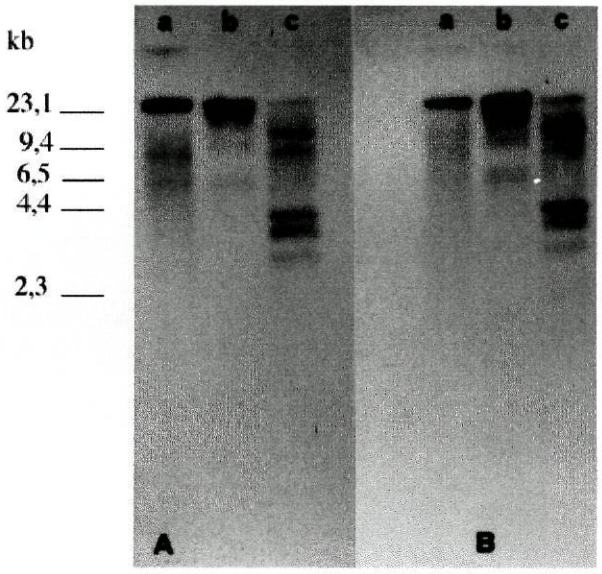


Fig 83. "Southern blot" de DNA genómico de batateira digerido com as enzimas *Hind*III (a), *Bam*HI (b) e *Eco*RI (c). Utilizaram-se como sondas: **A**, cDNA de GS de batateira amplificado por PCR e utilizada no rastreio da biblioteca; **B**, produto de amplificação por PCR do fragmento de inserção do fago λ.14.A.1.2.

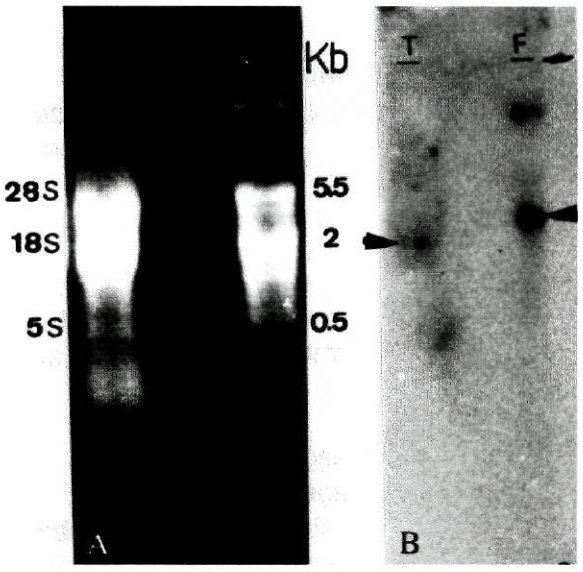


Fig. 84. "Northern blot" de transcritos de GS em órgãos de batateira. **A**. RNA total de tubérculo (T) e de folha (F) de *Solanum tuberosum* foi separado em gel desnaturante de formaldeído; estão assinaladas as bandas, coradas com brometo de etídeo, dos RNAs ribossomais 28S, 18S e 5S e os respectivos tamanhos em kb. **B.** O RNA foi transferido para membrana de nylon e hibridizado com sonda corrrespondente à sequência de cDNA de batateira amplificada por PCR e utilizada no rastreio da biblioteca: os transcritos detectados estão assinalados com setas na autorradiografia.

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO mRNA DE GS EM ÓRGÃOS DE BATATEIRA

Análise de mRNA de GS por "Northern blotting"

O tamanho e abundância de transcritos de GS em folhas e tubérculos de batateira foi determinado por "Northern blotting" (Fig. 84).

O RNA total de folhas e tubérculos foi submetido a electroforese desnaturante e transferido para membrana de nylon, que foi hibridizada com a sonda i) utilizada no "Southern blot".

Em folha foi detectado um transcrito abundante correspondendo possivelmente ao mRNA da GS2, com cerca de 1,5 kb. Em tubérculo foi detectado um transcrito menor, pouco abundante, com cerca de 1,3 kb codificando possivelmente uma subunidade citosólica da GS. Utilizando como sonda o clone isolado de cDNA clorioplastidial, apenas o transcrito de folha era visível.

Localização de transcritos da GS em folha por hibridização *in situ* a nível ultraestrutural

Apesar de ter sido demonstrado que promotores de GS citosólica dirigiam a expressão de GUS nos tecidos vasculares de plantas transgénicas, não existiam abordagens à localização da expressão de genes da GS nos tecidos vasculares de folha, de modo a correlacionar a localização da expressão genética com a localização dos produtos de tradução.

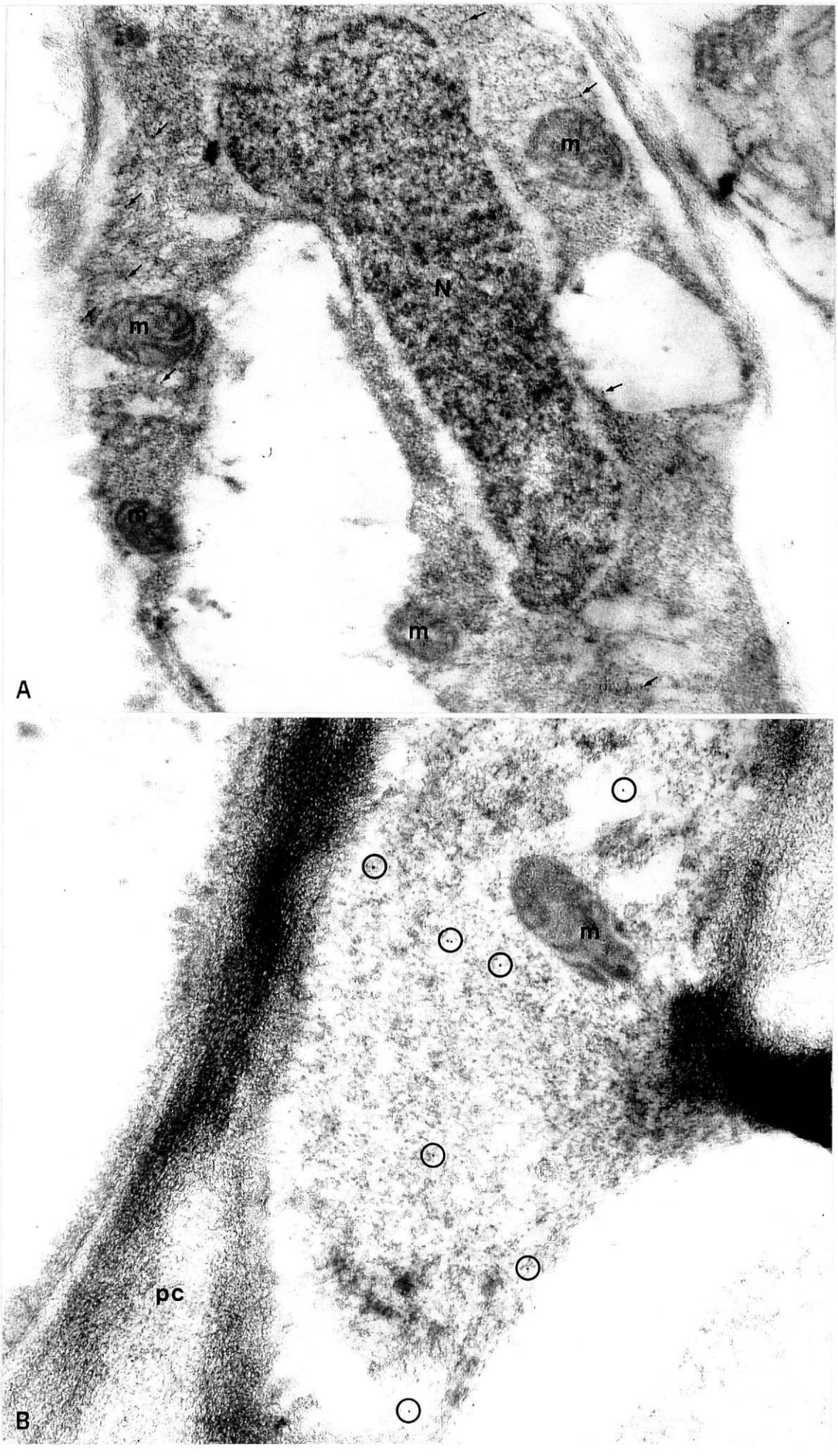
A localização de transcritos de GS em folhas de batateira foi abordada por hibridização *in situ* a nível de microscopia electrónica. A sonda utilizada foi a mesma anteriormente utilizada no rastreio de bibliotecas.

A sonda foi biotinilada por "nick translation" e a hibridização foi feita nas grelhas, em secções de folha incluídas em Unicryl. a detecção foi feita por estreptavidina conjugada com ouro coloidal (10 nm).

Na Fig. 85 (A e B) podem observar-se células de parênquima floémico, possivelmente células de companhia, com citoplasma abundante, rico em ribossomas e numerosas mitocôndrias. Apesar de bastante esparsa, a marcação mostrava-se bastante específica, estando presente exclusivamente neste tipo de células.

Os resultados demostraram a presença de mRNA de GS em células de floema de folha e batateira, indicativo de actividade de transcrição de genes da GS neste tipo de células, correlacionando-se com a localização da proteína localizada por imunocitoquímica. Contudo, estudos adicionais são necessários para identificar o gene de GS1 que se expressa nos tecidos vasculares de folha de batateira e as circunstâncias fisiológicas (por ex°, grau de desenvolvimento) e ambientais que afectam essa expressão.

Fig 85. A e B. Localização de mRNA de GS em secções de folha de batateira. Secções de folha incluída em Unicryl foram incubadas, nas grelhas, com sonda biotinilada de cDNA de GS e posteriormente com estreptavidina marcada com ouro coloidal de 10 nm. A marcação, embora pouco densa, aparece especificamente em células de floema, possivelmente células de companhia, que apresentam citoplama denso, rico em ribossomas e com numerosas mitocôndrias (m). N, núcleo; pc, parede celular. A, x 33 600; B, x 38 400.


m
N
m
m
m
A
m
pc
B

Localização de mRNA de GS em tecidos de tubérculo por "Northern tissue printing"

A mesma sonda biotinilada utilizada para hibridização *in situ* foi utilizada para detectar mRNA de GS em impressões de tubérculo em nitrocelulose e "nylon". A detecção foi feita por meio de estreptavidina conjugada com peroxidase (Fig. 86).

O tubérculo usado encontrava-se a abrolhar, em condições de obscuridade, à temperatura ambiente.

A marcação encontrava-se em zonas muito localizadas à periferia do tubérculo. Uma marcação intensa pode ser observada na zona do olho e dos gomos (Fig. 86-A) Em algumas imagens a marcação parece acompanhar as ramificações dos tecidos vasculares que se dirigem aos brolhos, estendendo-se depois lateralmente (Fig. 86-B), à superfície do tubérculo, num padrão semelhante ao já verificado na localização imunológica de proteínas da GS em tecidos de tubérculo (Fig. 55).

Os resultados revelaram uma actividade de transcrição de genes da GS em zonas de crescimento activo do tubérculo e nas zonas próximas do crescimento do brolho.

RASTREIO DE UMA BIBLIOTECA DE cDNA DE TUBÉRCULO CONSTRUÍDA EM FAGO LAMBDA ZAPII

Para estudar a expressão de mRNAs de GS em tubérculo, procurou obter-se uma biblioteca de cDNA de tubérculo que permitisse o isolamento de cDNAs de GS expressos neste órgão. Uma biblioteca de cDNA de tubérculo construída em fago Lambda ZAPII, foi gentilmente cedida pelo Prof. Lothar Willmitzer, Instituto de Biologia Molecular Max-Planck, Alemanha). O rastreio desta biblioteca já permitiu o isolamento de clones positivos (λT31A11.3A e λT5F8.1A) que aguardam caracterização. Contudo, a biblioteca foi preparada a partir de mRNA de tubérculos em desenvolvimento ("recebedores"), podendo conter apenas os mRNAs de GS expressos nesta situação particular de desenvolvimento.

Na Fig. 87 encontra-se o resultado da hibridização de uma sonda de GS cloroplastidial constituída pelo plasmídio contendo o cDNA 14.A.1.12 (pSK-14A.1.12) (Fig. 87-A) e por uma sonda de GS citosólica de tubérculo constituída pelo fragmento de inserção amplificado por PCR do fago (λT31A11.3A) (Fig. 87-B) com fragmentos resultantes da restrição com *Bam*HI, *Eco*RI e *Hin*dIII dos produtos de amplificação por PCR dos fragmentos de inserção respectivamente do fago λ14.A.1.2 (pistas 1, 3 e 5) e λT31A11.3A (pistas 2, 4 e 6).

A sonda correspondente ao cDNA 14.A.1.2 reconhece 1 banda forte nas pistas correspondentes ao fragmento de inserção do λ14.A.1.2 digerido com *Bam*HI, *Eco*RI e duas bandas na pista correspondente à restrição com *Hin*dIII. A sonda cloroplastidial não reconhece, aparentemente, bandas correspondentes à restrição do fragmento de inserção do λT31A11.3A. A partir do resultado obtido pode concluir-se que o fragmento de inserção do fago λ14.A.1.2

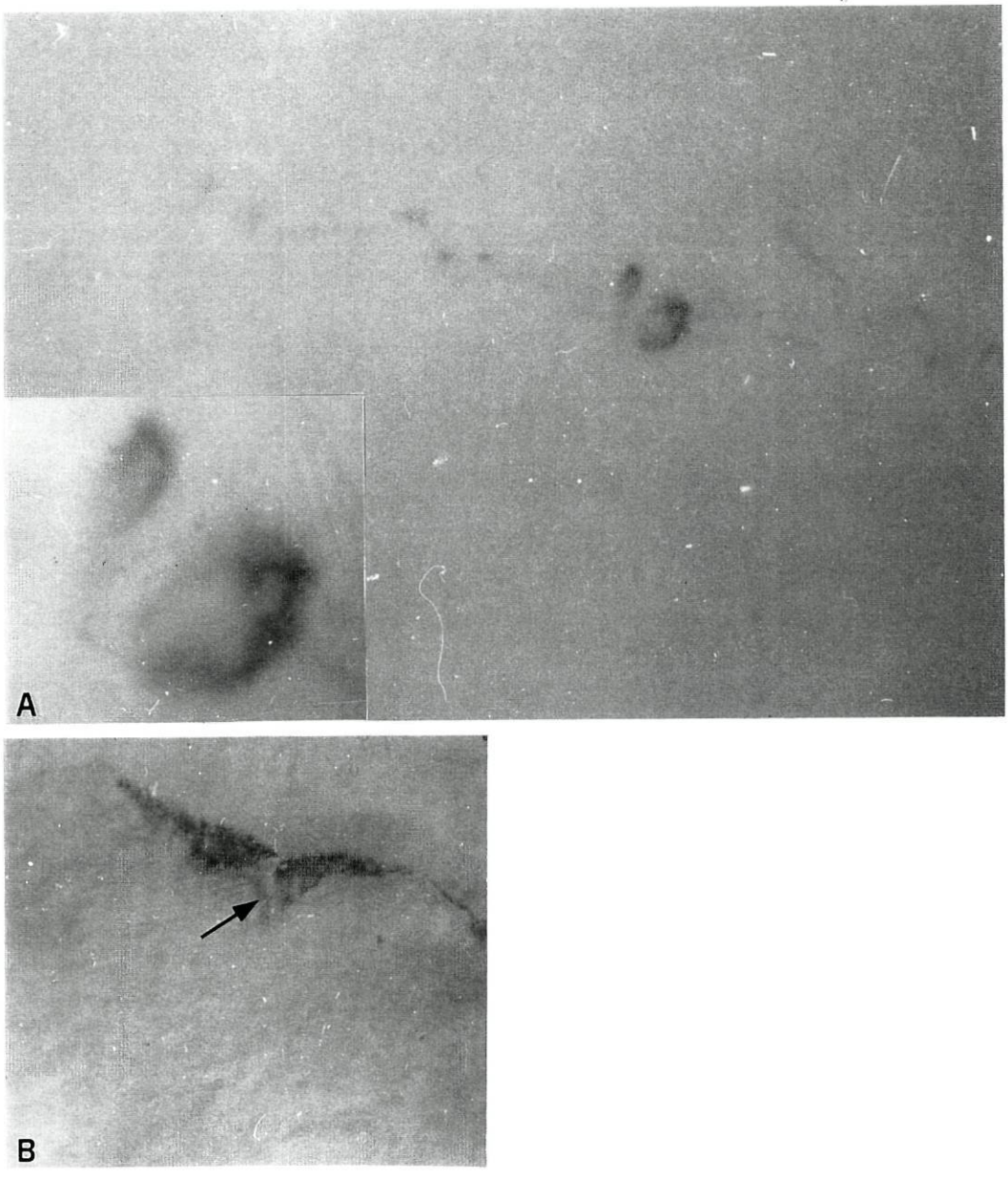


Fig 86 Localização de mRNA de GS em tecidos de tubérculo. Os tubérculos foram seccionados e pressionados contra uma membrana de nitrocelulose que foi posteriormente incubada com uma sonda biotinilada de cDNA de GS e estreptavidina conjugada com peroxidase. **A.** A marcação é intensa na zona dos gomos, visíveis em maior ampliação no "inset". **B.** A marcação acompanha as ramificações da vasculatura (seta) que se dirigem ao brolho estendendo-se depois à superfície do tubérculo, num padrão semelhante ao observado por marcação da GS com anticorpos (ver Fig. 55-c). A, x 10, "inset", x 30; B, x 10.

aparentemente é apenas clivado pela enzima *Hin*dIII, o que está de acordo com análises de restrição anteriores.

A sonda correspondente ao cDNA DE GS citosólica de tubérculo reconhece as bandas de maior peso molecular obtidas por restrição do fago λ14.A.1.2, não reconhecendo a banda *Hin*dIII, de menor peso molecular, o que seria previsível, dado que este fragmento engloba a extremidade 3' não traduzida do cDNA 14.A.1.2. Apenas uma banda é reconhecida na pista correspondente à restrição com *Eco*RI dos produtos de amplificação do fragmento de inserção do λT31A11.3A e duas bandas são reconhecidas nas pistas correspondentes à restrição deste fragmento com *Bam*HI e com *Hin*dIII.

O isolamento de mRNA de tubérculos noutras situações fisiológicas, poderá conduzir, através de técnicas de RT-PCR e RACE, ao isolamento e clonagem de cDNA de GS expressa em tubérculos, a sua caracterização e regulação em diferentes condições, nomeadamente na situação de "fonte" e "recebedor".

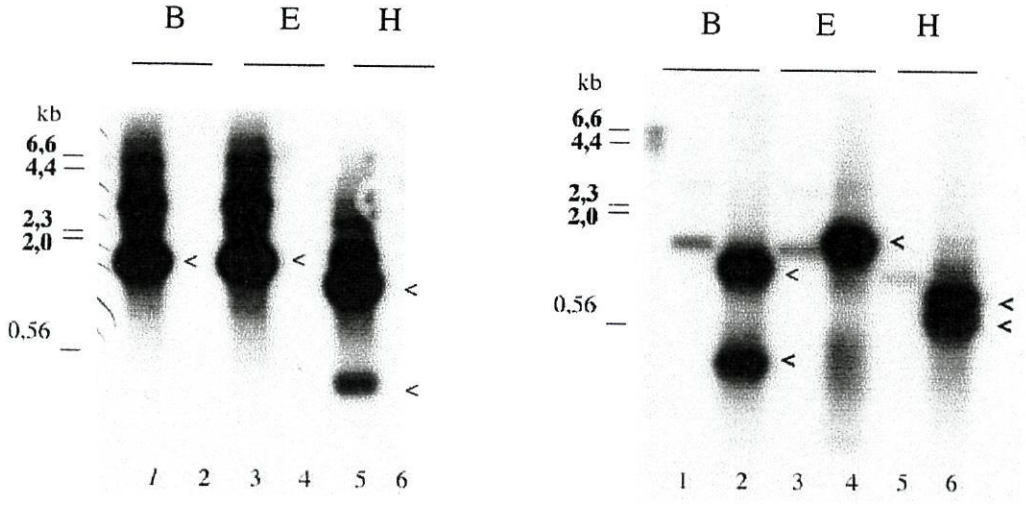


Fig. 87. Hibridização da sonda correspondente a cDNA de GS cloroplastidial (plasmídio pSK14.A.1.2) (**A**) e de cDNA de GS citosólica de tubérculo (fragmento de inserção do fago λT31A11.3A (**B**) com os fragmentos de inserção do fago λ14.A.1.2 (pistas 1, 3 e 5) e do fago λT31A11.3A (pistas 2, 4 e 6) digeridos com as enzimas *Bam*HI (pistas 1 e 2), *Eco*RI (pistas 3 e 4) e *Hin*dIII (pistas 5 e 6). A sonda cloroplastidial não reconhece os fragmentos resultantes da restrição do fragmento de inserção do fago λT31A11.3A mas a sonda de GS citosólica reconhece os fragmentos de maior peso molecular resultantes da restrição o fragmento de inserção do fago λ14.A.1.2. As bandas resultantes da restrição, reconhecidas pela sonda homóloga respectiva, estão assinaladas com <.

DISCUSSÃO

A detecção de isoformas da GS na batateira e outras Solanaceae

A primeira evidência dos resultados obtidos durante este estudo é a existência em folhas de batateira das duas isoformas da GS: a forma cloroplastidial GS2 mas também a forma citosólica GS1. Estes resultados contrariam a ideia prevalecente na literatura de que em certas plantas incluindo as Solanaceae, somente a forma cloroplastidial estaria presente nas folhas.

Durante este estudo foi também demonstrada a existência de GS1 em folhas de outras Solanaceae como tabaco e tomateiro.

A ideia de que somente uma isoforma estaria presente em tecidos verdes das várias plantas obteve apoio em diferentes estudos em que estavam envolvidas diferentes técnicas: em estudos iniciais a actividade em gel de amido revelava apenas uma banda em extractos de folhas de tomateiro e tabaco (Barrat, 1980); por imunofluorescência, a GS foi detectada apenas em cloroplastos de folhas de espinafre (Hirel et al 1982a); por cromatografia de troca iónica (McNally et al, 1983) e por electroforese descontínua em gel de agarose (Botella et al, 1986) somente a GS2 foi detectada em várias Solanaceae e estudos de imunocitoquímica ultraestrutural em folhas de tomateiro demonstravam que a GS existia somente nos cloroplastos; em extractos de folha de *N. plumbaginifolia* e separados por SDS-PAGE apenas uma subunidade, correspondente à GS plastidial, era detectada por meio de anticorpos (Tingey e Coruzzi, 1987).

No presente trabalho a presença da GS citosólica em folhas de batateira foi comprovada por várias técnicas: detecção por anticorpos dos polipeptídeos da GS separados por SDS-PAGE, cromatografia de troca iónica e, de maneira incontestável, por imunocitoquímica, que permitiu detectar a GS no citosol de células do floema não só em folhas de batateira mas de outras Solanaceae como tabaco e tomateiro.

A ausência de técnicas histoquímicas para detectar *in situ* a actividade da enzima poderia sugerir que a forma detectada no floema das folhas destas plantas não estaria normalmente activa e daí a ausência de actividade detectada em trabalhos anteriores. Contudo, por cromatografia de troca iónica foi possível separar as actividades correspondentes à GS1 (citosólica) e GS2 (cloroplastidial) em extractos de folha, demonstrando assim que a forma citosólica não só está presente, como está activa, em folhas de batateira.

A discrepância entre os resultados obtidos e os anteriormente descritos pode ser explicada pela sensibilidade das técnicas utilizadas; por exemplo, nos vários ensaios realizados neste estudo com cromatografia de troca iónica, nem sempre o pico correspondente à GS1 era aparente e a separação das formas nativas em gel não desnaturante também não era evidente.

A banda correspondente ao polipeptídeo da GS citosólica em extractos totais de folha madura separados por SDS-PAGE, pode também apresentar-se extremamente ténue após revelação por anticorpos. Contudo, a razão mais importante reside no facto de a GS1 ter uma localização preferencial em tecidos muito específicos da folha, nomeadamente em nervuras, como foi demonstrado:

i) pelo padrão de subunidades da GS separadas por SDS-PAGE em que em extractos de nervura de folha de batateira e tabaco o polipeptídeo correspondente à GS citosólica era o mais abundante;

ii) por imunocitoquímica, em que a GS foi detectada em células do floema em folhas de batateira, tabaco e tomateiro.

Os métodos bioquímicos apresentam menos sensibilidade do que a imunocitoquímica ultraestrutural; por outro lado é procedimento comum ao realizar extractos de folhas extrair a nervura central onde parece que, pelo menos na batateira e outras Solanaceae, se encontra a maior parte da GS1 nas folhas.

A constatação de que as isoenzimas citosólica e cloroplastidial se expressavam em diferentes tipos de células, sugeria que os estudos bioquímicos tradicionais, que se baseavam na homogeneização dos tecidos, conduziam a uma mistura artificial das isoenzimas que poderiam não coexistir no mesmo tipo de célula. Por outro lado, a expressão muito circunscrita a um determinado tecido, ainda que elevada nesse tecido, pode parecer muito baixa ou mesmo inexistente em extractos de órgãos totais.

Estes resultados ilustram a importância das técnicas *in situ* na correcta avaliação do complemento de isoformas de vários órgãos.

É de notar, que já tinha sido isolado um cDNA de folha de *N. plumbaginifolia* correspondendo a uma forma citosólica da GS. A falta de detecção do polipeptídeo correspondente foi atribuída a baixos níveis do respectivo mRNA, controlo de tradução, ou instabilidade do polipeptídeo (Tingey e Coruzzi, 1987). Em face dos resultados obtidos no presente estudo, a não detecção do polipeptídeo foi devida provavelmente à falta de sensibilidade do método utilizado.

Parece poder concluir-se que a GS1 existe nas folhas verdes das Solanceae e provavelmente nas folhas das outras plantas nas quais só foi descrita a GS2.

Caracterização do padrão de isoformas da GS nos vários órgãos da batateira

Para avaliar as diferentes respostas das isoformas da GS a diferentes e situações e esclarecer os seus diferentes contributos no metabolismo do azoto em diferentes órgãos, torna-se imprescindível caracterizar o complemento em isoformas dos vários órgãos bem como a sua localização em tecidos ou células específicas.

As isoenzimas citosólica e cloroplastidial da GS têm sido distinguidas com base na separação da actividade por cromatografia de troca iónica (McNally et al, 1983), ou pela determinação dos pesos moleculares das respectivas subunidades (Cullimore e Bennet, 1988) separadas por SDS-PAGE ou por diferenças de carga detectadas por focagem isoeléctrica, seguida de imunodetecção por meio de anticorpos (Tingey e Coruzzi, 1987).

Neste trabalho procurou caracterizar-se o padrão das isoformas da GS em vários ógãos da batateira por várias técnicas.

Análise dos polipeptídeos da GS

A análise dos polipeptídeos da GS por SDS-PAGE seguido de imunodetecção revelou que a batateira possui duas classes distintas de polipeptídeos com padrões diferentes de expressão nos diferentes órgãos: um polipeptídeo de maior massa molecular (cerca de 45 kDa) que é específico das folhas, e outro menor, de cerca de 42 kDa, que ocorre nas folhas, em raízes, brolhos e tubérculos.

Por fraccionamento celular foi possível concluir que a banda de maior massa molecular (cerca de 45kDa) correspondia a uma subunidade cloroplastidial e a de menor peso foi considerada como sendo uma subunidade citosólica, por comparação com os dados contidos na literatura.

Peptídeos com massas moleculares semelhantes correspondiam respectivamente à GS cloroplastidial (44-45 kDa) e à GS citosólica (38-43 kDa) (Lara et al, 1984; Tingey et al 1987).

Em comparação com a literatura, é possível que a banda menor seja composta na realidade por múltiplos polipeptídeos correspondentes a diferentes subunidades de GS citosólica (Lara et al, 1994, Tingey e Coruzzi, 1987).

Assim, a GS1 (citosólica) e a GS2 (cloroplastidial) estão presentes e diferencialmente expressas nos vários órgãos e tecidos da batateira. Enquanto a GS2 predomina nas folhas, somente a GS1 foi detectada em raízes, caules e brolhos; a GS1 predomina nas nervuras das folhas e é também a forma predominante em tecido caloso.

Neste trabalho, peptídeos da GS citosólica foram detectados em tecidos diferentes na batateira: a questão de saber se trata do mesmo polipeptídeo ou diferentes polipeptídeos da GS1 expressos nos vários órgãos foi objecto de diferente abordagem nomeadamente a nível molecular.

O padrão de polipeptídeos da GS foi também abordado por focagem isoeléctrica. A presença de diferentes subunidades, diferindo no seu ponto isoeléctrico e proporções diferentes na enzima nativa, tem sido interpretada como sendo produtos de diferentes genes (Kung et al, 1974). A ocorrência de múltiplas subunidades individuais da GS com o mesmo tamanho mas cargas diferentes, tinha sido descrita para diferentes plantas, embora o número de peptídeos fosse variável com a planta (Hirel et al, 1984; Lara et al, 1984; Tingey et al, 1987; Tingey e Coruzzi, 1987).

A focagem isoeléctrica revelou 5 bandas em extractos foliares sendo uma particularmente intensa, provavelmente corresponde a uma subunidade cloroplastidial, podendo as outras bandas corresponder a subunidades citosólicas. Contudo, a separação de extractos cloroplastidiais em gel vertical na presença de 8 M de ureia revelou 4 bandas com diferente carga.

Na literatura têm sido descrita a separação de subunidades plastidiais da GS em 4 ou 6 variantes de carga (Hirel et al, 1984; Hopfner et al, 1988; Lara et al, 1984; Nato et al, 1984), mas noutros casos somente um polipeptídeo foi detectado (Ericson, 1985; Tingey e Coruzzi, 1987). Os diferentes polipeptídeos plastidiais foram inicialmente atribuídos a produtos de

diferentes genes (Hirel et al ,1984; Hopfner et al, 1988; Lara et al, 1984) ou glicosilação (Nato et al, 1984) embora a glicosilação não tenha sido confirmada em *Pisum sativum* e *Nicotiana plumbaginifolia* (Tingey et al, 1987; Tingey e Coruzzi, 1987). Lara et al (1984) consideraram que poderiam ser polipeptídeos codificados vários genes ou por um só gene sofrendo alterações pós-tradução. Hopfner et al (1988) atribuíram também as diferentes variantes de carga a possíveis modificações de pós-tradução ou pós-transcrição mas mais tarde (Hopfner et al, 1990) concluíram que se deviam possivelmente a clivagens proteolíticas durante a execução da técnica. Estudos iniciais em feijoeiro demonstraram a existência de três subunidades citosólicas com ponto isoeléctrico diferente e que estas subunidades eram codificadas por três genes diferentes (Bennet et al, 1989). Contudo, a forma cloroplastidial de feijoeiro apresentava quatro variantes de carga (Lara et al, 1984) mas estudos posteriores demonstraram que a GS cloroplastidial de feijoeiro é codificada por um único gene (Lightfoot et al, 1988), o mesmo vindo a ser posteriormente verificado para outras as plantas estudadas (Tingey et al, 1987; Stanford et al, 1993; Snustad et al, 1988).

Em conclusão: a folha de batateira possui duas classes de subunidades de GS que diferem no peso molecular. A subunidade maior, de maior peso molecular, corresponde à isoenzima cloroplastidial; por analogia com a literatura é possível que se trate de um único polipeptídeo, codificado por um único gene, que se associa no interior do cloroplasto formando um homo-octâmero. Como será visto mais à frente, o isolamento de dois clones de cDNA de folha correspondendo ambos a um mesmo mRNA codificando uma subunidade cloroplastidial parece apoiar esta hipótese.

É possível que as múltiplas bandas, com diferentes pontos isoeléctricos, observadas em extractos de cloroplastos isolados se devam a proteólise ou modificações pós-tradução.

A focagem isoeléctrica de extactos foliares totais permite supôr que, para além da uma forma predominante cloroplastidial, existem várias subunidades citosólicas. A clarificação deste aspecto necessitaria de equipamento adicional para electroforese em duas dimensões, não disponível na altura dos ensaios.

A abordagem molecular foi também iniciada com vista a caracterizar os diferentes cDNAs de GS de vários órgãos da batateira.

Separação das actividades da GS1 e da GS2

O complemento de isoformas dos vários órgãos a e a sua variação com diferentes condições tem sido estudado pela separação das actividades das duas holoenzimas em gel de agarose e por cromatografia de troca iónica.

Tal como já referido, por cromatografia de troca iónica, foi possível separar duas áreas de actividade com perfis de eluição semelhantes aos descritos para folhas de outras espécies C3 com duas isoformas (McNally e Hirel, 1983). O primeiro pico foi considerado a GS1 citosólica e correspondia apenas a 13,6 % da actividade total; o 2º pico, era predominante (86,4% da

actividade total) e continha um polipeptídeo de 45 kDa correspondente à forma cloroplastidial. Em repetidos ensaios o 1° pico aprecia por vezes muito atenuado.

A separação de actividades das diferentes isoformas nativas em gel não desnaturante não era evidente, mas a identificação por anticorpos das proteínas que mostravam actividade, sugeria a presença de duas bandas em extractos foliares e uma só em extractos de cloroplastos isolados; a coloração por Coomassie das zonas do gel que mostrava actividade também não mostrava separação evidente das bandas.

Foi possível identificar a banda do gel correspondente à proteína da GS, positivamente identificada por meio de anticorpos. Este resultado permite um fácil isolamento da proteína a partir do gel nativo para posterior produção de anticorpos.

Foi, também, possível confimar que os anticorpos utilizados neste estudo (anti-GS de feijoeiro) reconheciam não só a proteína desnaturada mas a proteína nativa, que era importante para os estudos de imunolocalização e, ainda, que os anticorpos reconheciam apenas a proteína que mostrava actividade de GS.

Vézina e Margolis (1990) detectaram dois polipeptídeos de GS extraída de folha de *Pinus banksia* tendo identificado um polipeptídeo mais abundante de 44 kDa e outro de 40 kDa, num padrão que os autores consideraram ser semelhante ao descrito para as folhas de outras angiospérmicas (Hirel e Gadal, 1980; Tingey et al, 1987). Contudo, só detectaram uma banda em gel não desnaturante o que levou os autores a concluir que os diferentes polipeptídeos faziam parte de uma única enzima nativa com actividade no gel.

Em folha batateira também existem dois tipos de polipeptídeos de GS, sendo a mais pesada, a cloroplastidial. Contudo, neste estudo concluiu-se que os dois tipos de subunidades apresentam pesos moleculares muito próximos, pelo que a sua associação em formas octaméricas dá origem a diferentes proteínas nativas, com pesos moleculares aproximados, difíceis de resolver nos sistemas (minigeles) disponíveis. O peso molecular aproximado das bandas detectadas é compatível com associação de polipeptídeos em formas octaméricas não se detectando bandas de actividade na gama de pesos moleculares correspondentes a associações tetraméricas como foi observado em extractos de folha de *Beta vulgaris* por Mack e Tischner (1990). Estes autores identificaram duas bandas de actividade em gel não desnaturante que atribuíram a diferentes formas oligoméricas sendo a forma tetramérica mais activa nas lâminas foliares e a forma octamérica mais activa nos pecíolos.

A dificuldade em separar as actividades da GS1 e da GS2 por cromatografia de troca iónica, ou por electroforese em gel nativo, foi também descrita por Kawakami e Watanabe (1988) num estudo sobre as alterações na GS com a senescência de cotilédones de *Raphanus sativus*, tendo os autores optado por avaliar as variações na quantidade relativa de polipeptídeos da GS por meio de anticorpos anti-GS e também as alterações nos níveis dos respectivos mRNAs.

A avaliação das alterações na abundância dos polipeptídeos da GS tem sido assim o método utilizado para avaliar variações no padrão das duas isoformas, GS1 e GS2, em diferentes situações (Kamachi et al, 1991; Kamachi et al, 1992a; Kawakami e Watanabe, 1988; Pérez-

García et al, 1995; Peterman e Goodman, 1991). As desvantagens são uma possível falta de sensibilidade para detectar polipeptídeos presentes em baixas quantidades em extractos de órgãos totais e as reacções cruzadas dos anticorpos que não discriminam os diferentes tipos de polipeptídeos dado o elevado grau de homologia verificado entre eles. Contudo, anticorpos específicos contra a forma citosólica da GS foram obtidos por Kamachi et al (1992a) que produziram um polipeptídeo sintético com 17 resíduos, com sequência deduzida a partir da sequência de nucleótidos de um cDNA de GS1 de arroz.

É objectivo futuro deste trabalho proceder à mesma abordagem (identificar zonas pouco conservadas nas sequência de nucleotídeos e produzir polipeptídeos sintéticos com sequência de aminoácidos deduzida) para obter anticorpos que discriminem entre diferentes polipeptídeos da GS.

Localização da GS em folha de batateira e outras plantas

A utilização de impressões de tecidos em nitrocelulose constituiu um método rápido e seguro para determinar a localização da GS em tecidos de folha e pecíolo. Estes resultados apontavam para a presença da GS na zona correspondente ao floema adaxial da folha, onde a marcação era muito intensa.

Por imunocitoquímica ultraestrutural foi possível, com elevada resolução, localizar a GS em células de folha de bateira e identificar o tipo de célula em que ocorria, tendo sido observada uma localização específica da GS citosólica e da GS cloroplastidial em diferentes tipos de células: nas células do mesófilo a GS ocorria apenas nos cloroplastos mas no floema a GS era abundante no citosol das células de companhia.

O mesmo padrão de distribuição foi observado em folhas de tabaco e de tomateiro e ainda numa não-Solanaceae (girassol).

A maior parte dos estudos iniciais de localização da GS envolvia técnicas bioquímicas que não permitiam deduzir uma localização das diferentes isoformas da GS em diferentes tipos de células. Por técnicas de imunocitoquímica a GS tinha sido detectada apenas nos cloroplastos em folhas de plantas descritas como não possuindo GS1 (Botella e al, 1988; Hirel et al, 1982a). Contudo, em *Glycine max*, que continha as duas isoformas nas folhas (Hirel et al, 1987), a GS foi também apenas localizada nos cloroplastos por técnicas de imunocitoquímica ultraestrutural, quer usando anticorpos anti-GS2 quer anti-GS1 (Brangeon et al, 1989). Estes resultados, que foram considerados "um enigma" pelos autores (Brangeon et al, 1989), sugeriam a possibilidade de, em folhas maduras, as formas cloroplastidial e citosólica da GS ocorrerem em diferentes tipos de célula, o que foi confirmado pelos resultados obtidos no presente estudo.

Os resultados aqui apresentados vieram confirmar estudos moleculares anteriores (Edwards et al, 1990) em que os promotores dos genes da GS cloroplastidial e de uma GS citosólica de ervilheira dirigiam a expressão do gene marcador GUS em diferentes tecidos em folhas de tabaco: o promotor da GS2 dirigia a expressão de GUS na lâminas foliares enquanto o promotor da GS citosólica dirigia expressão do gene marcador no floema. Estes autores

concluíram que o padrão de expressão diferencial dos dois genes reflectiria papeis fisiológicos diferentes das duas isoformas da GS no metabolismo do azoto: a actividade dos genes marcador sugeria que a GS2 estaria presente essencialmente nos tecidos fotossintéticos, o que seria consistente com o papel proposto na assimilação da amónia proveniente da fotorrespiração enquanto a actividade do gene marcador em tecidos vasculares sugeria que a presença de uma isoforma da GS nestes tecidos deveria estar implicada na síntese de glutamina para o transporte para outras zonas da planta. Contudo, a localização histoquímica da actividade do GUS oferece um baixo nível de resolução e além disso têm sido feitas críticas à utilização deste marcador para avaliar o padrão de expressão de determinados genes pois pode da origem a artefactos, nomeadamente diferente estabilidade dos transcritos da GS e do GUS (Taylor, 1997; Temple, et al, 1995). Além disso, a expressão do GUS em plantas transgénicas pode não reflectir a expressão normal dos produtos génicos na planta nativa (Temple et al, 1995; Sakurai et al, 1996). Por exemplo, o gene de ervilheira, cujo promotor mostrava actividade na vasculatura de tabaco transgénico, expressa-se especificamente em raízes e nódulos radiculares na ervilheira e a sua expressão na vasculatura desta planta nunca foi demonstrada, pelo que será difícil estabelecer um modelo de expressão da GS com base em experiências em plantas transgénicas (Sakurai et al, 1996).

É, ainda, importante referir que a regulação da expressão do GUS, dirigida por promotores de genes da GS em plantas transgénicas, pode variar conforme a planta transgénica onde a fusão promotor-GUS é introduzida (ver por exemplo, Miao et al, 1991). Assim é possível que o padrão de expressão do GUS dirigido pelo gene GS3A de ervilheira, em tabaco transgénico reflicta também a regulação por factores intrínsecos do tabaco e se aproxime de um *possível padrão de expressão da GS1 nas folhas que é característico das Solanaceae*.

Deste modo, torna-se necessário, para avaliar a expressão espacial de determinados genes e dos seus produtos, a utilização de outras técnicas como imunocitoquímica ultraestrutural e hibridização *in situ*.

Importância dos presentes resultados no esclarecimento dos papeis das isoformas da GS no metabolismo do azoto

Os resultados obtidos no presente estudo que provaram, com elevada resolução, a ocorrência de uma especificidade celular na localização da GS1 e da GS2 nas folhas, através da imunolocalização *in situ* da proteína nativa, foram determinantes no esclarecimento dos papeis fisiológicos atribuídos às duas isoformas no metabolismo do azoto (podem ser encontradas referências aos resultados obtidos no presente trabalho em trabalhos de revisão como Lam et al, 1995; Lam et al, 1996; Temple e Sengupta-Gopalan, 1997).

1- A presença em células de companhia do floema, que se sabe serem importantes na regulação da translocação de assimilados, apoiava a sugestão de que a GS1 estaria envolvida na síntese de glutamina para transporte. A glutamina é uma das formas preferenciais de transporte de azoto no floema (Stoddart e Thomas, 1982). Por outro lado, um aumento da expressão da

GS1 tinha sido observado durante a senescência de cotilédones (Kawakami e Watanabe,1988) e de folhas de arroz (Kamachi et al, 1991). A senescência foliar envolve a degradação de proteínas, e os aminoácidos resultantes podem ser transportados directamente mas na maioria são desaminados e o azoto resultante é utilizado na síntese de amidas que são produtos de transporte mais eficientes (Thomas e Stoddart, 1980). A constatação de que a GS1 se localizava no floema deu suporte aos resultados anteriores e no seu conjunto apontavam para um papel da GS1 na remobilização das reservas azotadas e na reassimilação do azoto em forma de glutamina para transporte (Lam et al, 1995; Lam et al, 1996).

2- A constatação de que a GS1 não se expressava nas células do mesófilo foi também determinante para esclarecer o facto de os mutantes deficientes em GS2 não reassimilarem amónia proveniente da fotorrespiração, ainda que possuíssem níveis normais de GS1 (Wallsgrove et al, 1987); Edwards et al (1990), baseados no facto de os promotores da GS1 e da GS2 dirigirem a expressão de GUS em tecidos diferentes, sugeriam que uma compartimentalização das isoenzimas poderia explicar aquele facto.

Contudo, somente as observações feitas no âmbito do presente estudo permitiram provar, a nível utraestrutural, que nas células do mesófilo de várias plantas a GS se encontra apenas nos cloroplastos não se detectando no citosol das mesmas células.

Através de impressão de tecidos em nitrocelulose, Kamachi et al (1992b) tinham verificado que anticorpos específicos anti GS1 marcavam essencialmente a vasculatura de folhas de arroz, enquanto anticorpos específicos contra a GS2 marcavam a zona do mesófilo. Muito recentemente, Sakurai et al (1996) confirmaram, a nível de microscopia óptica, a presença da GS em células de companhia dos feixes vasculares nas nervuras em folhas de arroz.

Confirmação de que existe expressão de genes da GS e acumulação de mRNA em células de companhia do floema

Apesar de tudo, ainda não tinha sido evidenciada a expressão de um gene nos tecidos vasculares ou nas células de companhia do floema.

Noutra secção deste trabalho, provou-se, por hibridização *in situ* a nível ultraestrutural, a acumulação de mRNA de GS em células de companhia do floema de folha de batateira. Com base nos resultados aqui obtidos em tabaco, muito recentemente outros autores (Dubois et al, 1996), além de reverificarem a presença de GS nas células de companhia do floema por imunocitoquímica, também confirmaram por hibridização *in situ* a nível de microscopia óptica, a expressão de um mRNA de GS citosólica em tecidos vasculares de raiz e caule de tabaco, mas não em folha.

Contribuição para a caracterização funcional do floema interno

Outra conclusão importante dos presentes resultados é que a presença da GS no floema indica que além de via de transporte de aminoácidos, o floema é também local de síntese da glutamina.

No caso específico da batateira, os resultados obtidos apontam particularmente para o floema interno (ou adaxial) como local de síntese de glutamina e possivelmente via de transporte dos compostos azotados. O floema na maioria das dicotiledóneas tem uma posição externa ao xilema nos caules e abaxial nas folhas, mas em algumas famílias incluindo as Solanaceae o floema está, também, localizado numa posição interna ou adaxial, respectivamente nos caules e nas folhas (McCauley e Evert, 1989). A função deste sistema é ainda pouco clara (Frommer e Sonnewald, 1995).

O papel desempenhado pelos dois tipos de floema tem sido objecto de interesse, particularmente no que diz respeito ao transporte de carbohidratos. Em várias solanáceas, o transporte de assimilados para as zonas imaturas da parte superior da planta parece ocorrer principalmente no floema interno, enquanto a exportação para as raízes parece ocorrer no floema externo (referências em McCauley, e Evert, 1989). Folhas em desenvolvimento de tomateiro aparentemente importam via floema interno e exportam pelo floema externo.

Em Cucurbitaceae o floema abaxial foi considerado o local de exportação a partir de folhas maduras, sendo uma via preferencial de importação de assimilados para os tecidos foliares em expansão.

O floema interno é, pois, um tecido funcional e é possível que desempenhe um papel importante também no transporte de compostos azotados.

Na literatura há exemplos em que a identificação de produtos génicos no floema, nomeadamente por técnicas *in situ*, tem sido muito útil em revelar vias metabólicas associadas ao floema. Por imunohistoquímica foram localizadas várias enzimas no floema (Beebe e Turgeon, 1992; Holthaus e Schmitz, 1991; Nolte e Koch,1993); por hibridização *in situ* foi demonstrada a expressão de um transportador de sacarose em veias secundária de batateira (Riesmeier et al, 1993) que posteriormente se verificou possuir um papel vital no carregamento do floema.

Assim, os resultados aqui apresentados, contribuíram decisivamente para a caracterização do floema interno na batateira, e possivelmente noutras Solanaceae, como local de síntese da glutamina e também como via de transporte de compostos azotados para outras partes da planta.

Caracterização metabólica das células de companhia

O floema das Solanceae consiste em diferentes tipos e células (McCauley e Evert, 1989). Os elementos condutores são os elementos crivosos, não nucleados, e controlados pelas células de companhia que lhes estão associadas. As células de companhia do floema adaxial da folha de batateira nem sempre são fáceis de distinguir das outras células do parênquima floémico.

As células de companhia são tipicamente células metabolicamente activas, com características secretoras (Esau, 1977) e a sua associação funcional com os elementos condutores de floema é bem conhecida (Esau, 1977) sendo aceite que são importantes na regulação do carregamento de açúcar para os tecidos condutores (Van Bel, 1993).

A caracterização de uma localização específica da GS nas células de companhia, permite contribuir para a caracterização metabólica deste tipo de células e é necessária para a interpretação da função desta enzima nos tecidos de transporte. A presença de GS nestas células, sugere que aí ocorre a síntese de glutamina que é posteriormente translocada via floema para outras partes da planta. É possível que aí também ocorra a síntese de outros aminoácidos de transporte nomeadamente da asparagina que é sintetizada a partir da glutamina. A localização das enzimas envolvidas, nomeadamente asparagina sintetase nestas células poderia esclarecer esta questão.

A abordagem imunocitoquímica para avaliar a importância das células de companhia na fisiologia dos feixes vasculares foi também posta em evidência por Nolte e Kock, (1993) que localizaram uma sacarose sintase neste tipo de células.

O estudo de sequências nos promotores que conferem expressão específica para determinado tipo de células ou tecidos tem sido abordado (Brears et al, 1991). Estes autores estudaram o promotor do gene de ervilheira GS3A que dirigia actividade GUS em tecidos vasculares de tabaco transgénico (Edwards et al 1990) com o objectivo de identificar as sequências responsáveis pela expressão específica para determinado tipos de células, nomeadamente do floema. Contudo, este promotor conferia expressão de GUS em vários órgãos e tecidos de plantas transgénicas (tabaco e *Medicago varia*) nomeadamente tecidos vasculares de cotilédones folhas, caules e raízes e ápices radiculares de tabaco, tecidos meristemáticos, zona simbiótica e vasculatura de nódulos de *M. varia* e ainda nos ápices radiculares da mesma planta.

Comparação com a localização da GS em folhas de não Solanaceae

A localização da preferencial da GS citosólica num tecido muito específico como o floema adaxial das folhas, poderia explicar porque em plantas desta família de plantas a GS1 não foi detectada em folhas verdes por métodos bioquímicos. Por outro lado, em espécies de outras famílias de plantas C3 nas quais foi detectada GS1 e GS2 a forma citosólica poderia não estar circunscrita ao floema. Deste modo, foi feita uma abordagem à localização da GS em folhas e tecido caloso de uma não-Solanaceae, o girassol em que foi descrita a presença de GS1 e GS2 nas folhas por cromatografia de troca iónica (Cabello et al, 1991).

Nas folhas desta planta, o padrão de distribuição das GS apresentava-se idêntico ao observado para as Solanaceae estudadas, não se observando a presença de GS no citosol das células do mesófilo; nos tecidos vasculares a marcação, muito dispersa foi observada em células de parênquima floémico particularmente de nervuras secundárias, não tendo sido detectada marcação abundante e concentrada nas células de companhia da nervura central. Estes resultados podem sugerir que nesta (e outras) plantas C3 a GS1 estaria mais dispersa pela folha e não tão circunscrita a um tecido específico e portanto seria mais facilmente detectável por métodos bioquímicos. Contudo, outros parâmetros são de considerar, nomeadamente o facto de as folhas poderem estar em diferente grau de desenvolvimento e esse factor poder condicionar a distribuição da GS nas folhas; por outro lado a distribuição da GS em nervuras secundárias não

foi sistematicamente abordada em batateira ou e girassol em diferentes fases de desenvolvimento.

Parece, assim, ser necessário avaliar, em futuros estudos, não só a distribuição da GS nas nervuras secundárias, como o envolvimento maior ou menor de outras células do parênquima vascular na síntese da GS, particularmente em resposta diferentes tipos de situação, por exemplo, "stress" biótico e abiótico, senescência foliar.

Modelo de expressão da GS citosólica nas folhas

A expressão da GS1 nas folhas parece ser preferencial nos tecidos vasculares mas o modelo de distribuição pode estar relacionado com vários factores:

• O tipo de planta: pode estar mais circunscrito a determinados tecidos, como o floema interno das Solanaceae

• (Relacionado com o anterior), tipo de estrutura do sistema vascular e o contributo de veias secundárias e de outras células do parênquima vascular; Sakurai et al (1996) em arroz, verificaram a que presença de GS predominava em células de companhia mas também estava presente em células de parênquima de metaxilema e metafloema

• A localização da GS1 nas folhas pode também estar relacionada com o grau de desenvolvimento da folha, podendo estar mais concentrada na nervura central em folhas maduras, exportadoras de aminoácidos. Sakurai et al (1996) verificaram que a o sinal para a GS era mais forte nas células de companhia de folhas mais maduras sendo mais fraco nas folhas mais jovens onde se localizava predominantemente nas células do parênquima do metaxilema e do metafloema. O diferente grau de desenvolvimento das folhas pode também estar na origem de uma observação de Datta et al (1991) que em folhas primárias de *Phasolus vulgaris*, dias depois da germinação da semente, verificaram que a GS se localizava predominantemente no cloroplasto mas detectaram também "alguma" marcação no citoplasma do mesófilo. Esta marcação pode ser inespecífica ou "background" mas pode também reflectir uma relação entre a localização da GS1 e o estado de desenvolvimento da planta

• A via de utilização da glutamina originada pela actividade da GS também pode estar correlacionada com a localização desta enzima: se a glutamina se destina a ser transportada para outros órgãos ou se destina a ser utilizada em tecidos "recebedores" para fornecer azoto para síntese de aminoácidos e síntese proteica.

• Outro aspecto que pode influenciar a localização da GS nas folhas é o tipo de compostos azotados que são utilizados para o transporte a longa distância; a presença da GS em células de companhia nas nervura centrais sugere que a glutamina é o aminoácido preferencialmente exportado pelo floema na batateira.

• A resposta da GS em situações desfavoráveis como "stress" abiótico e abiótico: seria interessante observar o local onde se observam essas respostas. Pérez-García, et al (1996) sugerem que em folha de tomateiro, uma GS1 é induzida especificamente pela infecção com

Pseudomonas syringae, e que a sua expressão ocorreria também no citosol de células de mesófilo.

-O modelo proposto

Os resultados obtidos no presente estudo, em conjunto com as observações de Kamachi et al (1992b) sobre a localização da GS em impressão de tecidos, conduziram ao conceito vigente que a localização da GS1 nas folhas é vascular como tem sido corroborado em recentes artigos de revisão (Lam et al, 1995; Lam et al, 1996). Contudo, pode ser encarado um modelo em que a localização da GS1 nas folhas fosse diferente em folhas muito jovens e "recebedoras" activas em que a GS1 poderia eventualmente localizar-se no citoplasma de células do mesófilo ou eventualmente em outras células de parênquima vascular como sugerido por Sakurai et al (1996); em folhas maduras, com fotossíntese activa, a GS2 seria a forma predominante nos tecidos fotossintéticos das folhas, onde ocorre a fotorrespiração, estando a GS1 circunscrita a células de floema e envolvida na síntese de glutamina para transporte a longa distância para outros locais da planta. Dentro deste modelo, a expressão desta forma da GS1 nos tecidos vasculares poderia aumentar significativamente em situações em que a remobilização de azoto das folhas aumentasse, por exemplo durante a senescência, (em que Kawakami e Watanabe observaram acumulação dos polipeptídeos da GS1) ou por outros processos que se traduzissem numa necessidade de remobilização das reservas azotadas, sua interconversão em formas de transporte e redireccionamento para órgãos em crescimento.

Uma vez que são pouco conhecidas as condições que regulam a expressão da GS1 em resposta à necessidade de mobilização e reassimilação de azoto, neste trabalho foi estudada a expressão da GS1 em dois contextos diferentes que potencialmente alterariam as necessidades de remobilização do azoto e transporte para outras zonas da planta:

1. em folhas de plantas submetidas a carência de azoto fornecido exogenamente
2. em tubérculos em abrolhamento

os resultados obtidos serão discutidos em secções posteriores.

Artigos recentes sobre localização da GS não deixam de realçar que o estudo da assimilação da amónia nas plantas superiores, passa por estudar a expressão das enzimas envolvidas a nível do órgãos e tipos de células (Dubois et al, 1996; Sakurai et al, 1996; Sukanya et al, 1994).

Outra abordagem que tem sido proposta para avaliar os papeis dos genes da GS e das isoenzimas da GS é a modulação da sua expressão num órgão e/ou tecido particular (Lam et al, 1995).

Baseados nos trabalhos de localização incluidos nesta dissertação e outros, Temple et al (1994) utilizaram construções para inibir a expressão da GS especificamente em tecidos vasculares, usando um promotor com expressão na vasculatura das folhas e um gene da GS na orientação inversa ("anti-sense"). A obtenção de plantas com esta construção exibiam um elevado nível de mortalidade o que sugeria que a GS localizada nos tecidos vasculares apresenta

um papel crucial na assimilação do azoto (Temple e Sengupta-Gopalan, 1997). Esse papel, que se prende com remobilização de compostos proteicos e interconversão metabólica de compostos azotados para fluxos de azoto para zonas de crescimento e estruturas reprodutoras, foi posto em evidência em estudos posteriores ao longo deste trabalho, em que as plantas foram sujeitas a situações (por ex., carência de azoto) em que a capacidade de remobilização é crucial para a planta.

Localização da GS no tecido caloso

No tecido caloso de batateira a localização da GS preferencialmente no citosol é consistente com os resultados obtidos com a detecção dos polipeptídeos da GS neste tecido, em que a subunidade citosólica era predominante.

Em tecido caloso de girassol, a GS aparecia dispersa no citoplasma e plastídios de células parenquimatosas mas uma marcação intensa ocorria no que parece serem células de floema em diferenciação.

A actividade da GS já tinha sido detectada em culturas de tecidos vegetais, nomeadamente tecido caloso de milho (Loyola-Vargas e Sánchez de Jiménez, 1986), de *Sedum telephium* (Santos e Salema, 1989) e de *Canavalia ensiformis* (Vázquez-Flota et al, 1989). Nestes estudos o tecido caloso era utilizado como um modelo para avaliar o efeito, em enzimas envolvidas no metabolismo do azoto, de diferentes compostos como nitrato e amónio (Loyola-Vargas e Sánchez de Jiménez,1986), penicilinas (Santos e Salema, 1989) e reguladores de crescimento (Vázquez-Flota et al, 1989).

As funções da GS nas culturas de tecidos não estão esclarecidas. O papel das várias isoenzimas da GS tem sido discutido de acordo com a sua localização em diferentes órgãos e no tecido caloso não existe a organização espacial dos tecidos que se verifica na planta. Contudo, sendo um sistema altamente controlado, pode ser considerado um bom modelo para estudar as alterações induzidas por manipulação das condições de cultura nas diferentes isoformas da GS.

As isoformas da GS foram estudadas em culturas de células de arroz tendo sido observado que o padrão dos diferentes polipeptídeos era semelhante ao verificado presentemente em calo de batateira, com a banda correspondente à forma plastidial menos intensa e a forma citosólica mais abundante (Hayakawa et al, 1990). Estes autores descreveram a cultura de células de arroz, onde não existe fotorrespiração nem transporte a longa distância, como um modelo de estudo para estudar o efeito das fontes de azoto nas isoformas da GS tendo verificado que a adição de $NO3^-$ induzia um aumento nos níveis da subunidade plastidial. Estes autores sugeriram que a GS plastidial seria responsável pela assimilação da amónia proveniente da redução do nitrato nos plastídios, o que seria consistente com a presença, nos plastídeos de NiR. Esta função tinha também já sido atribuída a GS plastidial de órgãos não verdes, como as raízes (Vezina e Langlois, 1989). Quanto à GS citosólica, seria responsável pela assimilação da $NH4^+$ absorvida do meio de cultura.

É possível que papeis semelhantes possam ser atribuídos às isoformas da GS em tecido caloso de batateira.

Yamaya et al (1990) isolaram uma linhagem de culturas de células de tabaco resistentes ao MSX (metionina sulfoximina), um potente inibidor da GS. Nas células resistentes, o MSX causava o aparecimento de um novo polipeptídeo da GS, que foi relacionado com a resistência.

Em resumo, as culturas de tecidos podem ser um bom modelo para estudar o efeito de diversos factores (nutrição azotada, agro-químicos, etc.) nas isoformas da GS, mas para isso o seu complemento de isoenzimas da GS precisaria de estar mais bem caracterizado, nomeadamente a nível molecular. O isolamento de cDNAs de GS a partir de tecido caloso e sua caracterização e comparação com formas expressas na planta é um objectivo a atingir na sequência do presente trabalho. Esta abordagem já foi utilizada por Loulakakis et al (1996) que isolaram dois clones diferentes de cDNA de GS citosólica a partir de culturas em suspensão de *Vitis vinifera*, que foram posteriormente usados para avaliar a expressão dos correspondentes mRNAs em diferentes órgãos da planta e nas culturas em suspensão em resposta a diferentes fontes de azoto.

Outro aspecto interessante a abordar seria a correlação entre as variações na expressão da GS e diferenciação de tecidos vasculares em tecido caloso. O uso de culturas em que é induzida a formação de floema já foi utilizado para estudar enzimas do floema (Wang et al, 1995). Esta abordagem poderia ser útil para isolar e caracterizar a isoforma e respectivo mRNA que se expressam neste tipo de células.

Estudo da localização das isoformas da GS em folhas estioladas e em reverdecimento

Após a observação de que as isoformas da GS apresentavam uma localização diferencial na folha da batateira, estando a GS2 localizada nos cloroplastos das células do mesófilo e a GS1 no citosol de células de companhia do floema, foi feito um estudo mais aprofundado de imunolocalização que abarcou, pela primeira vez, diferentes tipos de células em folhas estioladas e após reverdecimento. Deste estudo ressaltam vários aspectos:

1) A GS2 está presente em estioplastos, ainda que em baixos níveis

2) A abundância de marcação da GS2 aumenta em paralelo com o desenvolvimento de estioplastos em cloroplastos, em resposta à exposição à luz

3) A presença da GS2 em cloroplastos não se restringe às células do mesófilo mas foi igualmente detectada em outros tipos de células nomeadamente: células de companhia do floema, células do parênquima xilémico e células de guarda dos estomas

4) A GS1 era escassa nas células de companhia das nervuras centrais em folhas estioladas mas está presente em grande abundância nas células de companhia logo após 4 h de iluminação.

5) A GS1 está presente no citosol das células de guarda dos estomas em plantas estioladas e nas primeiras fases de reverdecimento.

Presença da GS em estioplastos e na transição para cloroplastos com a exposição à luz

A conversão de estioplastos em cloroplastos ocorre quando a planta, crescida na obscuridade, é exposta à luz. Várias alterações morfológicas e bioquímicas ocorrem durante este processo (Gunning e Steer, 1975). O corpo prolamelar perde o seu estado cristalino e a partir dele formam-se os tilacoides primários. O início de um período de síntese mais rápida de clorofila e de novas membranas é marcado pelo aparecimento de zonas de sobreposição dos tilacóides primários, que é o primeiro passo para a formação de grana (Gunning e Steer, 1975). É, também, nesta altura que se observa um aumento marcado da densidade de marcação para a GS.

Estudos de regulação das isoformas da GS demonstraram que a GS cloroplastidial era controlada pela luz enquanto a GS citosólica parece ser independente da luz (Hirel e Gadal, 1980). Em plantas estioladas foi observado que a GS1 era a forma predominante ou a única forma presente em folhas estioladas (Guiz et al, 1979; Hirel e Gadal, 1982; Mann et al, 1979). Contudo, vários estudos mostraram que a actividade da GS2 aumentava quando folhas estioladas eram expostas à luz, nomeadamente em arroz (Guiz et al 1979, Hirel et al 1982b), ervilheira (Hirel e Gadal, 1981), sorgo (Hirel e Gadal, 1982), cevada (Mann et al, 1979), e esse aumento de actividade traduzia uma síntese *de novo* da GS (Hirel et al, 1982b). Mann et al (1980) demonstraram que a actividade da GS em cevada estava associada com tecidos fotossinteticamente activos. Estes resultados sugeriam que o aumento da actividade da GS2 deveria estar relacionado com o grau de desenvolvimento dos cloroplastos.

Uma vez que a GS2 tinha sido implicada na assimilação da amónia proveniente da fotorrespiração (McNally et al, 1983), Tobin et al (1985) sugeriram que o aumento da actividade da GS2 acompanhava o aumento dos níveis da RuBisCO e o potencial aumento da actividade fotorrespiratória.

Estudos moleculares em ervilheira demonstraram que o mRNA da GS2 se acumulava nas folhas em resposta à luz e a condições que estimulavam a fotorrespiração (Edwards e Coruzzi, 1989) sugerindo uma correlação entre a expressão deste gene e a função da GS2 nas folhas. Estes autores sugeriram que a acumulação de GS2 em condições fotorrespiratórias poderia reflectir uma indução metabólica pela amónia libertada pela fotorrespiração. A indução de genes da GS pela amónia tem sido objecto de controvérsia. Cock et al (1991) não detectaram uma resposta imediata do gene da GS2 de feijoeiro a condições fotorrespiratórias, mas uma resposta a longo prazo, concluindo que a regulação pela fotorrespiração é indirecta.

Edwards e Coruzzi (1989) inferiram que a indução da GS2 estaria relacionada com o desenvolvimento de cloroplastos maduros, baseados na cinética de acumulação de mRNAs de GS2 durante o reverdecimento de plantas estioladas.

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram correlacionar morfologicamente o aumento do nível de GS2 nos cloroplastos com o desenvolvimento de cloroplastos maduros a

partir de estioplastos e assim apoiar a inferência feita por outros autores de que a actividade da GS2 e acumulação de seus transcritos deviam acompanhar o desenvolvimento de cloroplastos.

A presença de GS2 em estioplastos

Neste trabalho também foi observada a presença de GS em estioplastos ainda que num grau diminuto.

A localização da proteína em estioplastos também está em consonância com a presença de um nível basal de expressão de mRNA de GS2 em plantas estioladas (Edwards e Coruzzi, 1989; Cock et al, 1991). Posteriormente, já foi demonstrado que o promotor de um gene da GS2 de ervilheira dirigia a expressão de GUS em plantas estioladas (Tjaden et al, 1995). Parece existir uma expressão constitutiva, independente da luz, da GS cloroplastidial mas cuja função é desconhecida.

As observações anteriores sugerem que e regulação da expressão da GS2 envolve factores adicionais além da luz (Tjaden et al, 1995) mas esses mecanismos não estão esclarecidos. Cock et al (1991) sugeriram que a expressão da GS2 em folhas estioladas poderia ocorrer durante o desenvolvimento dos estioplastos, tal como acontece com outros genes relacionados com a fotossíntese, independentemente do facto dos seus produtos génicos não funcionarem na obscuridade. Tjaden et al (1995), contudo, sugerem um papel para a GS2 em tecidos estiolados, referindo que a expressão, independente da luz, do gene da GS2 em plântulas estioladas em germinação poderia reflectir o papel da GS2 na reassimilação da amónia libertada pela catabolismo das proteínas de reserva das sementes nos cotilédones. No entanto, estas interpretações permanecem especulativas.

A localização da GS1 nas folhas estioladas

A marcação para a GS1 era muito escassa no citoplasma de células de companhia do tecido vascular da nervura central em plantas estioladas mas era detectada logo em grande abundância nas células de companhia após 4 h de iluminação. A escassez de marcação para a GS no citoplasma em folhas de plantas crescidas na obscuridade não era de esperar já que, em trabalhos anteriores em folhas estioladas, apenas a actividade da GS1 era detectada por cromatografia de troca iónica (Mann et al, 1979) ou era o pico dominante em folhas estioladas de arroz (Hirel et al, 1982b) e cotilédones estiolados de tomateiro (Galvez et al, 1990). Durante o reverdecimento, após exposição à luz, a actividade da GS1 diminuía ou desaparecia, com o concomitante aumento da actividade da GS2, que se tornava a forma dominante (Galvez et al, 1990; Hirel et al, 1982). A luz não tinha influência, na acumulação de polipeptídeos e transcritos de GS1 (Edwards e Coruzzi, 1989; Peterman e Goodman, 1991).

Devido à escassez de anticorpos, à data deste estudo, não foi possível realizar, paralelamente ao estudo em folhas estioladas e em reverdecimento, uma análise do padrão de acumulação dos polipeptídeos da GS durante a fase de reverdecimento, de modo que não é possível concluir sobre a abundância global de GS1 na folha, em condições de obscuridade e após exposição à

luz. Contudo, por comparação com os dados da literatura, é de esperar que na obscuridade se expressasse a GS1.

É importante notar que a expressão da GS1 nas folhas estioladas poderia ocorrer predominante em outras veias além da nervura central, ou mesmo noutro tipo de tecidos ou células; os dados obtidos neste trabalho demonstram, contudo que esta expressão não ocorria no citoplasma das células do mesófilo.

Resultados recentes (já anteriormente referidos) de Sakurai et al (1996) demonstraram que a GS se localizava nas células de companhia em folhas de arroz maduras mas que o sinal nas células de companhia era mais fraco nas células mais jovens e praticamente inexistente na zona não verde em crescimento de folhas jovens de arroz. Estes resultados vem de encontro ao modelo proposto em que a GS1 se expressaria em diferentes tecidos em folhas com diferentes graus de desenvolvimento. O papel da GS em folhas muito jovens ou estioladas que são "recebedores" seria diferente do papel da GS1 em folhas maduras ou senescentes que são "exportadoras". Aí, o papel GS1 localizada nas células de companhia do floema seria a síntese de glutamina para transporte a longa distância. De notar, que após 4 h de exposição à luz, a marcação nas células de companhia do floema era já bastante intensa, sugerindo que pelo menos uma das formas da GS1 aumenta os seus níveis paralelamente com a exposição das folhas à luz.

Relação dos resultados com o modelo proposto

A ideia (exposta no modelo anteriormente proposto) de que diferentes formas da GS1 se expressariam em diferentes locais da folha em diferentes situações, nomeadamente estado de desenvolvimento, na transição "recebedor"-"fonte", ou no reverdecimento de folhas estioladas, é interessante e aponta para a necessidade de caracterizar os diferentes cDNAs de GS citosólica que se expressam em folha de batateira e localizar a sua expressão.

Sakakibara et al (1992a) descreveram quatro cDNAs de GS citosólica em milho; os mRNAs de dois deles eram predominantes e acumulavam-se em folhas e raízes (pGS107 e pGS112) e aumentavam durante o reverdecimento mas um outro (pGS117) predominavam em folhas jovens estioladas e diminuía durante o reverdecimento. Os níveis de mRNA reflectem a totalidade do órgão não se conhecendo a localização em diferentes tecidos.

Também Cock et al (1991) observaram que os mRNAs das diferentes subunidades de GS que se expressam em folhas de feijoeiro, alfa, beta (citosólicas) e delta (cloroplastidial) se expressavam diferencialmente durante o desenvolvimento, apresentando inicialmente um pico de mRNA de gln-α, seguido de um pico de gln-β e finalmente a acumulação da gln-δ (cloroplastidial). A diferente expressão destes genes foi associada ao desenvolvimento da folha desde a fase "recebedora" de carbono e azoto até à fase de folha madura a sintetizar. A localização de expressão das diferentes formas citosólicas da GS na folha do feijoeiro também não é conhecida.

É assim possível, que nas folhas da batateira, diferentes formas da GS1 se expressem em tecidos diferentes em graus de desenvolvimento ou condições diferentes.

A presença da GS1 em células de guarda dos estomas detectada neste trabalho foi posteriormente descrita no mesmo tipo de células em plantas de arroz (Sakurai et al, 1996). O seu papel nesse tipo de células não é conhecido tendo os referidos autores apontado para a necessidade de se abordar esse estudo, no futuro (Sakurai et al, 1996).

A presença da GS2 em vários tipos de células

Uma das conclusões deste estudo, é que a GS2 está presente em diferentes tipos de células fotossintéticas, nomeadamente, células do mesófilo, células fotossintéticas de parênquima vascular e células de guarda dos estomas. Estes resultados apoiam a ideia de que a sua expressão não é regulada pelo tipo de célula, mas que se correlaciona com a actividade fotossintética (Tjaden e Coruzzi, 1993). Esta questão pode ser abordada pelo estudo de promotores.

Cock et al (1992) observaram que o promotor do gene da GS cloroplastidial de feijoeiro dirigia a expressão de GUS em células fotossinteticamente activas do caule e da folha de tabaco transgénico predominando na lâmina foliar, nomeadamente no parênquima em paliçada e nas células de guarda dos estomas. Contudo também surgia actividade GUS no ápice radicular, tendo os autores sugerido que eventualmente na planta nativa deveria a GS2 deveria expressar-se em plastídeos de raízes.

Contudo, se bem que a regulação pela luz da expressão da GS2 em células fotossintéticas parece bem caracterizada a nível molecular, não estão bem esclarecidos os mecanismos que regulam a expressão da GS2 em estioplastos e em órgãos não fotossintéticos como raízes.

Expressão da GS em folhas de batateira submetida a carência de azoto

Os resultados anteriores demonstraram que na folha da batateira, e de outras Solanaceae e não Solanaceae, existem duas classes de proteínas da GS, estando uma (GS2) localizada no estroma dos cloroplastos e outra nas células de companhia do floema. Dados bioquímicos como cromatografia de troca iónica demonstraram que não só era detectada a proteína da GS1, como ela estava activa.

O papel da GS1 no metabolismo do azoto tem sido estudado principalmente nos nódulos das leguminosas onde se pensa que está principalmente envolvida na rápida assimilação da amónia excretada para o citosol das células infectadas pelos bacteroides .

Nas folhas, o papel da GS1 não está esclarecido, tanto mais que prevalecia a ideia de que esta isoforma não existia nas folhas verdes de várias plantas. Contudo, os resultados de imunolocalização obtidos no presente trabalho contribuíram decisivamente para apoiar a hipótese de que a GS1 localizada no floema estaria envolvida na síntese de glutamina para transporte.

Outros trabalhos apontavam para um envolvimento da GS1 na reassimilação de azoto proveniente da degradação proteica durante a senescência de cotilédones de rabanete (Kawakami

e Watanabe 1988) e de folhas de arroz (Kamachi et al, 1991) e síntese de glutamina para transporte para outras zonas da planta.

Contudo, as condições que regulam a expressão da GS citosólica nas folhas têm sido pouco abordadas e não são conhecidas as condições que regulam a expressão da GS presente nos tecidos vasculares.

Uma vez que a expressão da GS1 pode responder a necessidades de mobilização e reassimilação de azoto, foi feito um estudo do padrão de isoformas da GS num contexto fisiológico que potencialmente alteraria a necessidade remobilização de azoto e transporte para outras zonas da planta, nomeadamente em plantas submetidas a carência de azoto fornecido exogenamente.

A carência de azoto fornecido exogenamente, implicaria um incremento na mobilização de reservas azotadas para permitir o desenvolvimento da planta. O padrão de isoformas da GS foi também abordado em folhas de diferentes idades.

Os resultados obtidos revelaram que o teor em proteínas solúveis é maior nas folhas mais jovens, diminuindo nas folhas mais maduras enquanto que a actividade da GS era menor nestas folhas, aumentando nas folhas mais maduras.

A carência de azoto tinha como consequência uma diminuição da actividade global da GS e no teor de proteínas solúveis, em folhas maduras, mas em folhas jovens não se verificavam alterações significativas nestes dois parâmetros.

No que diz respeito ao padrão de isoformas da GS1 e GS2, verificou-se uma alteração com a idade das folhas e com a carência de azoto. A carência de azoto teve um *efeito diferencial* nas duas isoformas da GS. A forma cloroplastidial é a predominante em folhas jovens nos dois grupos de plantas mas este padrão tende a modificar-se nas folhas mais velhas e inverte-se rapidamente nas folhas mais maduras em plantas submetidas a carência de N. Observou-se, assim, uma *resposta diferencial* da GS1 e da GS2: a carência de N afecta assim negativamente a GS2 cloroplastidial enquanto a GS1 citosólica parece não sofrer alterações ou mesmo aumentar nessa situação.

Paralelamente verificou-se que o nível da RuBisCO diminuía nas folhas mais velhas em ambos os casos, mas era mais rapidamente afectado em condições de carência de azoto. Nas folhas das plantas, a RuBisCO é a proteína solúvel mais abundante podendo consistir em 40-80% das proteínas solúveis totais nas plantas C3 e representa uma forma de armazenamento de azoto (Millard, 1988) que pode ser utilizado quando a assimilação primária de azoto é inibida. Deste modo, o decréscimo verificado na abundância da RuBisCO em condições de carência de azoto pode contribuir, pelo menos em parte, para a diminuição de proteínas solúveis observada nas mesmas condições.

Sabe-se que nas folhas de batateira o azoto é armazenado preferencialmente na forma de RuBisCO e também que esta espécie possui uma elevada capacidade para a degradação preferencial da RuBisCO durante a senescência foliar (Millard e Catt, 1988).

O azoto é transportado nas plantas principalmente na forma das amidas glutamina e asparagina (Lea e Miflin, 1980). Deste modo, os aminoácidos resultantes da proteólise da RuBisCO e de outras proteínas têm de ser desaminados e convertidos em amidas antes de serem exportados da folha via floema (Lea e Miflin, 1980; Millard, 1988). Este processo requer a actividade da GS.

Em folhas jovens o crescimento é mantido à custa da remobilização de azoto das folhas mais velhas em ausência de fonte externa de azoto. As folhas mais jovens não apresentam sintomas de deficiência porque se sabe que o azoto é um dos elementos que pode ser reciclado das folhas mais velhas para as mais jovens (Marschner, 1995). A estimulação da expressão da GS1 em condições de carência de azoto *apoia fortemente um importante papel fisiológico desta isoforma nesta situação de "stress"*, estando possivelmente relacionada com a reutilização de compostos azotados provenientes do catabolismo proteico acelerado nas folhas mais velhas e produção de glutamina para transporte de azoto para outras zonas da planta. A localização, durante este trabalho, da GS1 no floema das folhas apoia esta hipótese.

Carência de azoto e senescência foliar

O armazenamento de azoto num tecido e a sua subsequente utilização para crescimento e manutenção de outros é crucial na economia de azoto da planta. É um processo que ocorre continuamente e nas folhas da batateira o azoto é removido de cada folha sucessivamente (Biemond e Voss, 1992).

Particularmente importante é a transferência do azoto armazenado nas folhas, na forma de proteínas, durante o crescimento vegetativo, para os órgãos de reprodução (Millard, 1988) e este processo ocorre em plantas crescidas com ou sem limitação de azoto (Millard, 1988). Durante este processo ocorre assim uma senescência programada da parte vegetativa da planta.

Sabe-se que as folhas de batateira armazenam azoto na forma de nitratos e proteínas solúveis mas maioritariamente na forma de RuBisCO (Millard e Catt, 1988) e que esta proteína é degradada mais rapidamente que outras proteínas solúveis durante a senescência foliar, possuindo *S. tuberosum* uma capacidade para a degradação preferencial da RuBisCO durante a senescência foliar superior à das outras espécies (Millard e Catt, 1988). Estes autores demonstraram que as plantas deficientes em azoto tinham capacidade de utilização da RuBisCO para o crescimento reprodutivo (formação de tubérculos) idêntica à das plantas crescidas em condições de abundância de azoto.

A senescência é caracterizada pela transição do metabolismo da fase de assimilação de azoto para a fase de remobilização (Feller e Fischer, 1994).

A carência de azoto é um dos factores que aceleram a senescência foliar (Bould et al, 1983). Um fornecimento de azoto insuficiente pela raiz é compensado por uma incremento na mobilização de azoto das folhas, o que pode ter como efeito a aceleração da senescência foliar e eventualmente à "autodestruição" do sistema (Marschner, 1995). Deste modo, os efeitos

observados no presente estudo da carência de N sobre a composição em isoformas da GS podem estar relacionados com a aceleração da senescência. A GS1 já previamente tinha sido implicada na reutilização de azoto em cotilédones em senescência induzida pela obscuridade (Kawakami e Watanabe, 1988) e durante a senescência natural de folhas de arroz (Kamachi et al 1991).

A senescência é um processo altamente *programado* e a importância da remobilização das folhas senescentes para a economia de azoto da planta é óbvia. Este processo é assim organizado de modo a reaproveitar a um nível elevado os nutrientes das folhas e efectuar um redireccionamento eficiente dos nutrientes para os locais de reserva ou para as folhas mais jovens (Stoddart e Thomas, 1982). Vários estímulos ambientais podem acelerar ou atrasar a senescência (Feller e Fischer, 1994), por exemplo, insuficiente suprimento de água ou água em excesso aceleram a senescência , mas os mecanismos reguladores e os sintomas podem variar consideravelmente. Diversos tipos de "stress" induzem alterações que se assemelham ao que se verifica durante a senescência mas que podem não corresponder ao programa altamente regulado que esta pressupõe. Os diferentes processos que induzem a senescência foliar conduzem eventualmente a um padrão semelhante de processos degradativos mas a sequência em que ocorrem e o destino do azoto foliar pode depender das condições específicas (Feller e Fischer, 1994).

Contudo, em diferentes modelos, a GS1 parece ter um papel chave na remobilização de azoto durante a senescência e os resultados obtidos no presente estudo estão em linha de concordância com estudos prévios feitos em modelos em senescência:

O envolvimento da GS1 na senescência

Em cotilédones de rabanete durante a senescência induzida pela obscuridade (Kawakami e Watanabe, 1988) observava-se um decréscimo da actividade global da GS mas a análise de polipeptídeos demonstrava que os níveis de GS2 diminuíam e os de GS1 aumentavam quando era analisada a mesma quantidade de proteína estimando os autores que, expressando os resultados por cotilédone, a GS1 fosse constante e o decréscimo na GS2 mais acentuado. Deste modo o decréscimo na actividade global da GS foi atribuído à diminuição do conteúdo em GS2 nos cotilédones. Os níveis de mRNA traduzido das duas isoformas foram avaliados por transcrição *in vitro* do mRNA dos cotilédones senescentes e os produtos identificados por anticorpos anti-GS1 e anti-GS2, tendo-se verificado uma acumulação do mRNA de GS1 e uma diminuição do mRNA de GS2, o que poderia ser indicativo de uma maior actividade de transcrição do gene da GS1 nos cotilédones senescentes e uma repressão do gene da GS2.

Kamachi et al (1991) demonstraram que durante a senescência natural em folhas de arroz a actividade global decaía, observando-se uma diminuição no nível de polipeptídeos da GS2 paralelamente com a RuBisCO, enquanto os polipeptídeos da GS1 se mantinham constantes (podendo diminuir em fases tardias de senescência (Kamachi et al, 1992)). O mRNA da GS1 aumentava durante a senescência mas em contraste com o observado por Kawakami e Watanabe

(1988) o nível de mRNA da GS2 mantinha-se constante. Estes autores observaram ainda uma diminuição dos níveis de glutamato e um aumento nos níveis de glutamina, que é um dos principais compostos de transporte de azoto no arroz, tendo concluído que durante a senescência a GS1 seria responsável pela síntese de glutamina para transporte, desempenhando um papel importante na remobilização do azoto da folha durante a senescência natural.

Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com os resultados obtidos por outros autores em órgãos senescentes. Como contributo para esclarecer as condições em que se expressa a GS1 nas folhas e o seu papel na remobilização de azoto, manipularam-se as condições de crescimento de modo a que as plantas cresceram numa situação de carência de azoto, que se esperaria ter como efeito um incremento da remobilização das reservas azotadas. Nesta situação observaram-se alterações no padrão das isoformas da GS idênticas às observadas nas situações de senescência anteriormente referidas.

Os resultados obtidos reforçam o papel da GS1 nos processos de reassimilação e síntese de glutamina para transporte.

Na ausência de sondas específicas, (cuja obtenção faz parte da segunda parte deste trabalho), não foram feitos estudos das variações dos mRNAs das duas isoformas mas dentro da hipótese de trabalho é de esperar um paralelismo com as situações descritas, particularmente um incremento dos níveis de mRNA da GS1 (ou de uma GS1) em resposta à necessidade aumentada de remobilização.

Actividade global da GS

Os trabalhos anteriormente referidos apontavam para um decréscimo da actividade global da GS durante a senescência, que atribuíam à perda de GS2 durante este processo (Kamachi et al, 1991; Kawakami e Watanabe, 1988). No presente trabalho, a actividade global da GS era de facto inferior nas plantas submetidas a carência de azoto em relação ao controlo, reflectindo uma degradação mais acelerada desta isoforma (GS2) naquelas condições.

Contudo, existe aparentemente uma discrepância com observações de outros autores no facto de nos presentes resultados a actividade global da GS aumentar nas folhas mais maduras, reflectindo possivelmente o aumento de actividade da GS1 durante a remobilização. A possível explicação reside no facto de as plantas controlo (e igualmente as plantas submetidas a carência de N) estarem já submetidas a algum tipo de "stress" (por ex. osmótico, e/ou temperatura e luz) e portanto a situação controlo não ser a ideal. Isto é corroborado pelo facto de nas folhas jovens das plantas controlo a banda correspondente aos polipeptídeos da GS1 ser já muito intensa o que não acontecia noutras situações "normais" em que esta banda era dificilmente detectável. A actividade da GS observada no controlo também ficou aquém dos valores observados noutros ensaios. Em face disto, e comparando os valores de actividade da GS nas várias folhas, com o respectivo padrão de bandas observadas por "Western blot" conclui-se que o aumento de actividade observado nas folhas mais maduras reflecte o aumento de actividade da GS1.

Contudo, apesar de ser importante avaliar alterações verificadas nas actividades globais das enzimas durante o processo de senescência foliar, é de extrema importância avaliar a abundância relativa das isoformas, assim como a sua distribuição a nível de tecidos e células (Feller e Fischer, 1994).

Resposta da GS2

A diminuição dos polipeptídeos da GS2 foi semelhante à da RuBisCO, o que está em consonância com os resultados de Kamachi et al (1991) que demonstraram um decréscimo no teor de GS2, RuBisCO e Fd-GOGAT, que são enzimas localizadas no estroma dos cloroplastos. A perda de actividade de outras enzimas relacionadas com a fotossíntese, durante a senescência, foi também descrita (Feller e Fischer, 1994).

A senescência foliar é um processo programado e não ocorre de modo síncrono nos vários tecidos mas antes de um modo sequencial (Feller e Fischer, 1994). Nas células de mesófilo de plantas C3, a maior parte do azoto está presente em proteínas, nos cloroplastos, e a degradação das proteínas estromáticas ocorre num período inicial. A taxa fotossintética diminui num período inicial de senescência e o aparelho fotossintético sofre desagregação (Feller e Fischer, 1994). Uma vez que nas células do mesófilo grande parte do azoto está presente nos cloroplastos e envolvido na fotossíntese, a terminação deste processo metabólico permite a remobilização de uma elevada percentagem de azoto enquanto outras funções celulares são mantidas (Feller e Fischer, 1994). As proteínas foliares têm de sofrer um processo de catabolismo, crucial para a formação de compostos que possam ser transportáveis pelo floema mas uma vez que a degradação implica a perda da função e algumas enzimas, este processo tem que ser regulado. As proteínas são degradadas por peptido-hidrolases (Feller e Fischer, 1994). Durante este processo a clorofila é também catabolizada mas não dá origem a compostos de transporte. Por outro lado, o azoto proveniente das proteínas cloroplastidiais é facilmente convertível em aminoácidos de transporte particularmente nas amidas glutamina e asparagina.

GS1 e a localização no floema

Em contraste com a GS2 cloroplastidial, a GS1 parece ser mais resistente à degradação ou mesmo induzida durante o processo de senescência foliar. A hipótese da implicação da GS1 na exportação de azoto foliar foi fortemente apoiada pelos resultados obtidos no presente trabalho em que *pela primeira vez a GS foi localizada em células do floema* o que sugeria fortemente que nesse tecido ocorreria a síntese de glutamina para exportação.

A localização da GS1 no floema e a sua resistência à degradação estão também de acordo com o facto de o floema ser um dos últimos tecidos na folha a sofrer senescência permanecendo activo durante bastante tempo, existindo evidências de que a exportação de aminoácidos e outros solutos é possível até uma fase muito adiantada de senescência (Feller e Fischer, 1994 e referências). Estes autores afirmam que desintegração sequencial dos compartimentos subcelulares e a perda de funções a eles associadas podem ser importantes numa recuperação

elevada dos nutrientes transportáveis pelo floema. Neste contexto insere-se o resultado observado de resistência à degradação da GS1, e coaduna-se com a sua localização no floema. *A separação espacial das duas formas da GS (GS2 e GS1) em tecidos diferentes, posta em evidência neste trabalho, ganha assim um novo significado estando a presença da GS1 no floema relacionada com a funcionalidade deste tecido durante a senescência.*

Nos trabalhos referidos na literatura sobre as alterações na GS durante a senescência, não fora estudadas as alterações a nível de localização das isoformas durante estes processos. Neste trabalho procurou relacionar-se as alterações bioquímicas observadas com possíveis alterações a nível da distribuição da GS em diferentes células e tecidos. Poderia colocar-se a questão de um aumento de GS1 ocorrer nas células de companhia do floema ou em outros tipos de células, nomeadamente no mesófilo. Os resultados não mostraram diferenças significativas em relação ao observado em situação "normal", com a GS1 restrita a células do floema, possivelmente células de companhia, e ausência no citoplasma de células do mesófilo. Contudo, não é de pôr de parte uma expressão aumentada noutras células de parênquima vascular, e nomeadamente em nervuras secundárias.

É de notar que o processo de catabolismo de proteínas foliares e exportação de azoto não é restrito ao processo de senescência (Feller e Fischer, 1994 e referências), ocorrendo continuamente nas folhas e aí estando provavelmente envolvida uma GS1 citosólica. Ora, sabe-se que na maioria das plantas a GS1 é codificada por uma família de genes. Daí, ser importante saber se durante a senescência ocorre um incremento da expressão da GS1 presente nas células de companhia ou se ocorre a indução de uma GS1 específica da senescência, e onde se verifica a sua expressão.

Estas questões levaram á conclusão que para a continuidade do presente trabalho *seria imperioso identificar os diferentes genes responsáveis pela síntese da GS1 na folha e os que se expressam em condições fisiológicas particulares como uma situação de carência de azoto.* A obtenção de sondas específicas poderia permitir o estudo da localização da sua expressão e da sua regulação.

Genes da GS induzidos pela senescência

Como foi referido, trabalhos anteriores descreviam um aumento de mRNA de GS1 traduzido durante a senescência mas sem diferenciar entre as possíveis diferentes formas da GS1.

Para identificar os mecanismos que regulam a expressão da GS específica da senescência Watanabe et al (1994) isolaram três clones de cDNA de GS1 a partir de uma biblioteca de cDNA de cotilédones senescentes de *Raphanus sativus* e verificaram, por análise "Northern", que os transcritos de dois dos genes que codificam a GS citosólica (*Gln1;1 e Gln1;3*) se acumulavam quer durante a senescência induzida por obscuridade quer senescência natural. A aplicação de substâncias exógenas afectava diferencialmente a expressão dos diferentes genes sugerindo um complicado mecanismo de regulação. Por exemplo, a aplicação exógena de citocininas, que se sabe que retardam a senescência (Gan e Amasino, 1996 e referências), inibia a expressão de

Gln1;1 e Gln1;3 levando os autores a sugerir que as citocininas poderiam estar indirectamente envolvidas na expressão destes genes. Os autores pressupõem que estas formas da GS1 se localizem no floema de cotilédones durante a germinação e a senescência mas esse estudo não foi feito.

Num outro estudo, foi usada uma técnica de hibridização subtractiva que permitiu isolar cDNAs representando genes que mostravam uma expressão aumentada durante a senescência foliar em *Brassica napus*. (Buchanan-Wollaston e Ainsworth, 1997). Um deles codificava uma glutamina sintetase com elevada homologia com sequências codificando GS1.

Como já foi referido, (Feller e Fischer, 1994) desconhece-se quantos genes e quais são especificamente expressos durante a senescência. Além disso, a expressão genética pode ser consideravelmente influenciada pelo modo como a senescência é induzida (Becker e Appel, 1993). Estes autores consideram que a senescência induzida pela obscuridade em cevada não reflecte a expressão durante a senescência *in vivo*. No caso de cotilédones de *Raphanus* o seu destacamento e tratamento pela obscuridade causam uma situação de "stress" que influencia a expressão genética.

Contudo, é de prever, que seja qual for a causa da senescência, ocorram mecanismos comuns que envolvam uma expressão aumentada da GS1 ou de *uma* das GS1 em particular (especificamente de um ou mais genes da GS1).

Importância da GS1 no programa recuperação de azoto armazenado

Embora a senescência compreenda essencialmente processos catabólicos são igualmente importantes processos biossintéticos a nível de macromoléculas (mRNA, enzimas) e de metabolitos (por exemplo a metabolização de produtos de catabolismo em compostos de transporte) (Feller e Fischer, 1994).

Quando uma folha perde a sua função como órgão fotossintético, passa a representar uma fonte de nutrientes e mecanismos de recuperação ("salvage-pathways") são accionados na célula (Hensel et al, 1993) que estão implicados na mobilização dos nutrientes. Neste processo seriam activados genes SAG ("senescence-associated genes"), genes cuja expressão é aumentada durante a senescência. Um desses genes parece ser a glutamina sintetase citosólica (Gan e Amasino,1996). As citocininas parecem reprimir alguns genes SAG (Gan e Amasino,1996), nomeadamente os dois genes da GS anteriormente referidos (Watanabe et al, 1994).

Relação entre as citocininas e a senescência em condições de carência de azoto exógeno

Verificou-se que plantas diferentes (*Acer pseudoplatanus* e *Betula pubescens*) respondiam de modo diferente quando colocadas em carência de azoto: enquanto as plântulas de *Acer* deixavam de crescer as de *Betula* continuavam o crescimento iniciando folhas novas à custa das mais antigas (Clarkson e Touraine, 1994). O crescimento continuado desta planta foi associado a um declínio rápido de citocinina enquanto que em *Acer* não se verificavam alterações no conteúdo de citocininas das folhas. Em *Betula* a manutenção do crescimento foi associada à senescência

sequencial das folhas mais velhas e redistribuição do seu azoto, o que não acontecia em *Acer*, onde os níveis de citocininas se mantinham elevados.

Estes resultados ilustram a importância que tem para a planta a capacidade de remobilização e azoto.

O envolvimento da GS nesta capacidade de remobilização, particularmente em condições de carência de azoto, pode ser crucial para o desenvolvimento e a sobrevivência, da planta. As citocininas poderiam estar envolvidas na regulação da GS, particularmente em condições de carência de azoto, que se sabe que inibem a exportação de citocininas a partir da raiz (Marschner, 1995).

No presente trabalho foi verificada uma resposta positiva da GS1 citosólica a uma situação imposta de "stress", que foi a carência de azoto fornecido exogenamente. Não se pôde concluir se era uma expressão aumentada da GS1 especificamente localizada nas células de companhia. Esta situação de "stress" deve conduzir a um aumento da expressão de um ou mais genes da GS citosólica. Mediante a identificação dos diferentes cDNAs das diferentes GS1 expressas na folha em diferentes circunstâncias poderá concluir-se se nesta situação ocorre um incremento de formas de GS1 normalmente presentes ou a expressão de uma GS1 específica, e ainda efectuar a sua localização. Este objectivo foi abordado no âmbito deste trabalho, com o início de rastreio de uma biblioteca de cDNA de folha de batateira.

Os resultados deste estudo apoiam a hipótese de a GS1 na folha de batateira ter um papel importante na mobilização de azoto da planta, particularmente em condições de carência azotada. O facto de saber que a GS1 se localiza no floema dá mais consistência a essa interpretação.

Verificou-se que a expressão da GS1 é estimulada por condições de carência de azoto exógeno possivelmente em resposta a um programa acelerado de senescência foliar em que estaria envolvida na recuperação e redistribuição de azoto de modo a permitir a seu fornecimento às zonas em crescimento. Na batateira, a capacidade de remobilizar azoto é crucial não só para o crescimento vegetativo mas no período de formação de tubérculos e seria interessante observar as alterações observadas na GS1 de folha durante o período de tuberização.

A GS pode ter um papel chave na recuperação do azoto, quando se iniciam os processos catabólicos durante a senescência, assimilando a amónia proveniente dos processos degradativos e evitando a perda de azoto, nomeadamente através da emissão de amónia para a atmosfera (Schjoerring et al, 1993).

O conhecimento da modulação da expressão de uma GS1 em condições ambientais de carência de azoto e a sua possível manipulação, poderia ter um impacto importante a nível prático. É necessário isolar o cDNA da GS citosólica que se expressa nestas circunstâncias de modo a obter sondas específicas que permitam não só estudar a acumulação de transcritos através de "Northern blotting" mas verificar a nível celular onde ocorre essa acumulação. Estes e outros estudos, nomeadamente a regulação genética a nível de promotores, poderão vir a confirmar o importante papel da GS vascular na resposta a situações ambientais de carência de azoto.

Questões em aberto

A regulação da senescência foliar não está ainda bem esclarecida tanto mais que pode ser iniciada por diferentes factores em situações particulares, especialmente de "stress" (Feller e Fischer, 1994).

Questões importantes prendem-se com (Feller e Fischer, 1994):

i) os sensores foliares que desencadeiam a senescência;

ii) a regulação fina da senescência e a sua possível reversibilidade;

iii) (particularmente importante na discussão do papel da GS) os factores que influenciam a recuperação de azoto das folhas senescentes e como podem ser tomados em consideração em programas de melhoramento;

iv) quantos genes específicos de senescência são expressos e quais as proteínas que codificam

Na regulação da senescência foliar podem estar envolvidas interacções entre fitohormonas mas um factor importante parece ser a "força" do consumo nos órgãos "recebedores" ("sink-strength") (Feller e Fischer, 1994). Se um elemento como o azoto se torna limitante as relações fonte/recebedor seriam afectadas e possivelmente o equilíbrio carbono/azoto poderia ser um factor importante na regulação da senescência foliar mas os sensores foliares para estes desequilíbrios em nutrientes não estão identificados.

Não estão também identificados os factores envolvidos directamente no incremento da expressão da GS1 em situações de senescência foliar. Kawakami e Watanabe (1988) sugeriram que o gene da GS1 poderia se induzido pela amónia libertada a partir da degradação de proteínas. Como já foi referido, as citocininas poderiam estar indirectamente envolvidas na regulação de genes da GS1 expressos durante a senescência pois inibem a sua expressão (Watanabe et al, 1994).

Outra questão em aberto é a saber quais as enzimas responsáveis pela desaminação dos compostos azotados durante a senescência e fornecimento de amónia para reassimilação pela GS citosólica em amidas para transporte. Existem várias enzimas responsáveis pela libertação da amónia como glutaminase, asparaginase, etc., mas parecem estar mais localizadas em tecidos jovens em crescimento (Woodall et al, 1996).

A enzima glutamato desidrogenase (GDH) encontra-se em níveis mais elevados em tecidos senescentes do que em outros estados de desenvolvimento e foi demonstrado que a GDH estava envolvida na desaminação do glutamato durante a senescência (Berger et al, 1985). Woodall et al sugeriram que a reacção de desaminação em tecidos senescentes teria como objectivo fornecer amónia para a reassimilação pela GS citosólica para produção de compostos de transporte e sua mobilização para outras partes da planta.

As alterações na actividade da GDH no modelo estudado neste trabalho podem fornecer uma indicação sobe o envolvimento desta enzima na remobilização de reservas azotadas durante esta situação de limitação de fornecimento de azoto.

GS e stress

Os resultados aqui apresentados contribuem também para o conceito emergente de que a GS e particularmente a GS1 (ou uma GS1) estão envolvidas na resposta da planta a situações ambientais de "stress" abiótico e biótico.

Trabalhos anteriores tinham relacionado um aumento da actividade da global GS em folhas de abeto expostas a poluição ambiental (Duball e Wild, 1988) e "stress" hídrico (Mandersheid e Jager, 1993). Em *Pinus taeda*, a exposição ao ozono provocava um aumento das actividades da GS e da GDH, assim como dos aminoácidos derivados da via GS/GOGAT (Mandesheid et al, 1992). Estes autores consideraram que os factores de "stress" desencadeavam uma senescência acelerada e que as respostas verificadas no metabolismo do azoto reflectiriam uma estratégia da planta para uma rápida recuperação da maior parte do azoto das folhas mais velhas sujeitas a senescência acelerada e uma eficiente translocação para locais de reserva ou folhas jovens (Mandersheid et al, 1992; Mandersheid e Jager, 1993).

A senescência é considerada assim uma forma e a planta se adaptar a condições ambientais (Feller e Fischer, 1994) e de lidar com o "stress" (Millard, 1988). Conforme a duração do período de "stress" este processo pode permitir a manutenção e reparação dos órgãos em crescimento caso contrário pode levar à morte da planta (Mandersheid et al, 1992).

O conteúdo relativo de GS1 aumentava em folhas de tomateiro em resposta à infecção por *Pseudomonas syringae* (Pérez-Gacía et al, 1995) e muito recentemente Bauer et al (1997) demonstraram que a deficiência hídrica estimulava a expressão da GS1.

A GS, e particularmente a GS1, parece, assim, ter um papel fundamental em estratégias de resposta ao "stress" e daí a extrema importância do seu estudo e manipulação.

Assim, os resultados obtidos neste trabalho apoiam não só o papel da GS1 na normal remobilização de azoto das folhas para outras partes da planta mas, também, como tendo possivelmente um papel chave no programa de resposta da planta a situações de "stress" (neste caso a carência de azoto), nomeadamente de activação de "genes relacionados com senescência" entre os quais estão provavelmente incluídos um ou mais genes da GS1.

Alterações na GS do tubérculo durante o abrolhamento

A GS foi pela primeira vez estudada em tubérculos e localizada nos seus diferentes tecidos. Foram estudadas as alterações da actividade e polipeptídeos da GS em situação de abrolhamento e a GS foi localizada nos tecidos do tubérculo em desenvolvimento e tubérculo maduro. As alterações bioquímicas verificadas e a sua correlação com a localização da GS em diferentes tecidos possibilitou uma interpretação do papel desta enzima nos tubérculos em contextos diferentes de interconversão de compostos azotados permitindo avaliar o seu contributo nas alterações globais observadas nesses contextos, nomeadamente a fase de abrolhamento, e contribuir assim para o esclarecimento das alterações bioquímicas que ocorrem durante essa fase.

Como já foi referido, somente os polipeptídeos da GS1 (citosólica) foram detectados em extractos de tubérculos. Em continuidade com o trabalho aqui descrito em folhas de batateira, foi feito um estudo das alterações da GS em tubérculos em abrolhamento, uma situação que implica a remobilização das reservas de azoto e o seu redireccionamento para os brolhos em germinação. Nesta experiência foi também manipulado o suprimento de azoto fornecido exogenamente.

Neste trabalho foi verificado que

- a GS apresentava uma actividade bastante elevada no tubérculo em início de abrolhamento, provavelmente para dar resposta às necessidades de mobilização de reservas para o crescimento dos brolhos, apresentando um pico de actividade logo após a plantação mas diminuindo sucessivamente ao longo do tempo em tubérculos que deram origem a plantas às quais foi fornecida exogenamente solução nutritiva. O nível de polipeptídeos da GS1 diminui igualmente e paralelamente verificou-se um decréscimo no teor de proteínas solúveis. Contudo a análise por SDS-PAGE revelou que as alterações não afectavam igualmente todos os polipeptídeos;

- em tubérculos que deram origem a plantas às quais não foi fornecido azoto exogenamente, a GS manteve-se activa durante mais tempo e a proteína da GS também era detectada com maior intensidade, embora o tubérculo estivesse mais senescente, com um teor de proteínas de reserva muito inferior ao verificado na situação anterior ao fim do mesmo tempo de plantação.

Estes resultados apresentam uma estreita consonância com os resultados obtidos em folha apoiando fortemente o papel da GS1 na remobilização de reservas azotadas em situação de necessidade em locais de crescimento, neste caso os brolhos. A posterior utilização de fonte primária de azoto pela planta inibe a remobilização e concomitantemente a expressão da GS. Mas, o que é também patente é que a limitação no fornecimento de azoto tem como consequência a manutenção por mais tempo da expressão da GS nos tubérculos, o que está possivelmente relacionado com a estimulação da remobilização e utilização das reservas endógenas. Isto está de acordo com a diminuição mais acelerada do teor de proteínas solúveis nestes tubérculos. Neste caso, e na ausência de fonte primária de azoto, o tubérculo funcionaria para a planta como uma fonte secundária de azoto resultante da degradação proteica. De algum modo essa necessidade acrescida de mobilização reflecte-se nos níveis mais elevados de GS.

Assim, a GS no tubérculo parece ter grande importância nas fases iniciais de abrolhamento, mas à medida que a planta se desenvolve e desenvolve potencial fotossintético, dá preferência à utilização das fontes primárias de azoto que são posteriormente reduzidas e assimiladas nas folhas, verificando-se a inibição da remobilização de N dos tubérculos e um concomitante decréscimo de GS nestes órgãos.

Contudo, nos tubérculos de plantas a que não foi fornecido azoto verificam-se alterações que implicam a manutenção da proteína e actividade da GS por mais tempo.

A sequência de eventos parece ser:

ausência de N fornecido exogenamente---->carência de azoto nos locais de crescimento-----> incremento da mobilização das reservas proteicas----->incremento da GS1

A natureza dos sinais que determinam o "shift", ou seja, estas alterações (desvios) de metabolismo na planta não é conhecida e é uma questão que se apresenta de grande interesse.

Alterações semelhantes foram observadas por Ta (1991) em que o fornecimento de azoto afectava o grau de remobilização e de níveis da GS. Estudos feitos durante o desenvolvimento dos grãos de milho (Ta, 1991) mostraram que os níveis de GS aumentavam no caule quando as plantas eram transferidas de um meio rico em azoto para um meio sem azoto, estimulando assim a remobilização; por outro lado, quando plantas crescidas em meio deficiente em azoto eram transferidas para um meio rico em azoto, verificava-se um aumento de N no caule (correspondendo a uma supressão da remobilização) e uma decréscimo progressiva dos níveis de proteína da GS.

É possível que, no processo de indução da GS1 em resposta a necessidades de remobilização, se verifiquem mecanismos semelhantes aos descritos para a senescência foliar e que vários genes, nomeadamente da GS sejam activados em situação de carência de azoto.

A pesquisa de cDNAs de GS de tubérculo é um dos objectivos a atingir na sequência deste trabalho, assim como as alterações verificadas nos respectivos transcritos em diferentes situações fisiológicas e ambientais.

O teor em proteínas totais solúveis foi determinado pelo método de Bradford, baseado no azul de Coomassie, que é um dos métodos que permite a determinação da "verdadeira proteína" (Desborough, 1985).

A análise por SDS-PAGE do padrão de proteínas solúveis totais do tubérculo demonstrou um progressiva diminuição na quantidade e intensidade das bandas ao longo do tempo, após a plantação. Contudo, não se verificava um decréscimo homogéneo em todas as proteínas de reserva desaparecendo algumas mais rapidamente (80 kDa) e mantendo-se outras durante mais tempo (40 kDa), possivelmente a patatina; o complexo de bandas na zona dos 17-22 kDa, compreendendo possivelmente inibidores de proteases também não eram visíveis ao fim de 8 semanas de cultura.

Nos tubérculos, ao contrário das folhas, o azoto presente em proteínas está em proporção inferior ao azoto solúvel não proteico que corresponde a 40-60% do azoto total e compreende essencialmente as amidas glutamina e asparagina (Steward et al, 1981).

As proteínas presentes no tubérculo forma inicialmente descritas de acordo com a classificação de Osborne[1] compreendendo essencialmente albuminas e globinas mas as percentagens relativas não apresentavam concordância nas descrições feita por diferentes autores (Desborough, 1985).

[1]As proteínas form inicialmente classificadas pela solubildade em diferentes soluções segundo Osborne (1907): 1- albuminas, solúveis em água e soluções salinas; 2- globulinas, solúveis em soluções salinas e insolúveis em água; 3- prolaminas, solúveis em soluções alcoólicas; 4-gluteninas (solúveis em soluções ácidas ou alcalinas). Em Azcon-Bieto e Talon, 1993.

A análise dos peptídeos solúveis totais de tubérculo por SDS-PAGE ao longo do desenvolvimento (Desborough, 1985), demonstrou que nos tubérculos maduros se observava uma concentração de subunidades essencialmente na zona dos 40 kDa, dos 17-20 kDa e ainda um polipeptídeo de 80 kDa.

Durante a formação dos tubérculos acumulam-se proteínas de reserva (Ewing e Struik, 1992). As duas principais classes de proteínas de reserva são a patatina, que é uma família de glicoproteínas de aproximadamente 40 kDa e um complexo de proteínas na zona dos 22 kDa, que possivelmente compreende inibidores de proteases. Outra proteína de reserva é o inibidor de protease I de aproximadamente 12 kDa (Ewing e Struik, 1992).

A patatina é a principal proteína de reserva e pode representar 40% da proteína total solúvel nos tubérculos. Colectivamente, a patatina e os inibidores de proteases podem representar 80% das proteínas presentes no tubérculo maduro. Presume-se que o papel da patatina como proteína de reserva é o fornecimento de azoto durante o abrolhamento e fases iniciais de desenvolvimento da planta (Ewing e Struik, 1992). Contudo, parece também possuir uma actividade de esterase, o que poderia ser importante durante o abrolhamento pois poderia facilitar a hidrólise das membranas em células mais velhas e a disponibilidade de metabolitos.

Os resultados apresentados neste trabalho evidenciaram a depleção de proteínas de reserva no tubérculo durante o abrolhamento, e após a plantação, sendo essa depleção mais rápida se não for fornecido azoto durante o desenvolvimento da planta.

É também patente o envolvimento da GS1 na utilização das reservas azotadas endógenas do tubérculo nesta fase de desenvolvimento, mas não é claro o modo como estes processos estão relacionados.

Contudo, foi possível concluir que a GS1 é expressa em nível elevado e está activa durante o abrolhamento dos tubérculos e que o seu papel está relacionado com a remobilização de azoto existente nas proteínas de reserva. A situação de carência de azoto exógeno tem como consequência um incremento da mobilização das reservas para os locais de crescimento e esse incremento é acompanhado por níveis mais elevados de GS1.

A expressão da GS1 num órgão de reserva (o tubérculo) numa situação e abrolhamento em que há remobilização das reservas para a planta em desenvolvimento tem algum paralelo com o papel proposto para a GS1 na mobilização de reservas e interconversão de aminoácidos durante a germinação de sementes (Roche et al, 1993).

É possível que se trate de um ou mais genes que especificamente se expressem numa situação de abrolhamento.

Foi observado que os níveis de mRNAs de diferentes genes da GS1 eram diferencialmente regulados em cotilédones de soja durante a germinação (Roche et al, 1993) e em cotilédones de rabanete durante a germinação e a senescência (Watanabe et al, 1994).

Assim, os resultados aqui apresentados parecem constituir um padrão consistente com outros resultados da literatura em que a GS1 ou algumas formas da GS1, parecem estar envolvidas no programa de mobilização de reservas em órgãos "fonte". Esses órgãos podem ser folhas em

senescência ou as sementes em germinação ou ainda os tubérculos que fornecem o azoto necessário para o desenvolvimento da planta.

Contudo, a natureza dos sinais que regulam a GS, as vias metabólicas que dão origem à libertação de amónia nos diferentes tecidos e o destino da glutamina sintetizada podem ser diferentes.

Como já tem vindo a ser referido, não tem sido relacionada na literatura a localização da GS1 em órgãos das plantas nas situações referidas anteriormente.

Neste trabalho a GS foi localizada em tubérculos em abrolhamento tendo-se verificado (ver secção seguinte) uma localização muito intensa mas muito localizada no floema, muito particularmente no floema interno

A intensidade da marcação muito restrita a determinadas células leva a supor que a determinação da actividade total em extractos de órgão completo subestima bastante a importância e actividade local da enzima que poderá ser extremamente intensa em situações de abrolhamento em tecidos específicos neste caso o floema interno.

Localização da GS em tubérculos e brolhos

A localização da GS em tecidos de tubérculo foi feita por "tissue printing" imunológico e por imunocitoquímica ultraestrutural. A utilização de impressões de tecido em nitrocelulose permitiu um observação de grande áreas de tecido e do padrão global da distribuição da GS. Por imunocitoquímica ultraestrutural a GS foi localizada a nível celular. Estes resultados foram posteriormente relacionados com a expressão de mRNAs de GS em tecidos de tubérculo por técnicas de "Northern tissue printing" (ver secção posterior).

Em impressões de tecido em nitrocelulose de um tubérculo em desenvolvimento a GS aparece na região vascular próxima do hilo que é a zona de ligação ao rizoma. O tubérculo em desenvolvimento é um órgão "recebedor" e os composto azotados provenientes da folhas são fornecidos ao tubérculo via floema essencialmente na forma de aminoácidos principalmente das amidas glutamina e asparagina (Burton, 1989). A presença de níveis elevados de glutamina e asparagina no tubérculo pode ser consistente com o facto de serem a principais formas de transporte para o tubérculo mas também pode ser interpretado como sendo uma forma de armazenamento de azoto antes de serem metabolizadas. As formas de transporte de N sofrem interconversões que dão origem a compostos necessários na síntese proteica (Burton, 1989).

A presença de GS na zona vascular próxima do hilo sugere que nestes tecidos a GS esteja activamente envolvida no metabolismo dos produtos azotados que chegam ao tubérculo. O catabolismo de compostos azotados de transporte em órgãos recebedores com libertação de amónia e subsequente recaptura pela GS foi descrito em plantas superiores (Lea e Miflin, 1980). A presença da GS no parênquima vascular no pedículo do grão de milho em desenvolvimento foi relacionada com metabolismo dos compostos de transporte que chegam a este órgão tendo sido sugerido que se criaria assim um gradiente entre o floema e os tecidos

vizinhos que favoreceria o "descarregamento" ("unloading") de aminoácidos do floema (Felker e Muhitch, 1990).

Os tubérculos representam órgãos "fonte" ou "recebedor" em diferentes estados de desenvolvimento da planta. Tanto a mobilização de azoto a partir dos órgãos "fonte" como a degradação dos produtos de transporte nos tecidos recebedores originam amónia que é provavelmente assimilada pela GS (Sechley et al, 1992).

Nos tubérculos maduros, a abrolhar, a GS localizava-se essencialmente no floema interno onde a marcação por anticorpos era muito intensa e localizada.

A GS aparecia ainda na base dos brolhos, possivelmente na zona de feixes vasculares que para aí se dirigem e também em tecidos meristemáticos como a zona dos "olhos" ou ápices de brolhos. A GS também aparecia em zonas muito localizadas, na periferia, possivelmente zonas próximas da emergência de brolhos.

Um aspecto importante deste resultado é localização da GS em diferentes tipos de tecidos, o que reflecte possivelmente o envolvimento da GS em diferentes aspectos de metabolismo do azoto, nomeadamente a origem a amónia utilizada pela GS e a posterior utilização da glutamina.

A localização no floema interno sugere que a GS estaria envolvida na remobilização do azoto proveniente de catabolismo das proteínas de reserva e síntese de glutamina para transporte para zonas de crescimento.

Nas zonas meristemáticas estaria envolvida possivelmente na metabolização de compostos e transporte e na síntese de glutamina para posterior interconversão de aminoácidos utilizados na síntese proteica activa nestas zonas. A localização intensa da GS nestas zonas põe em relevo o seu papel nos órgãos "recebedores", ao qual tem sido dada pouca atenção tendo sido mais posta em relevo a sua acção em situações que requerem mobilização de órgãos "fonte".

Papel do floema interno

O floema interno ocupa uma extensa área do tubérculo, chamada a zona perimedular. Nesta região numerosos feixes de floema ficam separados por parênquima mas pode ocorrer anastomose entre eles (Cutter, 1992).

Trabalhos de Ahmed e Sagar (1981) utilizando ^{14}C demonstraram que o floema interno era a principal via de entrada de assimilados para o tubérculo em desenvolvimento. Este tecido é pois funcional no transporte de carbohidratos e será pois provável que também desempenhe um papel significativo no transporte de nutrientes azotados. Os resultados aqui obtidos sugerem não só que o floema interno possa ser a via de entrada de compostos azotados para o tubérculo em desenvolvimento mas suportam muito claramente que este tecido está envolvido na distribuição de compostos azotados provenientes das reservas proteicas para as zonas mais externas do tubérculo onde ocorre a germinação dos gomos e crescimento dos brolhos.

A GS e os fluxos de azoto durante o abrolhamento

Como foi referido na introdução, não existe concordância quanto ao conceito de dormência mas de acordo com Burton (1989), este termo significa o estado em que não se verifica crescimento dos gomos por causas quer endógenas quer exógenas. Contudo, o crescimento ou a sua ausência são a expressão visível do equilíbrio entre alterações bioquímicas, (que estão sempre a ocorrer e não estão paradas, mesmo no período de "dormência") e as condições ambientais (Burton, 1989). Durante o armazenamento, o metabolismo contínuo do tubérculo inclui reacções que levam a que o equilíbrio bioquímico permita o crescimento dos gomos, em ambiente propício (Burton, 1989). Contudo segundo Burton (1989), a bioquímica da dormência e crescimento não é totalmente conhecida dado que não foram completamente identificadas as substâncias que participam neste processo.

Compilações compreensivas das modificações ocorridas durante o período de dormência e início de abrolhamento podem ser encontradas em Burton (1989) e Hemberg (1985) nomeadamente alterações hormonais, no metabolismo respiratório e dos carbohidratos.

Foram descritas alterações nos compostos azotados, mas não são feita no geral referências às enzimas envolvidas. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a GS pode ter um papel importante neste processo.

Já foi referido que os compostos azotados do tubérculo compreendem essencialmente aminoácidos livres e amidas e proteínas com funções metabólicas. (Burton, 1989). Todos estes componentes são continuamente reciclados e as alterações verificadas reflectem-se largamente no catabolismo e síntese de proteínas de acordo com alterações no equilíbrio metabólico (Burton, 1989).

Durante a dormência verifica-se um fluxo de aminoácidos para o interior do tubérculo onde ocorre síntese proteica. No abrolhamento ocorreria o fluxo inverso, sendo o abrolhamento dependente do movimento de aminoácidos das regiões mais internas para os gomos (Hemberg, 1985).

Um aumento de N solúvel, principalmente de amidas , foi observado no gomo terminal e córtex no final do período de dormência concomitantemente com uma diminuição da proteína presente na medula. Foi também observado o aumento do teor de outros aminoácidos livres como triptofano, valina, ácido gama-aminobutírico, etc. Este aumento de aminoácidos livres deveria ocorrer à custa de outros compostos azotados, nomeadamente as proteínas. Para além do decréscimo observado na proteína da medula também foi detectada uma intensa actividade proteolítica na região circundante dos gomos no fim da dormência (Burton, 1989 e referências).

Os elevados níveis de actividade GS verificados no início do abrolhamento e a concomitante diminuição das reservas proteicas estão de acordo com as alterações descritas anteriormente, nomeadamente o aumento de amidas na zona externa do tubérculo e a diminuição de proteínas solúveis. Os aminoácidos resultantes do catabolismo proteico podem ser transportados directamente ou ser interconvertidos noutras formas, nomeadamente amidas. A localização da

GS no floema interno indica fortemente que esta enzima está implicada nesta interconversão e na síntese de glutamina para transporte para as zonas periféricas do tubérculo.

A presença de GS nas zonas circundando os olhos e em zonas muito localizadas na periferia do tubérculo, possivelmente próximo de locais de emergência dos brolhos, deve estar relacionada com a metabolização da amónia resultante do catabolismo proteico que aí ocorre e produção de glutamina para interconversão de aminoácidos para utilização na síntese proteica activa dos tecidos em crescimento.

Nos tecidos meristemáticos "recebedores" os aminoácidos derivados i) do transporte ou ii) do catabolismo proteico das áreas adjacentes podem ser utilizados directamente na síntese proteica ou sofrer interconversões ou desaminação que levam à libertação de amónia que tem que ser recapturada pela GS. O azoto do grupo amida da glutamina pode ser transferido para outros compostos como glutamato (via GOGAT), que é o principal dador de azoto para outros aminoácidos.

O metabolismo dos produtos de transporte nos tecidos recebedores requer a presença da GS já que várias enzimas envolvidas no catabolismo de aminoácidos dão origem à libertação de amónia.

A glutamina é extensivamente metabolizada nos tecidos recebedores dando origem a outros aminoácidos ou a ácidos orgânicos e açúcares.

A presença de glutaminase, asparaginase, alantoicase e arginase tem sido demonstrada em tecidos em crescimento activo que recebem glutamina, asparagina, ureídos ou arginina, por exemplo cotilédones, folha em desenvolvimento, ápices radiculares e tecidos reprodutivos (Woodall et al, 1996).

Estes dados vêm contribuir para a interpretação da presença da GS em elevados níveis em zonas localizadas à superfície do tubérculo e nas zonas do olho e das zona do gomo onde é necessário metabolizar a amónia derivada dos produtos de transporte de azoto ou de degradação proteica nas áreas circundantes e produzir glutamina e glutamato para posteriores interconversões de aminoácidos e utilização na síntese proteica.

A presença de mRNA de GS nestas zonas foi posteriormente confirmada por "Northern tissue printing" em que impressões de tecido em nitrocelulose foram posteriormente incubadas com uma sonda homóloga que consistia em parte de um cDNA de GS (ver secção posterior).

Um resultado importante destes estudos de "Tissue printing" é a presença da GS em diferentes tecidos sugerindo que a GS1 nos tubérculos, ou possivelmente mais do que uma forma da GS1, está envolvida em diferentes aspectos do metabolismo do azoto.

O tipo exacto de células em que a GS se expressa nos diferentes tecidos só pode ser avaliado por microscopia electrónica, o que foi feito neste trabalho para o floema interno (ver à frente).

Actualmente prevalece o conceito que a existência de múltiplos genes da GS1 codificariam diferentes formas da GS1 estariam envolvidas em diferentes aspectos do metabolismo do azoto, dado que amónia pode ser produzida por diferentes vias metabólicas e a glutamina pode ter diferentes utilizações (Sukanya et al, 1994).

É, assim, possível, que diferentes genes da GS1 se expressem no tubérculo. O isolamento de cDNAs de GS de tubérculo está a decorrer e pode permitir seguir a acumulação dos respectivos transcritos e localizá-los nos diferentes tecidos em vária fases de desenvolvimento.

Distribuição da GS em tubérculos dormentes e tubérculos em grau avançado de abrolhamento

A transição da dormência para o abrolhamento foi objecto de um estudo preliminar, em que a distribuição da GS foi comparada em tubérculos recentemente adquiridos, sem qualquer sinal visível de actividade dos gomos, e tubérculos mantidos à temperatura ambiente, na obscuridade, com desenvolvimento muito pronunciado dos brolhos.

Os resultados demonstraram que a GS estava já presente nos tubérculos "dormentes", embora em quantidade diminuta. Contudo, o padrão de distribuição e a intensidade eram nitidamente diferentes nos dois tipos de tubérculos. Dada a quantidade diminuta de GS detectada por este tipo de técnica, seria de prever que a actividade enzimática não teria expressão em extractos totais de tubérculo.

Nos tubérculos sem brolhos a GS parece estar muito dispersa pela zona perimedular, próxima do anel vascular. De uma maneira geral não se observa à periferia, mas a sua presença numa pequena zona situada à periferia pode ser um indício de início de actividade na zona dos gomos.

Nos tubérculos com brolhos a GS tem uma distribuição muito generalizada pelo floema interno, aparecendo marcação numa extensa área de região perimedular em grupos de células formando fiadas e ramificações, o que é consistente com um metabolismo intenso de recuperação de reservas endógenas para manutenção do crescimento dos brolhos. A GS aparece em zonas que ladeiam ramificações que se dirigem para os brolhos estendendo-se depois à periferia, na zona do "olho".

Estudos futuros incidirão nas alterações verificadas nos níveis e actividade de GS na transição dormência-abrolhamento. Contudo é possível que a actividade não seja detectada em extractos de tubérculo em estados muito iniciais de expressão desta enzima já que, além de presente em baixos níveis, está confinada a um poucas células, no conjunto dos tecidos do tubérculo. A sua expressão nestas células pode ser, contudo, detectada por técnicas *in situ*, como imunocitoquímica ou hibridização *in situ*.

É possível que a expressão da GS ocorra em fases muito precoces de início de actividade dos gomos e de mobilização das reservas, antes de serem visíveis alterações morfológicas, podendo funcionar como um indicador de transição para a fase de crescimento, estando associada a interconversões de compostos azotados e alterações nos fluxos e azoto. Seria interessante verificar quando e em que tecidos ocorre a expressão da GS. Paralelamente, pretende-se seguir a acumulação e localização de transcritos da GS durante o período de dormência e antes de sinais visíveis de crescimento.

Localização da GS em tecido vascular de tubérculo por imunocitoquímica ultraestrutural

Os resultados anteriores apontavam para a existência no tubérculo de uma GS citosólica com distribuição muito localizada em certos tecidos, principalmente o floema interno.

Para confirmar a distribuição subcelular e o tipo de células onde ocorre a GS e portanto contribuir para a identificação do tipo de células onde ocorre o metabolismo de assimilação de amónia, foi feito o estudo de localização por imunocitoquímica ultraestrutural da GS na zona do floema interno.

A GS localizava-se abundantemente no citoplasma de células muito vacuolizadas que apresentavam numerosas mitocôndrias, podendo ser células de companhia. Não se detectou GS nos amiloplastos mas detectou-se em pequenos plastídeos. Outros autores descreveram a detecção por imunocitoquímica estrutural da GS em plastídios em órgãos não verdes (Peat e Tobin, 1996) mas em níveis muito baixos que não permitem a sua detecção por técnicas habituais de "Western blotting".

Futuros estudos de localização da GS a nível ultraestrutural deverão incidir noutros tecidos e tipos de células e assim contribuir para caracterização do metabolismo onde a GS está envolvida, a nível celular.

A presença da GS em tubérculos obtidos *in vitro*, neste laboratório, abre perspectivas para o estudo da regulação desta enzima já que se trata de um sistema altamente controlado, em que podem ser manipuladas diferentes variáveis que se pretendam introduzir.

Construção de uma biblioteca de cDNA de folha de batateira em Lambda gt11 *Sfi-Not*

O estudo da estrutura de genes e da sua expressão assenta na disponibilidade de sequências de DNA para utilização como sondas (Huynh et al, 1985). Na maioria dos casos, a estratégia mais utilizada para isolamento de genes eucarióticos consiste em isolar primeiramente uma cópia de DNA do mRNA mensageiro (clone de cDNA) codificado pelo gene de interesse (Huynh et al, 1985). A estratégia geral inclui a construção de uma biblioteca de cDNA que representa uma população de mRNA de um determinado órgão ou tecido e o cDNA de interesse é identificado por meio de uma sonda adequada.

A proporção de vários mRNAs numa célula varia em função da velocidade da sua síntese e do seu tempo de semi-vida. Os genes que são activamente transcritos em RNAs estáveis contribuem de uma forma mais significativa para o conjunto total dos mRNAs do que os são transcritos mais lentamente ou formam mRNAs pouco estáveis (Sambrook et al, 1989).

A frequência com que os clones de cDNA de uma espécie particular de mRNA estão representados numa biblioteca é proporcional à abundância dessa espécie na população de mRNA (Huynh et al, 1985). Contudo, na prática, vários factores influenciam a representação de um cDNA particular numa biblioteca, como por exemplo, a instabilidade do mRNA, a tendência de certas sequências para serem clonadas preferencialmente e a presença de múltiplos

tipos de células num tecido particular, onde nem todas expressam o cDNA de interesse (Watson e Demmer, 1995).

O isolamento de cDNAs de uma espécie pouco abundante de mRNA implica a construção de bibliotecas de grande tamanho, possuindo 10^5-10^7 recombinantes. Uma biblioteca com cerca de 10^5-10^7 recombinantes deveria teoricamente conter sequências representando mRNAs pouco abundantes (Huynh et al, 1985). mRNAs pouco abundantes são definidos como estando presentes em cerca de 20 cópias por célula ou menos (Watson e Demmer, 1995).

Com o objectivo de abordar a caracterização da família de genes de GS da batateira foram construídas duas bibliotecas de cDNA de folha de batateira em fago Lambda gt 11 *Sfi-Not*. As bibliotecas possuíam um elevado número de recombinantes (respectivamente 2,8 x 10^6 e 2,4 x 10^6), o que seria suficiente para conter sequências representativas de mRNAs pouco abundantes.

A partir dessa biblioteca poderiam ser isolados e caracterizados clones de cDNA de GS que constituíssem sondas específicas permitindo i) determinar a complexidade e organização da família de genes da GS; ii) caracterizar o padrão de expressão dos genes correspondentes da GS, em vários órgãos e em diferentes contextos fisiológicos, nomeadamente por "Northern blotting" ou hibridização *in situ*; pesquisar clones de DNA genómico em bibliotecas genómicas para identificação de regiões promotoras e estudos de regulação.

Recorrendo a bancos de dados de nucleótidos foi possível identificar zonas bem conservadas em sequências de cDNA de GS de várias plantas e a partir delas desenhar iniciadores que permitiram a obtenção, por PCR, de um fragmento de cDNA de batateira amplificado, que constituiu uma sonda para rastrear uma biblioteca amplificada de cDNA de folha construída em fago Lambda gt11 *Sfi-Not*. Esperava-se que esta sonda reconhecesse diferentes cDNAs de GS já que a zona amplificada era bem conservada em sequências de cDNAs de GS citosólicas e cloroplastidiais. Contudo, os clones até agora isolados a partir desta biblioteca correspondem ao mesmo mRNA que codifica a subunidade cloroplastidial da GS. Este resultado está de acordo com o facto de esta forma ser maioritariamente expressa em folhas verdes, tal como já foi demonstrado por técnicas de "Western blot", mas o facto de se terem utilizado as folhas com as nervuras (onde se expressa predominantemente a forma citosólica da GS) na extracção de mRNA para construção da biblioteca, leva a supôr que mRNAs codificando subunidades de GS1 se encontrem representados na biblioteca.

O número de recombinantes da biblioteca de cDNA de folha rastreada (2,8 x 10^6) deveria ser suficiente para conter sequências representativas de mRNAs pouco abundantes (<20 cópias por célula). Contudo, na prática, muitos mRNAs estão presentes em níveis muito baixos (1 cópia por célula) e além disso, são isolados de tecidos que consistem em diferentes tipos de células, o que reduz a sua representação na preparação inicial de mRNA (Sambrook et al, 1989).

Embora um mRNA raro possa estar representado na biblioteca, o rastreio de numerosos clones (>10^6) é um processo muito laborioso e dispendioso. Podem ser utilizadas técnicas alternativas, como por exemplo a amplificação do cDNA por PCR (Watson e Demmer, 1995).

Para além do rastreio da biblioteca, estão a ser utilizadas outras técnicas, nomeadamente RACE (Frohman et al, 1988; Frohman, 1995) para isolar cDNAs de GS1 a partir de folha e de tubérculo.

Os clones isolados

A partir da biblioteca de cDNA de folha foram isolados dois clones, incompletos a 5', λ14.A.1.2 e λJ9A12.2 que representam o mesmo mRNA. A análise da sequência do clone mais longo confirmou que se tratava de um clone de cDNA da GS cloroplastidial. Este resultado é apoiado pelo facto de o mRNA da GS cloroplastidial ser o mais abundante nas folhas, onde a GS cloroplastidial é a isoenzima predominante. A análise de homologias com sequências de cDNAs de GS presentes em bancos de dados, mostrou uma homologia mais significativa com clones de cDNA de GS2 de várias plantas do que com clones de cDNA de GS1. Por outro lado o cDNA do λ14.A.1.2 codifica um polipeptídeo que possui uma extensão de 16 resíduos de aminoácidos na extremidade C-terminal, que é característica dos polipeptídeos de GS2 (Forde e Cullimore, 1989).

Os polipeptídeos da GS2 estudados possuem em relação às subunidades citosólicas, uma extensão de cerca de 60 aminoácidos na extremidade N-terminal e uma extensão de 16 aminoácidos, cujo significado é desconhecido, na extremidade C-terminal (Lightfoot et al, 1988; Tingey et al, 1988; Freeman et al, 1990; Sakamoto et al, 1989).

Estudos anteriores demonstraram que a subunidade da GS2, como outras proteínas cloroplastidiais, é sintetizada inicialmente como um precursor de elevado peso molecular que é processado posteriormente, sofrendo clivagem de uma sequência N-terminal durante o processo de transferência para o cloroplasto (Lightfoot et al, 1988; Tingey et al, 1988). Lightfoot et al (1988) demonstraram que a extremidade N-terminal era essencial para o transporte da GS para os plastídios, contendo uma pré-sequência com algumas características em comum com outras pré-sequências responsáveis por dirigir polipeptídeos para os cloroplastos (Lightfoot et al, 1988; Forde e Cullimore, 1989; Freeman et al, 1990).

Os clones isolados λ14.A.1.2 e λJ9A12.2 não possuem a região 5' que codifica a porção N-terminal da proteína. Contudo, foi possível concluir que constituem clones de cDNA da GS cloroplastidial de *S. tuberosum* e que representam o mesmo mRNA correspondente ao gene *Gln*2 de *S. tuberosum*. Provavelmente, à semelhança de que foi verificado para outras espécies (Peterman e Goodman, 1991, Stanford et al, 1993), um só gene codifica a subunidade cloroplastidial da GS em *S. tuberosum*.

Significado das homologias verificadas

O cDNA do clone λ14.A.1.2 mostrou uma homologia elevada com zonas codificantes de cDNAs de GS cloroplastidiais de várias plantas mas particularmente com um cDNA que codifica a GS2 em *Nicotiana sylvestris*. É de notar que foram encontradas homologias elevadas (75%) entre a região 3' não codificante do cDNA 14.A.1.2 e as regiões correspondentes em

cDNAs de GS2 de *Nicotiana sylvestris* e de *Lycopersicon esculentum*, enquanto que as homologias observadas com regiões correspondentes de outras cDNAs de GS cloroplastidiais não eram significativas, incluindo a Solanaceae *Nicotiana plumbaginifolia*. Este resultado é inesperado, dado que as maiores divergências entre cDNAs de GS são encontradas na região 3' não codificante que são frequentemente utilizadas como sondas específicas em análise por "Southern blotting" e "Northern blotting".

As porções não codificantes (intrões e porções não codificantes a 3' e 5') de genes activos não estão sujeitas a pressões selectivas, embora possa existir selecção para a preservação de sequências que dirigem o "splicing" ou outros processos pós transcrição como por exemplo a estabilidade do mRNA (Walker et al, 1995). Contudo, os intrões, assim como as porções não codificantes a 5' e a 3' dos membros da maior parte das famílias multigénicas, mostram um grau tão elevado de divergência que não permite a identificação de homologias (Walker et al, 1995). Uma exepção é a elevada homologia verificada entre as porções não codificantes dos genes de GS citosólica GS3A e GS3B de ervilheira (96%) (Walker et al, 1995).

É de notar, que clones de GS da mesma planta, apresentam homologias mais baixas na zona 3' não traduzida. Por exemplo, dois clones de GS1 de videira (Loulakakis et al, 1996) apresentam uma homologia de 40% a nível de nucleótidos nas regiões 5' e 3' não traduzidas.

Em *Phaseolus vulgaris* as regiões 5' e 3' não traduzidas do cDNA de GS cloroplastidial revelaram possuir menos de 40 % de homologia com cDNAs de GS citosólica da mesma planta e 55 % com região homóloga a 3' do cDNA de GS plastidial de ervilheira (Lightfoot et al, 1988).

Em tomateiro dois cDNAs parciais isolados, respectivamente da GS1 e GS2, revelaram possuir maior homologia respectivamente com outros cDNAs de GS1 e GS2, do que entre si (69,8% na região codificante). A região 3' não codificante do clone cloroplastidial apresentava 25-44% de homologia com outras sequências de cDNA de GS cloroplastidial mas, curiosamente, apresentava também uma homologia elevada (87 %) nesta zona com cDNA de GS2 de *N. sylvestris* (Pérez-Rodríguez e Valpuesta, 1996)[1].

Sabe-se que a estrutura primária dos polipeptídeos da GS é bastante conservada, mesmo entre as subunidades cloroplastidiais e citosólicas exceptuando as extensões N-terminal e C-terminal destas (Forde e Cullimore, 1989).

A nível de nucleotídeos, as sequências de GS de plantas revelaram uma identidade de 70-90% na região codificante, excluindo desta comparação as extensões a 5' e a 3' das sequências codificando GS cloroplastidiais (Doyle, 1991). Contudo, verificou-se que o cDNAs para GS2 de espécies de dicotiledóneas estão mais relacionados com cDNAs de GS2 de espécies de monocotiledóneas do que com outros genes de GS da mesma espécie (Kumada, 1993). A

[1] Existe uma discrepância na literatura sobre a sequência de cDNA de GS2 com o número de acesso X66940. Esta sequência foi publicada como sendo de "tabaco" por Becker et al, 1992 e tem cido citada como sendo a sequência de cDNA de GS2 de *Nicotiana tabacum* em vários trabalhos, por exemplo Pérez-Rodríguez e Valpuesta, 1996 e Dubois et al, 1996. Contudo, a consulta da base de dados EMBL através do número de acesso referido indica a referida sequência como pertencendo a *Nicotiana sylvestris* e assim tem sido considerada neste trabalho.

análise cladística de várias sequências de GS revelou que as sequências de GS cloroplastidial formavam um clado separado de todas as outras sequências citosólicas (Doyle, 1991).

Relativamente às sequências citosólicas foi proposto que a conservação interespecífica das sequências seria maior para genes da GS com a mesma função (Temple et al, 1995), por exemplo, os genes da GS1 específicos dos nódulos, em soja (Roche et al, 1993) e *P. vulgaris* (Bennett et al,1989) seriam mais semelhantes entre si do que com outros membros GS1 da mesma planta (Temple et al, 1995).

Contudo, globalmente e dentro dos grupos de genes cloroplastidiais ou citosólicos da GS as relações encontradas são congruentes com a filogenia correntemente aceite para as plantas com flor (Doyle, 1991). Por outro lado, a análise da evolução da GS nas plantas foi considerada útil no estabelecimento da filogenia de dicotiledóneas cuja reconstrução fosse difícil (Pesole et al, 1991). Dentro dos genes cloroplastidiais da GS as gramíneas e as leguminosas formam linhagens separadas de GS (Doyle, 1991). Contudo ainda não foi feita a análise comparativa que incluísse as Solanaceae.

Assim, os resultados obtidos reflectem possivelmente, além da semelhança global inter-específica que se verifica entre as sequências de cDNAs de GS cloroplastidiais, uma relação taxonómica estreita entre as espécies de Solanaceae *S. tuberosum*, *Lycopersicon esculentum* e *Nicotiana sylvestris*, que possivelmente compartilham um antepassado comum para o gene da GS cloroplastidial. É também possível que a região não traduzida do mRNA da GS cloroplastidial desempenhe uma função comum nestas espécies e tenha sido por isso conservada. Uma exepção é a baixa homologia encontrada com o cDNA de GS cloroplastidial de *Nicotiana plumbaginifolia.* Mesmo a nível de sequências de aminoácidos a homologia verificada (76,8 %) é inferior à observada para sequências de aminoácidos de GS citosólicas.

Seria de todo o interesse verificar as relações existentes entre os genes da GS1 destas plantas, particularmente dos que se expressam nos tecidos vasculares nas folhas destas plantas que apresentam um padrão de expressão semelhante, muito restrito a células do floema, como foi verificado neste trabalho por técnicas de imunocitoquímica. Contudo, não existe neste momento relação entre cDNAs de GS1 isolados de Solanceae e a sua expressão em tecidos vasculares, a não ser no trabalho de Dubois et al. (1996) em que foram isolados dois clones de cDNA de GS citosólica de tabaco (*N. tabacum*) e os transcritos correspondentes a um desses clones (Gln1-5) foram detectados em tecidos vasculares de raízes e caules, mas não em folhas.

Outra comparação interessante será entre os genes de GS1 que se expressam durante a senescência em várias plantas como em *Raphanus sativus* (Watanabe et al, 1994) e *Lycopersicon esculentum* (Pérez-Rodríguez e Valpuesta, 1996).

Estratégia para obtenção de clones completos a 5'

A obtenção de clones de cDNA incompletos a 5' é um problema corrente quando se utiliza como iniciador da cadeia de cDNA um poli d(T) durante a reacção com a trasciptase reversa (Sambrook et al, 1989).

Para tentar obter a sequência do completa do cDNA de GS2 de *S. tuberosum*, duas abordagens estão a ser efectuadas:

i) utilização da extremidade 5' do cDNA 14A.1.2 para voltar a rastrear a biblioteca

ii) utilização da técnica 5'RACE ("Rapid amplification of cDNA ends") (Frohman et al, 1988; Fromann, 1995) em que se faz nova extracção de mRNA de folha e a partir deste é sintetizado um novo cDNA, utilizando como iniciador uma sequência específica de GS2 de batateira. O cDNA obtido é modificado por adição de uma sequência homopolimérica (por exemplo um poli(G)) e posteriormente amplificado por PCR com um iniciador a 5' que hibridiza com o poli(G) do cDNA e uma sequência interna, específica de GS2, a 3'.

Estratégia para isolar o cDNA de GS1 de folha

Até agora não foram isoladas sequências de cDNA que se relacionassem com GS1 de folha de *S. tuberosum*. O facto de a isoforma correspondente ser pouco abundante na folha sugere que o respectivo mRNA possa estar representado em baixos níveis.

A estratégia que está a ser utilizada para isolar o cDNA de GS1 expressa nos tecidos vasculares da folha vasculares, passa pela extracção de mRNA de nervuras excisadas e amplificação do cDNA correspondente por 5' e 3' RACE. O segmentos de cDNA obtidos através da técnica RACE podem ser utilizados como sonda para voltar a rastrear a biblioteca e em estudos de expressão, por "Northern blotting" e hibridização *in situ*.

A mesma abordagem está a ser planeada para isolamento de cDNAs de GS de outros órgãos de batateira e eventualmente de culturas de tecidos *in vitro*.

A utilização de RT-PCR (PCR acoplado à transcrição reversa) associado ou não ao RACE tem sido utilizada com sucesso para isolar membros de famílias multigénicas (Watson e Demmer 1995)

Recentemente, dois cDNAs de GS de tomateiro codificando a GS citosólica e cloroplastidial, foram isolados e clonados através de 3' RACE (Pérez-Rodríguez e Valpuesta, 1996) e utilizados como sondas para estudar a expressão diferencial de genes da GS durante a senescência.

Análise do DNA genómico por "Southern blotting"

A sonda de cDNA usada no rastreio, e que corresponde a uma zona bem conservada em várias sequências de cDNA de GS, foi utilizada para análise por "Southern blotting" do DNA genómico e o resultado comparado com a utilização, como sonda, do clone de cDNA isolado 14.A.1.2. Na altura desta análise ainda não era conhecida a sequência do clone, pelo que não se utilizou a zona 3' não codificante como sonda, o que teria permitido verificar o número de bandas que hibridizam especificamente com o cDNA isolado. Contudo clones completos de cDNA de GS cloroplastidial têm sido utilizados como sonda específica na análise de DNA genómico por "Southern blotting" (Becker et al, 1992). O padrão de bandas obtido com as duas sondas é bastante semelhante, mas o cDNA 14.A.1.2. hibridiza mais fortemente com uma

banda *Eco*RI. Uma banda *Eco*RI de tamanho semelhante foi detectada com sonda específica para GS2 (clone completo de cDNA de GS2) em "Southern blots" de DNA genómico de *Nicotiana sylvestris* e *Nicotiana tabacum* (Becker et al, 1992). Uma segunda banda *Eco*RI, mais ténue e de maior peso molecular, visível no "Southern blot" de DNA genómico de batateira aparece igualmente em "Southern blots" de DNA genómico de *Nicotiana sylvestris* e *Nicotiana tabacum* (Becker et al, 1992) e é interpretada por estes autores como uma possível digestão incompleta do DNA. De qualquer modo, o padrão de bandas obtido por hibridização da sonda 14.A.1.2 com o DNA genómico de batateira cortado com *Eco* RI, é muito semelhante ao verificado com DNA genómico de *Nicotiana sylvestris*, cortado com a mesma enzima, o que está de acordo que a elevada homologia observada entre os cDNAs de GS2 das duas plantas e sugere que os respectivos genes possam ter também uma estrutura semelhante.

Em geral, os resultados obtidos sugerem que mais do que um gene codifica a GS em *Solanum tuberosum,* o que está de acordo com os resultados obtidos para outras plantas estudadas, embora seja provável que somente um gene codifique a subunidade cloroplastidial da GS, à semelhança do que foi descrito para outras plantas (Becker et al, 1992; Lightfoot et al, 1988; Peterman e Goodman, 1991; Stanford et al, 1993; Tingey et al, 1987).

Análise da acumulação de transcritos da GS em órgãos de batateira por "Northern blotting" e por técnicas *in situ*

A sonda de cDNA usada no rastreio, e que corresponde a uma zona bem conservada em várias sequências de cDNA de GS, foi utilizada para avaliar a acumulação de transcritos da GS em órgãos de batateira por "Northern blotting" e por técnicas *in situ.*

Análise de transcritos da GS em ógãos de batateira por "Northern blotting"

Por "Northern blotting" detectou-se apenas um transcrito de GS em folha, cujo tamanho (aproximadamente 1,5 kb) sugere que se corresponda ao mRNA que codifica a forma cloroplastidial, mais abundante na folha. Embora tenha sido sobejamente demonstrada neste trabalho a existência de GS citosólica nas folhas de batateira, os respectivos transcritos não foram detectados pois possivelmente a proporção em que se encontravam no RNA total, estava abaixo do limite de detecção. A utilização de mRNA e não RNA total de folha na separação electroforética poderá levar à detecção de transcritos de GS1.

Em tubérculo, apenas um transcrito de menor tamanho (aproximadamente 1,3 kb) foi detectado, possivelmente correspondendo à forma citosólica da GS, detectada neste órgão por várias técnicas anteriormente descritas.

Localização de transcritos da GS em tecidos de tubérculo por "Northern tissue printing"

A localização de transcritos da GS em tecidos de tubérculo por "Northern tissue printing" mostrou-se muito restrita a zonas na periferia do tubérculo, nos gomos dos olhos e em zonas próximas da emergência dos brolhos. Este resultado mostra correlação com os resultados

obtidos na localização da proteína da GS nestas zonas de crescimento activo ("recebedoras") onde ocorre síntese activa de proteínas e utilização dos compostos de transporte mobilizados a partir da reservas (ver discussão sobre a localização de GS em tecidos de tubérculo).

Contudo, é de notar que não se observou marcação, como seria de esperar, em células de floema interno, na região perimedular. Nesta região, e em tubérculos em idêntico estado de desenvolvimento, a proteína da GS estava presente com abundância. Este resultado pode dever-se a duas possíveis situações:

i) a GS localizada nas zonas recebedoras do tubérculo é diferente da GS expressa no floema interno, sendo codificadas por genes diferentes e apresentando a forma expressa no floema interno menor homologia para a sonda utilizada.

ii) dado o elevado grau de abrolhamento dos tubérculos utilizados, é possível que a actividade de transcrição dos genes da GS seja já menor na zona interna do tubérculo, onde contudo, a proteína ainda está presente e possivelmente activa, e seja elevada nas zonas de crescimento activo, nos gomos e junto às zonas de crescimento dos brolhos.

O isolamento dos diferentes cDNAs de GS a partir de RNA de tubérculo em diferentes estados de desenvolvimento e o estudo da expressão dos respectivos mRNAs poderá contribuir para o esclarecimento destas questões.

Localização de transcritos da GS em tecidos vasculares de folha por hibridização *in situ*

Apesar de ter sido demonstrado que promotores de GS citosólica dirigiam a expressão de GUS nos tecidos vasculares de plantas transgénicas, não tinha sido feita a localização de transcritos da GS em células de floema em plantas nativas de modo a relacionar a localização da expressão genética com a localização dos produtos de tradução.

É de notar, que como já foi anteriormente referido, o gene GS3A de ervilheira, cujo promotor dirigia a expressão de GUS no floema de folhas de tabaco transgénico (Edwards et al, 1990), expressa-se essencialmente nas raízes e nódulos da planta nativa e não foi demonstrada a sua expressão no floema nesta planta.

Neste trabalho, foi possível demonstrar a presença de transcritos da GS por meio de hibridização *in situ* a nível de microscopia electrónica, em células de parênquima floémico, possivelmente células de companhia, revelando a actividade de transcrição de genes da GS neste tipo de células. Este resultado confirma e complementa as observações feitas por imunocitoquímica ultraestrutural, que revelaram a presença de níveis elevados de GS1 no citosol de células de companhia do floema de folhas de batateira, contribuindo para esclarecer o papel desempenhado por esta isoforma na utilização de azoto pela planta e contribuindo para caracterizar metabolicamente as células de companhia do floema como locais de síntese de glutamina (ver discussão referente à imunolocalização).

Um estudo muito recente (Dubois et al, 1996) descreve a detecção de transcritos de um gene (Gln1-5) da GS1 de tabaco em tecidos vasculares de *raízes* e *caules* de tabaco, por meio de

hibridização *in situ* a nível de microscopia óptica, mas não detectou expressão deste gene em secções de folhas.

A hibridização *in situ* pode revelar-se uma técnica importante na localização da expressão de genes específicos, particularmente aqueles que se expressam em tipos de células muito restritos e em que a utilização de "Northern blotting" pode subestimar ou mesmo não detectar a acumulação dos respectivos mRNAs (Sukanya et al, 1994).

A utilização de promotores de genes da GS associados ao gene GUS para estudar a expressão de genes em plantas transgénicas, embora se tenha revelado de grande importância, tem recebido críticas, já anteriormente referidas, dado que a expressão do GUS pode não reflectir a expressão normal do gene na planta nativa.

Temple et al (1995) apresentaram os resultados da primeira detecção da expressão de genes específicos da GS por hibridização *in situ* a nível de microscopia óptica, em nódulos radiculares de *Medicago sativa*. Estes autores referem algumas discrepâncias dos resultados obtidos por hibridização *in situ* com estudos de expressão de GUS em nódulos radiculares dirigido por promotores de genes da GS e referem, entre outras causas, uma estabilidade diferente dos mRNAs do GUS e da GS.

A hibridização *in situ* a nível de microscopia electrónica oferecia algumas limitações dado que eram utilizadas sondas marcadas radioactivamente, que ofereciam um baixo nível de resolução (Li e Okita, 1995). Métodos não radioactivos subsequentemente desenvolvidos ofereciam uma sensibilidade baixa, mas o uso de técnicas como a marcação indirecta com biotina, a utilização de digoxigenina e sistemas eficientes de transcrição *in vitro*, permitiram melhorar a sensibilidade e resolução da hibridização *in situ* (Li e Okita, 1995).

As secções ultrafinas possuem uma espessura equivalente a 140-280 bases de comprimento de mRNA e portanto a espessura do corte pode limitar a quantidade do RNA necessária para obter um sinal. É necessário, portanto, para uma hibridização *in situ* eficiente, produzir sondas com elevada actividade específica e utilizar métodos eficientes para detecção do sinal. A utilização de sondas biotiniladas por "nick-translation" tal como foi feito neste trabalho é corrente em hibridização *in situ*, mas oferece algumas limitações: o tamanho é geralmente pequeno (cerca de 250 bases) o que limita a capacidade de detectar a hibridização e, por outro lado, as cadeias complementares da sonda hibridizam entre si mais eficientemente do que com o mRNA imobilizado (Li e Okita, 1995).

Deste modo, será ensaiada a utilização de sondas de RNA, que são actualmente obtidas a partir de vectores de clonagem que possuem promotores de bacteriófagos que permitem a síntese de RNA de cadeia simples *in vitro*. Este processo, associado a técnicas recentes de biotinilação e à utilização de digoxigenina, permitem a obtenção de sondas não radioactivas com elevada actividade específica (Li e Okita, 1995)

Embora a estabilidade dos híbridos de RNA seja maior do que com DNA, a síntese de sondas de DNA de cadeia simples marcadas com digoxigenina por PCR unidireccional é um processo rápido que não requer a inserção do DNA em vectores especializados e permite a

síntese (com incorporação simultânea de digoxigenina) de sondas a partir de cada uma das cadeias (Ghosn et al, 1994). Este processo de obtenção de sondas está a ser ensaiado na obtenção de sondas biotiniladas de cDNA de cadeia simples e poderá ser utilizado igualmente na marcação com digoxigenina.

Abordagens futuras: a detecção de proteínas por marcação de epítopos ("epitoppe tagging")

A hibridização *in situ* para localizar a expressão de genes individuais pode oferecer problemas se as sequências utilizadas como sondas não forem suficientemente específicas. Um método que pode vir a revelar-se com interesse é a marcação de proteínas com uma sequência conhecida de 3-12 aminoácidos, que normalmente não interfere com a função biológica da proteína e para a qual existem anticorpos específicos (Guiltinan e McHenry, 1995).

Esta técnica envolve a adição de um peptídeo marcador por técnicas de DNA recombinante em que a sequência de DNA codificando o peptídeo é fundida com a sequência de DNA codificando a proteína de interesse.

Um epítopo bem caracterizado é uma sequência de 10 aminoácidos derivada do gene humano c-*myc* que é especificamente reconhecida por anticorpos monoclonais disponíveis comercialmente. A expressão de proteínas de fusão com o epítopo c-*myc* foi obtida por transformação de plantas de tabaco via *Agrobacterium* com um vector construído para expressar as proteínas marcadas com o c-*myc*. As proteínas expressas foram detectadas por "immunoblot" e localizadas por "tissue printing" utilizando anticorpos anti-c-*myc* (Guiltinan e McHenry, 1995). Este método mostrou-se de interesse para detectar a expressão de trans-proteínas em plantas transgénicas.

Este método pode vir a revelar-se importante na localização de produtos de genes específicos da GS em tecidos particulares.

Manipulação da expressão de GS

A importância da GS2 na protecção das plantas contra a fotooxidação

Com objectivo de contribuir para a compreensão da regulação e função dos genes da GS e a longo prazo contribuir para uma maior eficiência na utilização de azoto pelas plantas, a manipulação dos níveis de expressão de GS nas plantas tem sido abordada quer através da sobreexpressão, quer através da inibição da expressão através da tecnologia de RNA de sentido contrário (Temple e Segupta-Gopalan, 1997 e referências).

Plantas transgénicas de tabaco que expressavam elevados níveis de GS2 foram obtidas por introdução de um cDNA de GS2 de arroz sob controlo do promotor CaMV 35S (Kozaki e Takeba, 1996). Estas plantas apresentavam uma maior capacidade fotorrespiratória e consequentemente uma maior tolerância a intensidades luminosas particularmente elevadas.

A importância da GS1

Lam et al (1995) induziram a expressão de genes da GS cloroplastidial e citosólica de ervilheira sob controlo do promotor CaMV 35S em tabaco transgénico. Obtiveram linhas em que a expressão da GS1 era aumentada e outras em que se verificava a cossupressão da expressão da GS. As plantas com sobreexpressão de GS1 apresentavam uma expressão ectópica da GS citosólica nas células do mesófilo e uma maior taxa de crescimento quando comparadas com a planta selvagem (Lam et al, 1995).

Por outro lado, a supressão da expressão da GS expressa nos tecidos vasculares obtida por transformação de luzerna com um cDNA de GS de sentido contrário sob controlo de um promotor específico da vasculatura (quitinase ácida) produzia plantas inviáveis, sugerindo que as isoenzimas da GS expressas na vasculatura desempenhavam um papel crucial no metabolismo do azoto (Temple e Sengupta-Gopalan, 1997).

O azoto é limitante no crescimento das plantas e esta limitação parece incidir não na aquisição de nitrato mas sobre a incorporação de azoto em proteínas. É provável que a GS seja um ponto crítico e uma enzima limitante neste processo (Lam et al, 1995). Estudos preliminares sobre a manipulação da expressão de genes da GS e da AS sugerem que é possível aumentar a eficiência na utilização de azoto em culturas de plantas transgénicas pela manipulação de um ou mais genes envolvidos na assimilação de azoto em aminoácidos (Lam et al, 1995).

Apesar de alguns resultados contraditórios obtidos com experiências de manipulação da expressão dos genes da GS em plantas transgénicas (ver Temple e Segupta-Gopalan, 1997 e referências) o isolamento dos cDNAs de GS de *S. tuberosum* permitirá a manipulação da expressão dos respectivos genes em tecidos específicos e assim avaliar o seu papel no metabolismo do azoto e eventualmente a sua possível contribuição para conferir vantagens à planta, nomeadamente em situações fisiológicas específicas (por exemplo abrolhamento, tuberização) ou em situação de "stress" ambiental.

CONCLUSÕES

A primeira evidência obtida neste trabalho é a existência, em folha de batateira, das isoformas cloroplastidial (GS2) e citosólica (GS1) da glutamina sintetase, contrariando a ideia prevalecente na literatura de que a GS1 estaria ausente das folhas verdes de várias plantas, incluindo várias Solanaceae. A existência das duas isoformas da GS em folhas de batateira foi comprovada por várias técnicas, nomeadamente por detecção imunológica dos polipeptídeos da GS separados por SDS-PAGE e por cromatografia de troca iónica, que permitiu separar duas actividades de GS, correspondendo à GS1 e à GS2, permitindo, assim concluir que estas duas isoformas não só estão presentes, mas activas, em folhas de batateira.

A presença da GS1 em folhas verdes de batateira e outras Solanaceae, como tabaco e tomateiro, foi posteriormente comprovada de forma inequívoca por imunocitoquímica ultraestrutural.

Por técnicas de "Western blotting" foi possível caracterizar o padrão de polipeptídeos da GS em vários órgãos e diferentes situações fisiológicas na batateira. Observou-se que a GS1 (citosólica) e a GS2 (cloroplastidial) estão presentes e diferencialmente expressas nos vários órgãos e tecidos da batateira. Assim verificou-se que, em folhas verdes, a GS2 (cloroplastidial) é mais abundante do que a GS1 (citosólica). Contudo, a GS1 predominava em tecidos específicos das folhas como nervuras e pecíolos. O padrão característico de abundância relativa dos polipeptídeos da GS em folhas verdes podia ainda ser invertido em determinadas condições de desenvolvimento e nutrição. A GS1 era a forma predominante em tecido caloso. Em brolhos, tubérculos e raízes só foram detectados polipeptídeos correspondentes à forma citosólica da GS (GS1).

A análise do padrão de polipeptídeos da GS por focagem isoeléctrica sugeria a existência de mais de um polipeptídeo codificando a GS1, mas esta conclusão só pode ser confirmada por análise molecular.

Através de técnicas *in situ* como imunocitoquímica ultraestrutural e imunodetecção de proteínas em impressões de tecido em nitrocelulose ("Tissue printing") foi possível verificar que, nas folhas, a GS2 se localizava nos cloroplastos das células do mesófilo e que a GS1 estava confinada ao floema adaxial. A presença desta isoforma era abundante mas muito restrita a tecidos específicos, o que poderia justificar a razão por que não era detectada por técnicas bioquímicas envolvendo extractos de órgãos totais e era ilustrativo da importância das técnicas *in situ* na avaliação da expressão das diferentes isoformas nos vários órgãos.

Por imunocitoquímica ultraestrutural foi possível localizar a GS em folhas de batateira com elevada resolução e identificar o tipo de células em que ocorria, tendo-se verificado uma especificidade celular na localização da GS cloroplastidial e citosólica: nas células do mesófilo a GS ocorria apenas nos cloroplastos, enquanto que no floema, a GS era abundante no citosol das células de companhia. Este padrão de distribuição era semelhante no tabaco e no

tomateiro. Numa não Solanaceae (girassol) verificou-se um padrão semelhante, ocorrendo a GS2 nos cloroplastos de células do mesófilo e GS1 no citosol de células do parênquima floémico, mas a marcação não era tão concentrada nas células de companhia da nervura central sugerindo que pode haver um padrão de distribuição da GS1 característico das folhas das Solanaceae, muito confinado a células e tecidos específicos.

A localização, com elevada resolução, da proteína da GS nos tecidos da folha de batateira e outras Solanaceae, forneceu evidência determinante para o esclarecimento dos papéis fisiológicos desempenhados pelas formas citosólica e cloroplastidial no metabolismo do azoto e já anteriormente sugeridos por outros autores:

• a demonstração que nas células do mesófilo apenas a forma cloroplastidial era expressa, apoiava as observações feitas com mutantes, de que a GS2 era responsável pela reassimilação do azoto proveniente da fotorrespiração

• a presença da GS1 em células de companhia do floema deu suporte à hipótese de que esta isoforma estaria envolvida na remobilização dos compostos azotados e síntese de glutamina para transporte de azoto para zonas de crescimento da planta e/ou órgãos de reprodução

Estes resultados contribuíram para a caracterização funcional do floema, e particularmente das células de companhia, como local de síntese *in situ* de aminoácidos, nomeadamente da glutamina, e permitiu atribuir ao floema interno, presente em algumas famílias de dicotiledóneas como as Solanaceae, um papel importante na translocação de compostos azotados na planta.

Apesar de estudos moleculares anteriores por outros autores evidenciarem a expressão de GUS, dirigida por um gene de GS citosólica de ervilheira, em tecidos vasculares de tabaco transgénico, ainda não tinha sido evidenciada a expressão de um gene da GS nos tecidos vasculares ou nas células de companhia do floema. Noutra secção deste trabalho, provou-se, por hibridização *in situ* a nível ultraestrutural, a acumulação de mRNA de GS em células de companhia do floema de folha de batateira.

Em tecido caloso de batateira e girassol, a GS localizava-se preferencialmente no citosol e também nos plastídeos das mesmas células. Em tecido caloso de batateira e girassol, uma marcação intensa aparecia no citosol de células que aparentavam ser células de floema em diferenciação, oferecendo perspectivas futuras para o estudo da regulação da expressão desta enzima em função do tipo de célula.

O estudo da distribuição das isoformas da GS em diferentes tipos de células de folhas de batateira durante o reverdecimento de plantas estioladas permitiu concluir que:

• a GS2 estava presente em estioplastos, embora em níveis baixos, e a sua expressão aumentava paralelamente ao desenvolvimento de cloroplastos a partir de estioplastos, em resposta à exposição à luz

• a GS2 estava presente em cloroplastos em diferentes tipos de células, nomeadamente células do parênquima floémico e xilémico e células de guarda dos estomas sugerindo que a regulação da sua expressão possa estar mais relacionada com o tipo de função que desempenha do que com o tipo de célula

Relativamente à GS1, um resultado inesperado foi a constatação de que era muito escassa em células de companhia do floema na nervura central em folhas estioladas; contudo a sua presença neste tipo de células era já marcante após 4 h de exposição à luz. Este resultado é aparentemente contraditório com a ideia corrente na literatura de que os níveis de GS1 seriam superiores em plantas estioladas e não sofriam alteração com a exposição à luz. Assim, este resultado parece apontar para o facto de a GS1 se expressar em diferentes tipos de células em folhas estioladas e em reverdecimento e de pelo menos uma forma da GS1, localizada nas células de companhia do floema, aumentar os seus níveis com a exposição das folhas à luz, acompanhando possivelmente a transição das folhas do estado de "recebedoras" para "exportadoras" de azoto. Dados recolhidos da literatura sugerem que diferentes genes da GS1 apresentam uma expressão diferencial durante o reverdecimento de plantas estioladas e os resultados do presente trabalho sugerem que possam ser expressos em tecidos diferentes. A GS1 foi ainda detectada nas células de guarda dos estomas. Esta observação foi também feita muito recentemente por outros autores em folhas de arroz mas o seu significado não é conhecido.

Parece então que um modelo de expressão da GS citosólica nas folhas poderia estar relacionado com:

- o tipo de planta, podendo estar muito confinada a tecidos muito específicos nas Solanaceae, apresentando um padrão de expressão característico destas plantas (enventualmente este padrão pode reflectir-se na expressão de GUS dirigida por promotores de genes da GS, quando esta expressão é estudada em tabaco transgénico)

- (relacionado com o anterior) com o tipo de estrutura do sistema vascular

- o grau de desenvolvimento da folha, podendo estar mais concentrada na nervura central em folhas maduras, exportadoras de aminoácidos

- via de utilização da glutamina que pode ser utilizada para síntese de compostos proteicos em tecidos "recebedores" ou pode ser destinada a ser translocada a longa distância

-o tipo de compostos utilizados preferencialmente pela planta para transporte de azoto

- a resposta da planta a situações desfavoráveis como patogénese ou diferentes tipos de "stress" abiótico.

Dentro deste modelo, em folhas estioladas ou muito jovens, "recebedoras", a GS1 (ou uma GS1) poderia estar localizada em diferentes tipos de células nomeadamente células do parênquima floémico ou xilémico; em folhas maduras, com fotossíntese activa, a GS2 seria a forma predominante nos tecidos fotossintéticos, onde ocorre a fotorrespiração, estando a GS1 circunscrita a células do floema e envolvida na síntese de compostos azotados para transporte a longa distância.

Ainda neste modelo, a expressão da GS1 em tecidos vasculares deveria ser afectada por situações que envolvessem um aumento das necessidades de remobilização de azoto, nomeadamente senescência ou por outros processos que se traduzissem numa necessidade acrescida de remobilização das reservas azotadas, sua interconversão em formas de transporte e redireccionamento para órgãos em crescimento.

Nesta linha de raciocínio foi verificado o efeito nas isoformas da GS de duas situações que alterariam as necessidades de remobilização de azoto: i) em folhas de plantas sujeitas a carência de azoto fornecido exogenamente e ii) em tubérculos em abrolhamento.

A partir destes estudos foi possível verificar uma alteração no padrão de isoformas da GS1 e GS2 com a idade das folhas e com a carência de azoto. A carência de azoto tinha um efeito diferencial nas duas isoformas da GS. A GS2 era a forma predominante nas folhas mais jovens em plantas controlo e submetidas a carência de azoto, mas este padrão tendia a modificar-se nas folhas mais velhas, invertendo-se mais rapidamente nas folhas mais maduras, sujeitas a carência de azoto. A carência de N afectavam, assim negativamente a GS2 (paralelamente com a RuBisCO, cujos níveis também diminuíam), enquanto os níveis de GS1 pareciam não sofrer alterações ou mesmo aumentar, nestas circunstâncias. Estes dados apoiam fortemente um importante papel fisiológico desta isoforma nesta situação de "stress", estando possivelmente relacionada com a utilização de compostos azotados proveniente do catabolismo proteico nas folhas mais velhas e produção de glutamina para transporte. A localização, neste trabalho, da GS1 no floema das folhas, apoia esta hipótese. Os efeitos observados no presente estudo da carência de N sobre a GS podem estar relacionados com a aceleração da senescência. A capacidade de remobilizar azoto das folhas durante a senescência foliar para os órgãos de reprodução pode ser determinante para a sobrevivência da planta e daí a enorme importância do papel da GS1 na recuperação ("salvage") de compostos azotados provenientes do catabolismo foliar durante a senescência, natural ou acelerada por factores ambientais e de a possibilidade da sua manipulação poder conferir vantagens acrescidas às plantas.

A separação espacial das duas isoformas GS2 e GS1, nas folhas, posta em evidência neste trabalho, correlaciona-se com a degradação sequencial de tecidos durante a senescência foliar, estando a presença da GS1 no floema relacionada com o facto deste tecido manter a sua funcionalidade durante mais tempo durante a senescência.

Os resultados obtidos neste trabalho, apoiam não só o papel da GS1 na normal remobilização de azoto das folhas para outras partes da planta, mas também como tendo possivelmente um papel chave no programa de resposta da planta a situações de "stress" (neste caso a carência de azoto), de activação de "genes relacionados com senescência" entre os quais estão provavelmente incluídos um ou mais genes da GS1.

Durante o abrolhamento em tubérculos, verificou-se que os níveis de GS aumentavam nos estádios iniciais de abrolhamento, provavelmente em resposta à necessidade de mobilização de reservas para o crescimento dos brolhos diminuindo posteriormente durante o desenvolvimento de plantas a que foi fornecida solução nutritiva. Em tubérculos que deram origem a plantas às quais não foi fornecida solução nutritiva, a GS mantinha-se activa por mais tempo e os níveis de polipeptídeos da GS não diminuíam tão rapidamente.

Os resultados apresentados neste trabalho evidenciaram a depleção de proteínas de reserva no tubérculo durante o abrolhamento, e após a plantação, sendo essa depleção mais rápida se não for fornecido azoto durante o desenvolvimento da planta. É também patente o envolvimento da GS1 na utilização das reservas azotadas endógenas do tubérculo nesta fase de desenvolvimento, mas não é claro o modo como estes processos estão relacionados. Contudo, foi possível concluir que a GS1 é expressa em nível elevado e está activa durante o abrolhamento dos tubérculos e que o seu papel está relacionado com a remobilização de azoto existente nas proteínas de reserva. A situação de carência de azoto exógeno tem como consequência um incremento da mobilização das reservas para os locais de crescimento e esse incremento é acompanhado por níveis mais elevados de GS1.

Estes resultados apresentavam uma consonância com os resultados obtidos em folha em que a GS1 responde a necessidades acrescidas de mobilização de azoto para órgãos em crescimento (por exemplo, no abrolhamento), particularmente em situações em que o fornecimento exógeno é limitado. A natureza dos sinais que relacionam a carência de azoto em órgãos em crescimento com um incremento da GS1, não é conhecida e apresenta-se como um ponto de interesse futuro.

A expressão da GS1 num órgão de reserva (o tubérculo) numa situação de abrolhamento em que há remobilização das reservas para a planta em desenvolvimento tem também algum paralelo com o papel proposto para a GS1 na mobilização de reservas e interconversão de aminoácidos durante a germinação de sementes (Roche et al, 1993).

É possível que se trate de um ou mais genes da GS que especificamente se expressem numa situação de abrolhamento.

Assim, os resultados aqui apresentados parecem constituir um padrão consistente com outros resultados da literatura em que a GS1 ou algumas formas da GS1, parecem estar envolvidas no programa de mobilização de reservas em órgãos "fonte". Esses órgãos podem

ser folhas em senescência ou as sementes em germinação ou ainda os tubérculos que fornecem o azoto necessário para o desenvolvimento da planta.

Contudo, a natureza dos sinais que regulam a GS, as vias metabólicas que dão origem à libertação de amónia nos diferentes tecidos e o destino da glutamina sintetizada podem ser diferentes.

Como já tem vindo a ser referido, não tem sido relacionada na literatura a localização da GS1 em órgãos das plantas nas situações referidas anteriormente.

Neste trabalho, a GS foi localizada em tubérculos por imunocitoquímica ultraestrutural e "Tissue printing". Nos tubérculos, a GS localizava-se em diferentes tecidos. A sua presença era particularmente intensa no floema interno de tubérculos em abrolhamento aparecendo ainda na base dos brolhos e em zonas meristemáticas como os "olhos" ou ápices de brolhos. A localização da GS em diferentes tecidos reflecte possivelmente o envolvimento da GS1 (ou diferentes formas da GS1) em diferentes aspectos do metabolismo do azoto, nomeadamente a origem da amónia utilizada pela GS e a posterior utilização da glutamina. A localização no floema interno sugere o envolvimento da GS na mobilização das reservas azotadas para transporte para as zonas de crescimento; nas zonas meristemáticas a GS está possivelmente envolvida na metabolização dos compostos de transporte e na síntese de glutamina para posterior interconversão de aminoácidos utilizados na síntese proteica activa nestas zonas.

Em tubérculos sem sinais externos de abrolhamento, a GS já era detectável em impressões de tecido em nitrocelulose, mas aparecia com uma distribuição muito mais limitada, principalmente confinada a algumas células na zona vascular, não se estendendo por grandes áreas do floema interno, o que apoia as hipóteses anteriores para o papel da GS neste tecido.

Por imunocitoquímica ultraestrutural confirmou-se a presença muito abundante de GS no citosol de células do floema interno de tubérculo a abrolhar mas alguma marcação estava também presente em plastídios.

A detecção de transcritos da GS em impressões de tecido de tubérculo em abrolhamento em nitrocelulose ("Northern tissue printing"), apontou para uma actividade de transcrição mais intensa nas zonas de crescimento, nomeadamente nos "olhos" e junto às bases dos brolhos.

Em microtubérculos *in vitro* a GS foi detectada por "Western blotting" e por imunocitoquímica ultraestrutural, abrindo perspectivas para o estudo da regulação desta enzima neste sistema altamente controlado, em que podem ser manipuladas diferentes variáveis que se pretendam introduzir.

A ideia prevalecente de que, nas plantas superiores, múltiplos genes da GS1 codificariam diferentes formas da GS1 que estariam envolvidas em diferentes aspectos do metabolismo do azoto, em tecidos e órgãos específicos (Sukanya et al, 1994), determinou a necessidade de caracterizar a família de genes que codificam a GS da batateira, e a sua expressão em resposta

a necessidades fisiológicas específicas em diferentes tecidos e órgãos da planta. Foi, assim, construída uma biblioteca de cDNA de folha de batateira, a qual foi rastreada com uma sonda homóloga de cDNA de GS, obtida por PCR, utilizando como iniciadores oligonucleótidos correspondendo a sequências conservadas em cDNAs de GS de várias plantas superiores, obtidas a partir de bancos de dados de DNA.

A partir desta biblioteca foram isolados dois clones de cDNA (λ14.A.1.2 e λJ9A12.2) que foram posteriormente caracterizados. A análise da sequência nucleótidica indicou que ambos os clones correspondem provavelmente ao mesmo mRNA, e a comparação da sequência do cDNA mais longo com sequências contidas em bancos de dados mostrou uma elevada homologia com cDNAs de GS cloroplastidial de várias plantas, particularmente com cDNA codificando a GS2 de *Nicotiana sylvestris* (85,9%). A comparação da sequência de aminoácidos deduzida com outros polipeptídeos da GS permitiu concluir que o cDNA isolado se encontrava incompleto na extremidade 5', correspondendo possivelmente a 71,4 % do clone completo, mas possuía as 4 principais regiões altamente conservadas em todas as subunidades da GS. Além disso possuía as duas cisteínas e uma extensão de 16 aminoácidos na extremidade C-terminal características das subunidades da GS cloroplastidial, o que permitiu concluir que o cDNA isolado codificava uma GS cloroplastidial de batateira, correspondendo ao gene denominado *Gln*2.

A análise de transcritos da GS por "Northern blotting" utilizando como sonda uma região conservada entre várias subunidades da GS permitiu identificar um transcrito de aproximadamente 1,5 kb em folha, provavelmente correspondente ao mRNA de GS2, mais abundante neste órgão, e um transcrito de tamanho inferior em tubérculo, provavelmente correspondendo ao mRNA de uma GS citosólica.

A partir de uma biblioteca de cDNA de tubérculo cedida por outro laboratório, já foram isoladas cDNAs com sequências relacionadas com a GS, que serão caracterizados e permitirão o estudo da expressão diferencial de genes da GS em diferentes órgãos e diferentes situações fisiológicas. À semelhança do que tem sido verificado para outras plantas superiores, é possível que apenas um gene codifique a GS cloroplastidial em batateira (*Gln*2) mas que a GS citosólica seja codificada por diferentes genes. A continuação deste estudo permitirá avaliar onde são expressos e em que circunstâncias.

APÊNDICES

APÊNDICE 1: MEIOS DE CULTURA, ESTIRPES BACTERIANAS E VECTORES

1.1 Meios de cultura utilizados para crescimento de bactérias e de bacteriófagos

Meio LB (composição por litro): 10 g de bactotriptona, 5 g de extracto de levedura, 10 g de NaCl, pH 8, ajustado com NaOH.

Meio LB/amp: meio LB ao qual se adiciona ampicilina para uma concentração final de 50 μg/mL.

Meio LB suplementado: obtem-se por adição ao meio LB, de maltose para concentração final de 0,2% e $MgSO_4$ para concentração final de 10 mM.

Meio sólido L-Agar: é obtido adicionando agar (15 g/litro) ao meio LB.

Meio sólido L-Agar/amp: é obtido por adição de ampicilina para uma concentração final de 50 μg/mL ao meio L-agar depois de arrefecido a 50°C.

Meio sólido L-Agar/amp/IPTG/X-Gal: é obtido por adição, ao L-agar com ampicilina, de IPTG (isopropiltio-β-D-galatosídeo) para uma concentração final de 25 μg/mL e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galatopiranosídeo) para uma concentração final de 25 μg/mL.

Tampão de fago: Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 100mM, $MgSO_4$ 10 mM, gelatina 0,01%.

Top agarose: obtem-se por adição de agarose (7 g/litro) ao meio LB. Após esterilização por autoclave, adiciona-se $MgSO_4$ esterilizado por filtração para concentração final de 10 mM.

Top-agarose suplementada com IPTG e X-Gal: depois de liquefeita e arrefecida a cerca de 50°C, adiciona-se IPTG para uma concentração final de 0,14 mg/mL e X-Gal para uma concentração final de 0,35 mg/mL.

Solução "stock" de IPTG (isopropiltio-β-D-galatosídeo): solução de IPTG a 20 mg/mL em água e esterilizado por filtração.

Solução "stock" de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galatopiranosídeo): solução de X-Gal a 25 mg/mL em DMSO e esterilizada por filtração.

Meio M-9 com tiamina-HCl: Para prepar um litro de meio adiciona-se 6 g de Na_2HPO_4, 3 g de KH_2PO_4, 0,5 g de NaCl, 1 g de NH_4Cl e 15 g de agarose. Adiciona-se água para o volume final de 1 litro e esteriliza-se em autoclave. Depois de arrefecer a 50°C adiciona-se 2 mL de $MgSO_4$ 1 M, 0,1 mL de $CaCl_2$ 1 M, 10 mL de glucose 20% e 1 mL de tiamina-HCL 1M.

Utilização do IPTG

O IPTG é um indutor do operom *lac*. O gene *lac*I codifica um repressor que se liga ao operador, inibindo a transcrição do operador *lac*. Para a transcrição ocorrer, é necessário é necessário impedir a ligação do repressor ao operador. A proteina Lac repressora interactua com o IPTG o que inibe a sua ligação ao operador, permitindo a transcrição dos genes do operon *lac*.

Utilização do X-Gal

O X-Gal é um substrato cromogénico da ß-galactosidase. Após clivagem do X-gal pela ß-galactosidase é produzido um produto de cor azul, o 5-bromo-4-cloro indigo.

1.2 Estirpes de *E. coli* utilizadas

Informações detalhadas sobre as estirpes de *E. coli* mais utilizadas em clonagem podem ser encontradas em Sambrook et al (1989) e na literatura de apoio dos fornecedores.

DH5α (F^- *hsd*R17 (r_k^-,m_k^+), *rel*A1, *sup*E44, *rec*A1, *gyr*A96, *thi*-1, *end*A1 Δ*lac*U169 (Ø80 *lac*ZΔM15). Estirpe deficiente em recA e supressora de mutações âmbar (UAG), é utilizada para a propagação de plasmídios e cosmídeos. A delecção *lac*ZΔM15 (fenótipo Lac^-) corresponde a uma delecção no gene *lac*Z, da região que codifica a extermidade N-terminal da ß-galactosidase permitindo a α-complementação com a extremidade amino da ß-galactosidase codificada por vectores pUC e derivados. Neste trabalho foram utilizadas como hospedeiras para os derivados dos vectores pUC, pBS e pBluescript (Stratagene).

Também podem ser utilizadas com vectores pGEM-Z com selecção visual dos recombinates.

Para identificação dos recombinantes pela cor, é necessário plaquear as células transformadas em placas de L-agar suplementadas com ampicilina, IPTG e X-gal. As colónias recombinantes são brancas e as não recombinantes são azuis.

Os vectores pUC contêm o *lac*I', possuindo apenas parte do gene *lac*I. Deste modo, contêm parte da região regulatória, possuindo o operador e o promotor mas não um repressor funcional. Quando estes vectores são utilizados com a estirpe DH5α não é necessário adicionar IPTG ao meio (Karcher, 1995)

TG2 (r_k^-, r_m^-, Rec^-) (*sup*E, *hsd*Δ5,*thi*, Δ(*lac-pro*AB), Δ(*srl-rec*A)306::Tn*10*(tet^r), F', *traD*36, *proAB*$^+$, *lacI*^{q}, *lac*ZΔM15). Permite a propagação de vectores com mutações âmbar. Não corta nem modifica o DNA inserido. Permite a identificação dos recombinantes pela cor. Como possui a mutação *lacI*^{q}, que leva a uma sobreprodução da proteína repressora do gene *lac*, é necessário adicionar ao meio, além do substrato cromogénico da ß-galactosidase (X-Gal) o indutor do gene lac, IPTG, para identificar os recombinantes pela cor.

JM109 (*end*A1, *rec*A1, *gyr*A96, *thi*, *hsd*R17, (r_k^-,m_k^+), *rel*A1, *sup*E44, Δ(*lac-pro*AB), [F',*tra*D36, *pro*AB, *lac*I^qZΔM15]

Permite a selecção de recombinantes, pela cor, das colónias (as recombinantes são brancas e as não recombinates são azuis) quando transformadas com plasmídios pGEM-Z e pGEM-Zf. Possui o *lacI*^{q}, *lac*ZΔM15 num episoma F'. As estirpes com episoma F' devem ser mantidas em meio mínimo (M9) suplementado com tiamina-HCl, que premite a selecção das células contendo plasmídio. No F' estão presentes genes codificando enzimas envolvidas na síntese de prolina (*pro*AB) e é, assim, necessário para crescimento em estirpes com uma delecção Δ(*lac-pro*AB) em meio mínimo, deste modo garantindo a presença de F' nas células. A mutação Δ(*lac-pro*AB) é obtida por delecção de um segmento do cromossoma que compreende o operon *lac* e genes

próximos como os que codificam as enzimas envolvidas na biosíntese de prolina. Células hospedeiras, contendo este marcador, são incapazes de utilizar a lactose como fonte de carbono e necessitam de prolina no meio, para o crescimento. A presença dos genes *pro*AB no episssoma F' pode complementar a delecção Δ(*lac-pro*AB) e assim somente as células possuindo o episssoma F' crescem em meio sem prolina.

Uma vez que é RecA$^-$ e é deficiente no sistema de restrição *E. coli* K, a restrição do DNA clonado e a sua recombinação com o DNA cromossómico do hospedeiro, são inibidas. A mutação endonuclease A$^-$ permite um maior rendimento e qualidade no isolamento do DNA plasmídico. É adequada para a transformação por vectores pGEM e produção de DNA de cadeia simples a partir de vectores M13 ou faguemídeos.

LE392 (F$^-$, *hsdR*514, (r_K^-,m_K^+), *supE*44, *supF*58, *lac*Y1 ou Δ(*lac*IZY)6, *gal*K2, *gal*T22, *met*B1, *trp*R55

A estirpe LE 392 é fornecida juntamente com o Lambda gt11 *Sfi-Not* (Promega). Não possui o sistema de restrição de *E. coli* K, mas é rec$^+$. Não permite a identificação visual dos fagos recombinantes nem a indução de expressão por IPTG e contem actividade de protease *lon*, não sendo, portanto, adequada ao rastreio de bibliotecas por anticorpos. Permite o crescimento de fagos recombinates e não recombinantes. Contudo, devido à religação dos braços do vector utilizado ser insignificante, a necessidade de selecção dos recombinantes pela cor não é necessária, e por outro lado, permite a obtenção de títulos mais elevados. Deste modo é a estirpe recomendada pelo fornecedor (Promega) para amplificação dos fagos recombinantes e para rastreio por sondas de ácidos nucleicos ("Promega protocols and applications guide", 1991).

Y1090r$^-$ F', Δ*lac*U169, *pro*A$^+$, Δ(lon), *ara*D139, *str*A, *sup*F, [*trp*C22::Tn*10*(tet^r)], [pMC9 Amp^r Tet^r) *hsd*R$^-$ (r_K^-,m_K^+)

É adequada para rastreio de bibliotecas de cDNA em fago lambda gt11 ou lambda gt11 *Sfi-Not*, permitindo o rastreio de placas líticas por sonda de ácidos nucleicos ou por anticorpos.

A estirpe Y1090 (Huynh et al, 1985) foi convertida em restrição menos (r^-,m^+) pela Promega de modo a que os cDNA inseridos no vector não sofressem digestão pelo sistema de restrição endógeno do hospedeiro. Antes disso, a estirpe Y1090 só podia ser utilizada para propagar fagos, nomeadamente para rastreio por anticorpos, depois de os fagos terem sido amplificados numa estirpe r^-, m^+, que fosse deficiente no sistema de restrição mas não no de modificação pelo sistema de restrição/modificação das estirpes K de *E. coli* (Young e Davis, 1983b). Possui características úteis no rastreio de bibliotecas por anticorpos, nomeadamente é deficiente na protease *lon*, permitindo a acumulação de proteínas de fusão com a β-galactosidase a níveis mais elevados. É *sup*F, suprimindo a deficiência dos vectores λgt11, λgt11 *Sfi-Not* e λgt22 em provocar a lise (suprime a mutação âmbar no gene S do fago), conduzindo a uma elevada produção de placas líticas. Contem o plasmídio pMC9 (Amp^r Tet^r) que contem o gene *lac*I que codifica o repressor *lac*. Assim, a expressão de proteínas de fusão pelo cDNA inserido no fago, que poderiam ser inibitórias para o crescimento bacteriano, é reprimida durante as

primeiras fases do crescimento do fago mas pode ser induzida posteriormente por indução por IPTG no caso do rastreio por anticorpos.

A delecção Δ*lac*U169 presente em Y1090 inibe a formação de β-galactosidase endógena funcional (Lac$^-$). Um fago parental (não recombinante) contendo o gene *lac*Z intacto, produz placas fágicas azuis na presença de IPTG e X-Gal. Nos fagos recombinantes, a presença de um cDNA inserido no gene *lac*Z, inibe a produção de β-galactosidase funcional não compensando a mutação do hospedeiro e, deste modo produzindo placas fágicas brancas na presença de IPTG e X-Gal.

Tabela A1.1: Marcadores genéticos característicos das estirpes de *E. coli* usadas

Símbolo	Descrição	Efeito
ara	mutação no metabolismo da arabinose	bloqueia o metabolismo da arabinose
***end*A1**	mutação na endonuclease	melhora a qualidade do isolamento de DNA plasmídico
***gal*K**	mutação da galactocínase	bloqueia o catabolismo da galactose
***gyr*A96**	mutação da DNA girase	confere resistência ao ácido nalidíxico
***hsd*R17**	Mutações que levam à perda	permite a clonagem sem cortar o DNA por endonucleases
***hsd*R4**	da restrição, mas não da	de restrição endógenas tipoI da estirpe K da *E. coli*. O DNA
(r_K^-,m_K^+)	modificação pelo sistema tipo I de restrição/modificação das estirpes K de *E. coli* (restrição menos, modificação positiva)	preparado nesta variedade pode ser usado para transformar estirpes r_K^+ (hsd$^+$) de *E. coli*
***lac*I^q**	mutaçao no *lac*I que conduz à produção em excesso do repressor *lac*	provoca níveis elevados da proteína repressora *lac*, inibindo a transcrição pelo promotor *lac*
***lac*Y1**	mutação na permaese codificada por *lac*Y	bloqueia a utilização da lactose
***lac*ZΔM15**	delecção parcial do gene para a β-D-galactosidase	permite a complementação da actividade da β-galactosidase por α-complementação com a extremidade amino da ß-galactosidase codificada por vectores pUC e derivados e vectores pGEM-Z. Permite seleccionar colónias recombinantes quando plaqueadas em X-gal
***met*B**	mutação na cistationina γ-sintase	necessita de metionina para o crescimento em meio mínimo
***pro*AB**	mutações no metabolismo da prolina	necessita prolina para o crescimento em meio mínimo
Δ(lon)	delecção da protease *lon*	reduz a proteólise das proteínas de fusão expressas
***rec*A1**	mutação na recombinação	inibe a recombinaçào do DNA introduzido com o do hospedeiro, aumentando a estabilidade do DNA clonado
***rel*A**	fenótipo relaxado	permite a síntese de RNA na ausência da síntese proteica
***sup*E, *sup*F**	mutações de supressor	suprime as mutações âmbar (UAG)
***thi*1**	mutação no metabolismo da tiamina	necessita de tiamina para o crescimento em meio mínimo
***tra*D36**	mutação no factor de transferência	previne a transferência do episssoma F'
F$^-$		hospedeiro que não contem o episssoma F'
F'		hospedeiro com o episssoma F' com as características referidas
tet^r		resistência à tetraciclina
Tn*10*	transposão que codifica para a resistência à tetraciclina	resistência à tetraciclina
pMC9	plasmídio derivado do pBR322 que contem o *lac*I^q	

1.3 Vectores utilizados

"Faguemídeos" pBS (+/-) e pBluescript II SK (+/-)

O faguemídeo pBS (+/-) (Stratagene) (Fig. A1.1) é um vector com 3204 bp, derivado do plasmídio pUC19 (Yanisch-Perron et al, 1985). Estes "faguemídeos" foram obtidos por inserção da origem de duplicação do fago filamentoso f1 no plasmídio pBS (Stratagene). Estes vectores são normalmente utilizados como plasmídios para clonagem, dando origem à formação de colónias, quando introduzidos na estirpe adequada de *E. coli*. Contudo, a infecção das células contendo estes vectores com estirpes apropriadas de fagos filamentosos, conduz à produção de partículas fágicas contendo cópias de cadeia simples do genoma do faguemídeo (Sambrook et al, 1989).

O faguemídeo pBluescript II (+/-) (Stratagene) (Fig. A1.2) é um vector com 2,96 kb derivado do pBS (+/-) por substituição do local de clonagem múltipla do pUC19 daquele vector por um local de clonagem múltipla sintético contendo 21 locais de restrição únicos. As séries pBluescript II SK e KS representam duas orientações diferentes do local de clonagem múltipla, no interior da região do gene *lac*Z que codifica a porção N-terminal da β-galactosidase. KS representa a orientação do local de clonagem múltipla de tal modo que a direcção de transcrição do gene *lac*Z é de *Kpn*I para *SacI*. No SK a transcrição ocorre de *Kpn*I para *SacI*.

Este vector permite a selecção visual dos recombinantes desde que utilizado com estirpe hospedeira adequada. Este tipo de vectores expressa o fragmento amino-terminal do produto do gene *lac*Z permitindo a α-complementação quando plaqueados em células contendo a deleção *lac*ZΔM15. Quando não está presente um fragmento de inserção é produzido um α-peptídeo funcional que complementa o produto do gene *lac*ZΔM15 para produzir uma β-galactosidase funcional e as colónias contendo este plasmídio são azuis, quando plaqueadas em meio contendo IPTG e X-Gal. A interrupção do α-peptídeo por inserção de um fragmento no local de clonagem múltipla, inibe a complementação e as colónias contendo plasmídio recombinante são brancas quando plaqueadas em meio contendo IPTG e X-Gal. Possui delecções no gene lacI, que não é funcional.

Este vector contem o gene Amp^r, conferindo resistência à ampicilina às células transformadas. Possui locais de ligação para os oligonucleótidos iniciadores de sequenciação: iniciador M13 (-20), iniciador T7 e iniciador M13 reverso. Permite a expressão de proteínas de fusão com a β-galactosidase e transcrição de RNA *in vitro*. Possui a origem de duplicação do fago filamentoso f1, permitindo a obtenção de DNA de cadeia simples, após infecção por fago adequado.

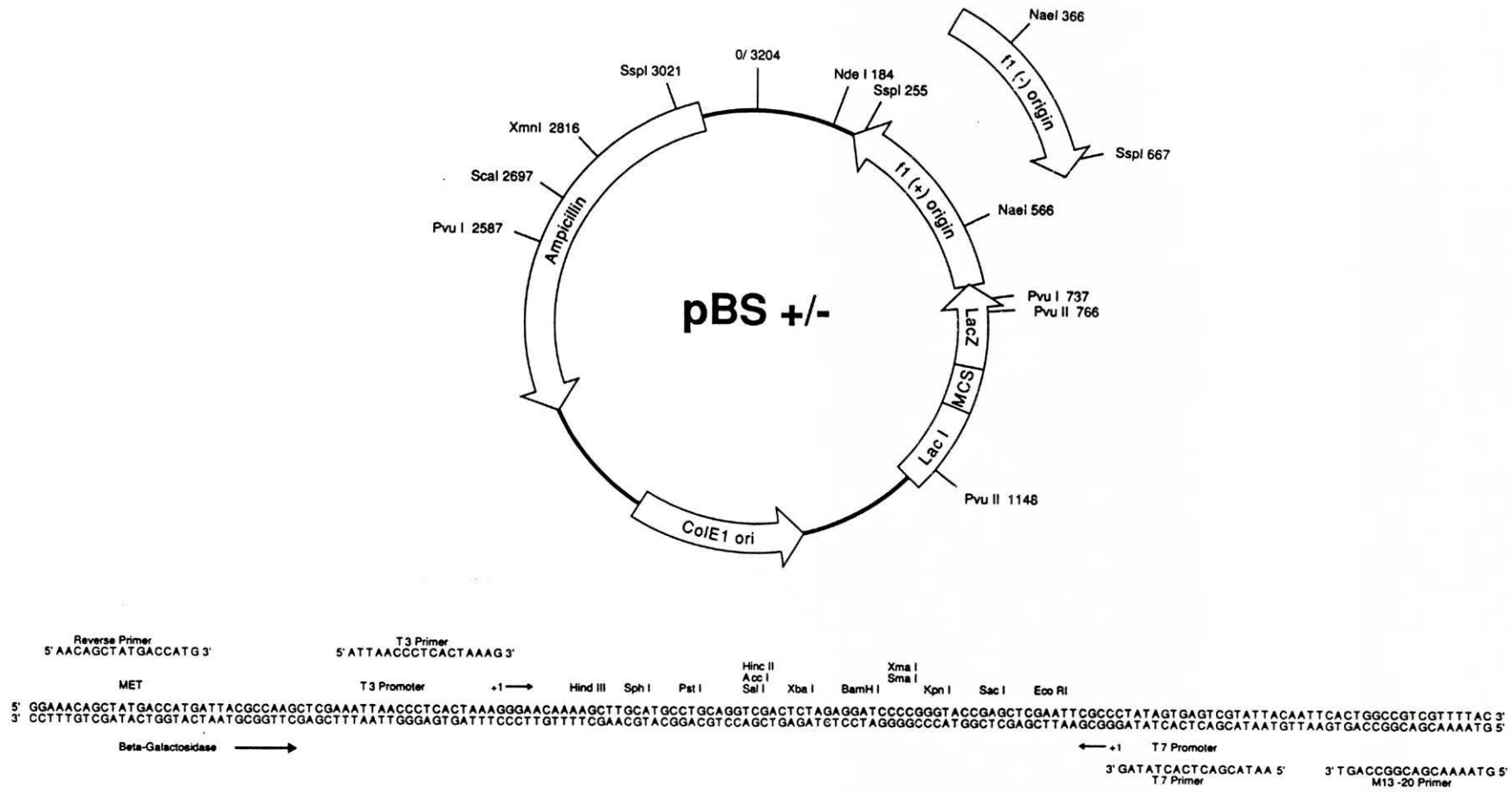


Fig. A1.1. Esquema do faguemídeo pBS (+/-) e da respectiva sequência do local de clonagem múltipla.

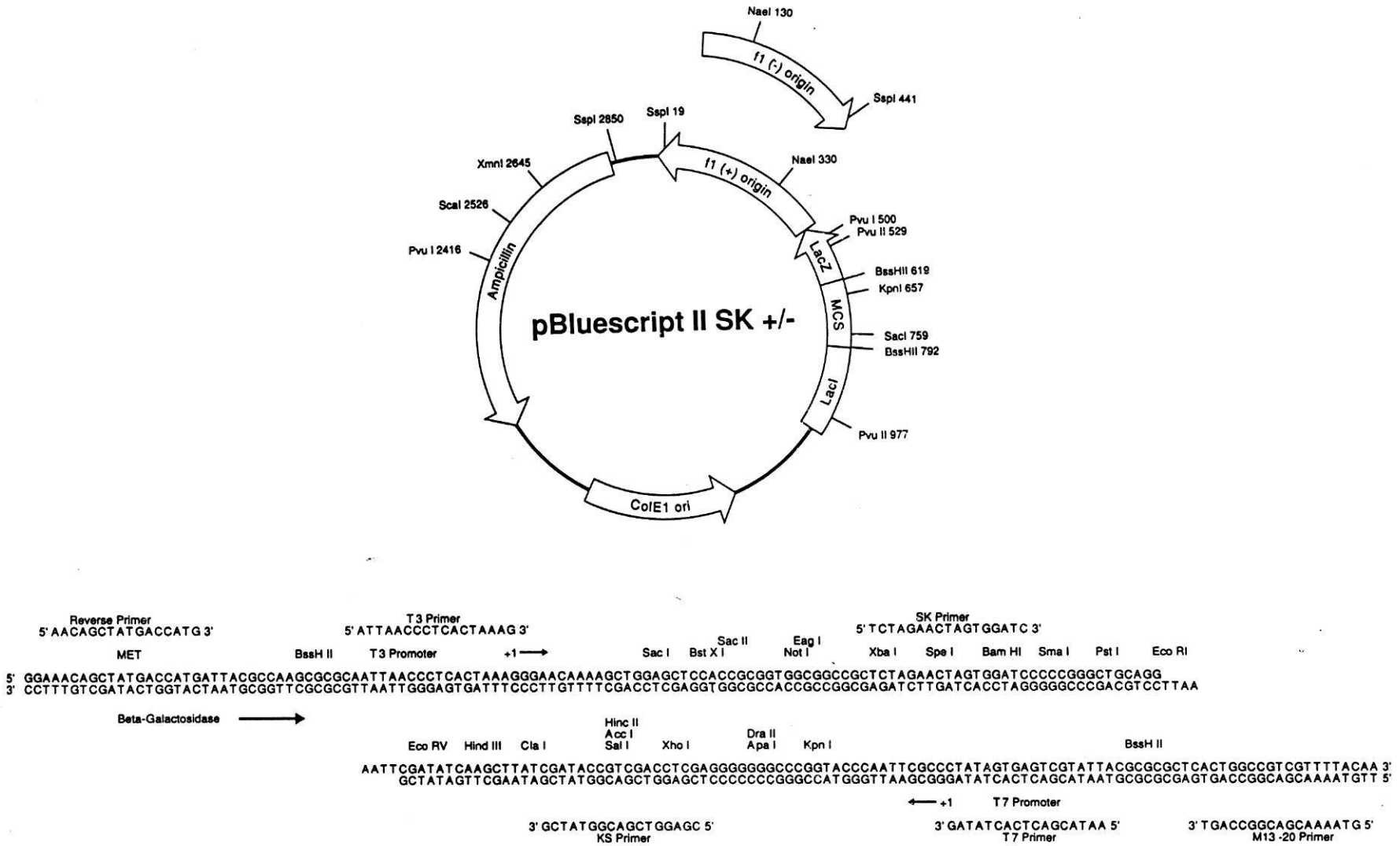


Fig. A1.2. Esquema do faguemídeo pBluescript II SK (+/-) e da respectiva sequência do local de clonagem múltipla.

pGEM®-11Zf(+)

Os vectores pGEM-11Zf(+) e pGEM-11Zf(-) (Promega) (Fig. A1.3), de 3223 bp, permitem a clonagem versátil, a síntese eficiente de RNA *in vitro* e a produção de DNA de cadeia simples circular, uma vez que possuem a origem de duplicação do fago filamentoso f1. Possuem locais de ligação de iniciadores de sequenciação SP6/promotor T7 e iniciadores pUC/M13 universal e reverso. A presença do gene codificando o α-peptídeo do gene *lacZ* permite a selecçao visual dos recombinantes.

Contem vários locais de restrição no local de clonagem múltipla, entre os quais os locais *Not*I e *Sfi*I, o que é conveniente para a subclonagem dos fragmentos isolados a partir do fago lambda gt 11 *Sfi-Not* com as enzimas *Not*I e *Sfi*I, que são duas enzimas com baixa frequência de corte.

Os vectores pGEM (Promega) são fornecidos com DNA modificado (metilado pelo sistema de restrição/modificação do hospedeiro) e podem, portanto, ser usados com estirpes restrição$^+$ ou restrição$^-$ (r_K^-). Contudo devem ser utilizados com células hospedeiras *rec*A1 que possuem uma mutação no sistema de recombinação A, inibindo, assim, recombinações indesejáveis entre o fragmento de inserção e o DNA cromossomal das células hospedeiras, assim como a multimerização da população de plasmídios.

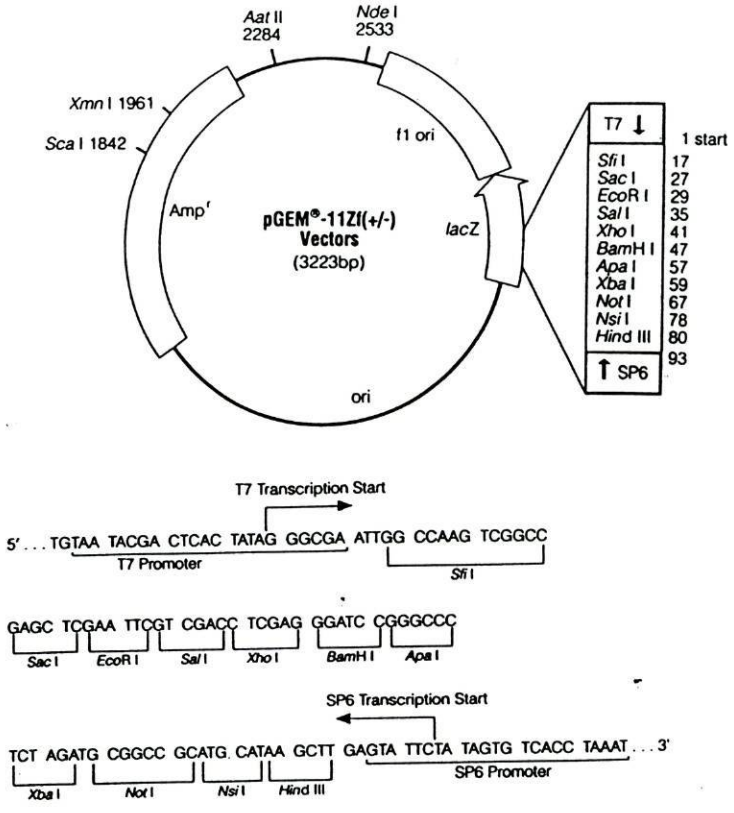


Fig. A1.3. Esquema do vector pGEM-11Zf(+/-) e sequência dos promotores e do local de clonagem múltipla. A sequência evidenciada na figura corresponde ao RNA sintetizado pela T7 RNA polimerasee é complementar ao RNA sintetizado pela SP6 RNA polimerase. A sequência é também complementar ao ssDNA (cadeia simples) produzido pelo pGEM-11Zf(+) e idêntica à produzida pelo pGEM-11Zf(-).

Lambda gt11 *Sfi-Not*

O vector Lambda gt11 *Sfi-Not* (Promega) (Fig. A1.4) é um vector de inserção, permitindo a inserção de fragmentos até 7,2 kb, utilizado para a construção de bibliotecas de cDNA. Permite a inserção orientada do DNA (Fig. A1.5) e a sua expressão na forma de polipeptídeos de fusão com a β-galactosidase desde que inserido na grelha de leitura correcta. Este vector foi obtido por substituição do local EcoRI do fago Lambda gt11 (Young e Davis, 1983a) por um fragmento contendo locais de restrição para as enzimas *Not*I, *Eco*RI e *Sfi*I.

O local de clonagem múltipla está localizado no gene *lac*Z, imediatamente a montante do codão de terminação da tradução da β-galactosidase. A inserção do cDNA interrompe o gene lacZ, e deste modo, os fagos recombinantes produzem placas líticas transparentes quando plaqueados em células *lac*$^-$ na presença de IPTG e X-Gal, enquanto que os não recombinantes produzem placas azuis. A clonagem direccional é efectuada utilizando os braços *Eco*RI-*Not*I do vector e cDNA sintetizado com o iniciador-adaptador–*Not*I e modificado por adição de ligadores ou adaptadores *Eco*RI (Fig. A1.5) O rastreio de bibliotecas de cDNA em Lambda gt11 *Sfi-Not* pode ser feito por anticorpos ou por sonda de ácidos nucleicos.

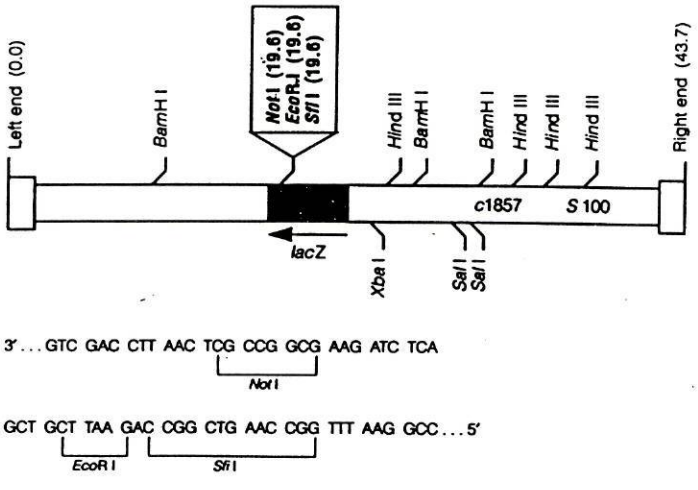


Fig. A1.4. Mapa estrutural do vector Lambda gt11 *Sfi-Not* e localização dos locais de restrição na região de clonagem múltipla.

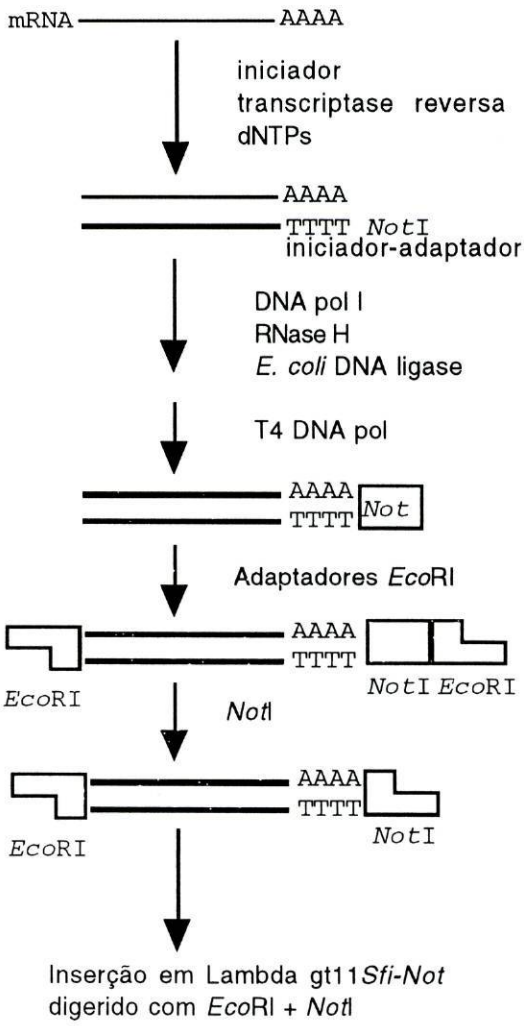


Fig. A1.5. Diagrama ilustrativo da clonagem orientada de cDNA utilizando um iniciador-adaptador–*Not*I e adaptadores *Eco*RI.

APÊNDICE 2: BANCOS DE DADOS DE SEQUÊNCIAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS E PROTEÍNAS. BUSCA DE HOMOLOGIAS. OBTENÇÃO DE INFORMAÇÃO RELATIVA ÀS SEQUÊNCIAS CONTIDAS NOS BANCOS DE DADOS

2.1 Chave das abreviaturas de aminoácidos

A Alanina
C Cisteína
D Ácido aspártico
E Ácido glutâmico
F Fenilalanina
G Glicina
H Histidina
I Isoleucina
K Lisina
L Leucina
M Metionina
N Asparagina
P Prolina
Q Glutamina
R Arginina
S Serina
T Treonina
V Valina
W Triptofano
Y Tirosina

B Ácido aspártico ou Asparagina
Z Ácido glutâmico ou glutamina
X Qualquer aminoácido

2.2 Bancos de dados de sequências de ácidos nucleicos e proteinas

As principais bases de dados de ácidos nucleicos são o GenBank e o EMBL e ainda o DDBJ, cujas moradas são as seguintes:

GenBank Genetic Sequence Data Bank, Los Alamos National Laboratories, Los Alamos, NM 87545, USA.

EMBL Databases, EMBL Nucleotide Sequence Data Library, European Molecular Biology Laboratory; Meierhoffe Strasse 1, Postfach10.2209, D-6900, Heidelberg, Germany.

DDBJ, DNA Databank of Japan, Laboratory of Genetic Information Research, Center for Genetic Information Research, National Institute of Genetics, Misuina, Shizuoda 411, Japan.

Para sequências de proteínas, as principais bases de dados são PIR, SWISS-PROT e PDB:

PIR, Protein Identification Resource, National Biomedical Resarch Foundation, Georgetown University Medical Center, 3900 Reservoir Road N.W., Washington, DC 20007, USA.

Protein Data Bank, Chemistry Department, Brookhaven National Laboratory, Upton, NY 11973, USA.

SWISS-PROT, Protein Sequence Data Bank, Amos Bairoch, Dept. of Medical Biochemistry, University of Geneva, 1 rue Michel Servet, 1211 Geneva 4, Switzerland.

2.3 BLAST

O algorítmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) foi desenvolvido para encontrar alinhamentos óptimos, locais, e sem introdução de espaços, entre pares de sequências (Altschul et al, 1990). A família de programas BLAST usa o algorítmo para comparar uma sequência de aminoácidos ou de nucleótidos fornecida pelo utilizador ("query sequence") com sequências de aminoácidos ou nucleótidos presentes em bases de dados.

A sequência a ser comparada é fornecida via "e-mail" para o endereço

blast@ncbi.nlm.nih.gov

e a mensagem deve seguir o formato especificado nas intruções do programa. Para obter as instruções basta enviar uma mensagem com a linha HELP para o endereço referido.

Em baixo encontra-se um exemplo de formato utilizado para obter a comparação da sequência total do cDNA 14.A.1.2 com sequências presentes em bases de dados.

PROGRAM blastn
DATALIB nr
BEGIN
>14.A.1.2
GTCATTCTATATCCTCA.....

O programa "blastn" indica que se pretende efectuar a comparação com sequências de ácidos nucleicos; para sequências de proteinas utiliza-se o programa "blastp"

O parâmetro "nr" na linha DATALIB significa uma busca não redundante nas bases de dados GenBank, EMBL, DDBJ e PDB. Em alternativa é possível especificar a base de dados em que se pretende efectuar a busca.

O resultado parcial obtido após a comparação está expresso na Fig A2.1:

```
The query sequence for this search has been filtered. Filtering
eliminates low complexity regions that commonly give spuriously high
scores that reflect compositional bias rather than significant
position-by-position alignment. Filtering can eliminate these potentially
confounding matches (e.g., hits against proline-rich regions or poly-A
tails) from the blast reports, leaving regions whose blast statistics
reflect the specificity of their pairwise alignment.

BLASTN 1.4.9MP [26-March-1996] [Build 14:27:07 Apr  1 1996]

Reference:  Altschul, Stephen F., Warren Gish, Webb Miller, Eugene W. Myers,
and David J. Lipman (1990).  Basic local alignment search tool.  J. Mol. Biol.
215:403-10.

Notice:  this program and its default parameter settings are optimized to find
nearly identical sequences rapidly.  To identify weak similarities encoded in
nucleic acid, use BLASTX, TBLASTN or TBLASTX.

Query=  14.A.1.2
```

(1199 letters)

Database: Non-redundant GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences
300,097 sequences; 545,989,181 total letters.
Release date: October 20, 1997

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:		High Score	Smallest Sum Probability P(N)	N
emb|X66940|NSGS2AA	N.sylvestris GS-2 mRNA encoding glut...	3647	0.0	4
gb|U15059|LEU15059	Lycopersicon esculentum chloroplast ...	3338	1.0e-272	1
gb|AF019561|AF019561	Daucus carota clone CGS201 glutamine...	3170	5.1e-259	1
emb|X12738|PVGSCH	French Bean mRNA for plastid-located...	3153	1.4e-257	1
gb|M20664|PEACHGS2A	Pisum sativum glutamine synthetase (...	2973	1.2e-242	1
emb|X05514|PSGSR2	Pea leaf mRNA for glutamine syntheta...	2973	1.5e-242	1
emb|X72751|BNGLUS	B.napus mRNA for plastidic glutamine...	2923	9.9e-238	1
gb|S69727|S69727	light-regulated glutamine synthetase...	2891	8.2e-236	1
emb|Y12458|BNGSL2	Brassica napus mRNA for plastidic gl...	2892	2.9e-234	1
emb|X65931|ZMGS2	Z.mays mRNA gs2 for glutamine syntha...	2781	1.2e-226	1
emb|X14246|OSSIGS31	Oryza sativa shoot GS2 mRNA for chlo...	2707	3.0e-218	1
emb|X16000|HVGLN2	Hordeum vulgare mRNA for glutamine s...	2559	5.9e-206	1
emb|X53580|HVGLN2R	Barley gln mRNA for glutamine synthe...	2559	7.4e-206	1
gb|AF003197|AF003197	Hevea brasiliensis glutamine synthet...	2106	2.8e-166	1
gb|AF019559|AF019559	Daucus carota clone CGS102 cytosolic...	2071	2.5e-163	1
emb|X94299|LJCYTGLSY	L.japonica mRNA for cytosolic glutam...	2034	5.0e-160	1
emb|X95932|NTGLN15GN	N.tabacum mRNA for glutamine synthet...	2023	3.9e-159	1
gb|AF019560|AF019560	Daucus carota clone CGS103 cytosolic...	1993	6.4e-159	1
emb|X94321|VVGS2	V.vinifera mRNA for cytosolic glutam...	2016	1.2e-158	1
gb|U15591|MSU15591	Medicago sativa cytosolic glutamine ...	2016	1.5e-158	1
gb|M94765|VIRGLUSYN	Vigna aconitifolia nodulin-specific ...	2016	1.7e-158	1
emb|Y12459|BNGSR12	Brassica napus mRNA for cytosolic gl...	2002	2.3e-157	1
emb|Y08681|AGGLN1	A.glutinosa mRNA for glutamine synth...	1979	3.2e-157	2
emb|Y10267|MTY10267	M.truncatula mRNA for glutamine synt...	1998	6.2e-157	1
dbj|D25325|RADGS1BB	Raphanus sativus mRNA for glutamine ...	1993	1.9e-156	1
emb|X04002|PVGSR2	Phaseolus vulgaris mRNA (pR-2) for g...	1989	3.1e-156	1
emb|Y10268|MTY10268	M.truncatula mRNA for glutamine synt...	1989	4.1e-156	1
emb|X76736|BNGLUTS	B.napus mRNA for cytosolic glutamine...	1984	9.4e-156	1
emb|X04763|PSGSR1	Pea mRNA for glutamine synthetase (E...	1983	1.1e-155	1
emb|X04001|PVGSR1	Phaseolus vulgaris mRNA (pR-1) for g...	1971	1.4e-154	1
emb|X60092|LSGLUSYN	L.sativa mRNA for glutamine synthetase	1969	1.9e-154	1
emb|X82997|BNGLN	B.napus mRNA for glutamine synthetas...	1966	3.0e-154	1
emb|X94320|VVGS1	V.vinifera mRNA for cytosolic glutam...	1962	7.5e-154	1
gb|S46513|S46513	cytosolic glutamine synthetase [Glyc...	1946	1.9e-152	1
emb|X71361|AOGLNS	A.officinalis mRNA for glutamine syn...	1944	3.7e-152	1
emb|Y12460|BNGSR22	Brassica napus mRNA for cytosolic gl...	1930	2.8e-151	1
gb|M19055|TOBCPGS	N.plumbaginifolia chloroplast glutam...	1906	3.9e-149	1
dbj|D25324|RADGS1AA	Raphanus sativus mRNA for glutamine ...	1894	4.1e-148	1
gb|M20663|PEAGSCY1A	Pisum satiivum glutamine synthetase ...	1890	1.1e-147	1
emb|X14245|OSSIGS28	Oryza sativa shoot GS1 mRNA for cyto...	1867	1.2e-145	1
dbj|D25326|RADGS1GC	Raphanus sativus mRNA for glutamine ...	1858	4.7e-145	1
emb|X95933|NTGLN13GN	N.tabacum mRNA for glutamine synthet...	1850	2.4e-144	1
emb|X69822|PSGLN	P.sylvestris mRNA for glutamine synt...	1813	3.8e-141	1
emb|X74429|PSGSISO	P.sylvestris mRNA for cytoplasmic is...	1804	1.9e-140	1
emb|X14244|OSRIGS8	Oryza sativa root GS1 mRNA for cytos...	1790	1.9e-139	1
emb|X14605|PVGSG1	French bean mRNA for glutamine synth...	1791	2.9e-139	1
dbj|D14578|MZEGS1C	Maize mRNA for glutamine synthetase,...	1788	5.1e-139	1
emb|X69087|HVCGSA	H.vulgare mRNA for cytoplasmic gluta...	1786	7.7e-139	1
gb|AF005223|AF005223	Helianthus annuus chloroplastic glut...	1746	7.4e-138	1
gb|AF005224|AF005224	Helianthus annuus chloroplastic glut...	1738	3.5e-137	1
dbj|D14576|MZEGS1A	Maize mRNA for glutamine synthetase,...	1759	1.4e-136	1
gb|AF005225|AF005225	Helianthus annuus chloroplastic glut...	1729	1.8e-136	1
emb|X65928|ZMGS13	Z.mays mRNA gs1-3 for glutamine synt...	1732	2.3e-134	1
dbj|D14577|MZEGS1B	Maize mRNA for glutamine synthetase,...	1732	2.5e-134	1
dbj|D14579|MZEGS1D	Maize mRNA for glutamine synthetase,...	1717	5.1e-133	1
emb|X65926|ZMGS11	Z.mays mRNA gs1-1 for glutamine synt...	1699	1.6e-131	1
emb|X81700|GMGSGENE	G.max mRNA for glutamine synthetase	1695	3.8e-131	1
emb|X05515|PSGSR3	Pea nodule mRNA for glutamine synthe...	1686	8.8e-131	1
emb|X15578|LAGLUSYN	Lupinus angustifolius mRNA for gluta...	1666	4.0e-129	1

emb|X81460|GMGS34	G.max mRNA for glutamine synthetase	1658	4.2e-128	1
emb|X65930|ZMGS15	Z.mays mRNA gs1-5 for glutamine synt...	1507	5.9e-116	1
emb|X65929|ZMGS14	Z.mays mRNA gs1-4 for glutamine synt...	1505	4.2e-115	1
emb|Y12859|LJGLN1	L.japonicus gln1, pge1 & krm genes	372	2.4e-86	5
gb|U14754|LEU14754	Lycopersicon esculentum glutamine sy...	1144	3.5e-85	1
gb|U28924|PSU28924	Pisum sativum cytosolic glutamine sy...	346	2.1e-83	5
emb|X65927|ZMGS12	Z.mays mRNA gs1-2 for glutamine synt...	1115	2.2e-82	1
gb|U28925|PSU28925	Pisum sativum cytosolic glutamine sy...	355	9.8e-82	5
gb|AF005032|AF005032	Helianthus annuus cytosolic glutamin...	1041	1.1e-76	1
gb|M65157|YSCGLN1	S.cerevisiae glutamine synthetase (G...	987	1.4e-71	1
emb|Z68111|SC3085	S.cerevisiae chromosome XVI PCR prod...	969	5.9e-70	1
emb|Z71255|SCCHRXVI	S.cerevisiae chromosome XVI 165536 b...	969	6.2e-70	1
gb|AF004847|AF004847	Helianthus annuus cytosolic glutamin...	945	2.2e-68	1
emb|X15280|DSGS	Dunaliella salina mRNA for gluatmine...	602	2.5e-66	2
gb|AF005222|AF005222	Helianthus annuus cytosolic glutamin...	896	2.6e-64	1
gb|U04617|SAU04617	Squalus acanthias glutamine syntheta...	653	3.1e-63	3
emb|Z98977|SPAC23H4	S.pombe chromosome I cosmid c23H4	886	5.3e-63	1
gb|AF005031|AF005031	Helianthus annuus cytosolic glutamin...	853	7.7e-61	1
emb|Y12704|ABGLNA	A.bisporus glnA gene	680	1.2e-59	3
gb|L78067|COGGLN	Colletotrichum gloeosporioides gluta...	835	7.9e-59	1
gb|M10159|PHVGS3E	P.vulgaris L. glutamine synthetase (...	824	3.0e-58	1
emb|X03495|CLGSR	Chinese hamster mRNA for glutamine s...	680	5.6e-58	3
gb|L32699|PALGLUSYN	Paracentrotus lividus glutamine synt...	800	3.1e-57	2
gb|S45408|S45408	glutamine synthetase [chickens, live...	770	2.0e-53	1
gb|M29076|CHKGLN	Chicken retinal glutamine synthetase...	770	2.2e-53	1
emb|Z29636|SSGLUSYN	S.scrofa mRNA for glutamine synthetase	734	3.4e-53	3
emb|Y10348|BTGLULPSE	B.taurus GLUL pseudogene, partial	405	4.9e-50	4
emb|Y00387|HSGLUSYN	Human mRNA for glutamine synthetase ...	707	3.4e-48	1
gb|S70290|S70290	glutamine synthetase [human, tumorou...	707	4.0e-48	1
emb|X59834|HSGLUS	Human rearranged mRNA for glutamine ...	707	4.0e-48	1
emb|X07921|RRGS	Rat mRNA for glutamine synthetase (E...	671	7.4e-47	2
gb|M91652|RATGLNAB	Rat glutamine synthetase (glnA) mRNA...	671	7.4e-47	2
gb|U09114|MMU09114	Mus musculus glutamate-ammonia ligas...	662	3.4e-45	2
emb|X16314|MMGSASE	M.musculus mRNA for glutamine synthe...	644	4.0e-43	2
emb|X03931|MSGLNAG	Medicago sativa L. glutamine synthet...	329	2.4e-41	3
gb|M60803|MUSGSA	Mouse intronless glutamine synthetas...	616	9.2e-41	2
emb|X71399|LLNGS1G	L.luteus gene for glutamine synthetase	358	5.3e-38	2
gb|M96798|PNLGTSYN	Panulirus argus glutamine synthetase...	585	6.0e-38	1
gb|K03282|ALFGS	Alfalfa (Medicago sativa) glutamine ...	548	3.2e-37	1
emb|X52759|DMGS2	D.melanogaster GS2 mRNA for glutamin...	431	1.4e-33	2
gb|M29598|RATGLUSG5	Rat glutamine synthetase gene, exon ...	335	2.4e-31	2

```
>emb|X66940|NSGS2AA N.sylvestris GS-2 mRNA encoding glutamine synthetase
           Length = 1590

  Plus Strand HSPs:

 Score = 3647 (1007.7 bits), Expect = 0.0, Sum P(4) = 0.0
 Identities = 809/910 (88%), Positives = 809/910 (88%), Strand = Plus / Plus

Query:     1 GTCATTCTATATCCTCAGGCAATATTCAAAGACCCTTTCCGTGGTGGTAACAACATCTTG 60
             |||||||||| |||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:   454 GTCATTCTATACCCTCAGGCAATATTTAAAGACCCTTTCCGTGGTGGTAACAACATCTTG 513

Query:    61 GTTATCTGTGATACCTACACACCAGCTGGAGAGCCAATTCCTACAAACAAACGCCATAAA 120
             |||||||||||| |||||||||||||||||||||||||  |||||||||||||||||
Sbjct:   514 GTTATCTGTGATGCCTACACACCAGCTGGAGAGCCAATTCCATCAAACAAACGCCATAAA 573

Query:   121 GCTGCTCAAATTTTTAGCGACCCAAAAGTTGCATCTCAAGTTCCATGGTTTGGAATAGAA 180
             |||||||| |||||||||||| ||||||||| |||| |||||||||||| | |||||||
Sbjct:   574 GCTGCTCAGATTTTTAGCGACTCAAAAGTTGTATCTGAAGTTCCATGGTTCGAAATAGAA 633

Query:   181 CAAGAGTACACCTTACTCCAGCCAAATGTTAACTGGCCCTTAGGTTGGCCTGTTGGAGGC 240
             |||||||||||||||||| | |||||| || ||||| ||||||||||||||||||||||
Sbjct:   634 CAAGAGTACACCTTACTCCAACAAAATGTGAAGTGGCCTTTAGGTTGGCCTGTTGGAGGC 693

Query:   241 TATCCTGGCCCACTAGGTTCTTACTACTGTGGTGCTGGAGTGGAAAAGTCATTTGGCCGA 300
             |||||||| | |  ||| |||||||||  ||||||||| ||| ||||||||||||
Sbjct:   694 TATCCTGGTACTCAGGGTCCTTACTACTTGTGTGCTGGAGCGGATAAGTCATTTGGCCTT 753
```

```
Query:   301 GATATATCAGATGCTCACTACAAGGCTTGCCTGTATGCTGGAATTAACATTAGTGGTACT 360
             ||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:   754 GATATATCAGATGCTCACTACAAGGCTTGTCTGTATGCTGGAATTAACATTAGTGGTACT 813

Query:   361 AACGGAGAGGTTATGCCAGGACAGTGGGAATTTCAAGTAGGACCTAGTGTTGGAATTGAA 420
             |||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||| |||||||||||| ||||||
Sbjct:   814 AACGGAGAGGTTATGCCAGGACAGTGGGAATTTCAGGTAGGTCCTAGTGTTGGGATTGAA 873

Query:   421 GGTGGAGATCATATCTGGTGTGCTAGATACCTCCTCGAGAGAATTACTGAACAAGCAGGA 480
             | ||||||||| |||||||| || |||||| |||| |||||||||||| ||||||||||
Sbjct:   874 GCTGGAGATCACATCTGGTGCGCCAGATACATCCTTGAGAGAATTACTGGACAAGCAGGA 933

Query:   481 GTTGTCCTCTCACTCGATCCAAAACCAATTGAGGGTGACTGGAACGGTGCAGGATGCCAC 540
             ||||| |||||||| |||||||||||||||||||| |||||||| ||||| |||||||||
Sbjct:   934 GTTGTTCTCTCACTTGATCCAAAACCAATTGAGGGCGACTGGAATGGTGCCGGATGCCAC 993

Query:   541 ACTAACTACAGNACACTGAGTATTAGAGAAGNNGGAGGCTTTGAAGTGATAAAGAAAGCA 600
             |||||||||| ||||| ||||| |||||||  ||||| |||||||| ||||||||||||
Sbjct:   994 ACTAACTACAGTACACTAAGTATGAGAGAAGATGGAGGATTTGAAGTAATAAAGAAAGCA 1053

Query:   601 ATTCTTAATCTATCCCTGCGCCACAAGGGACATATAAGTGCTTATGGAGAAGGAAATGAG 660
             | ||| ||||| ||||| |||||||||| ||||||| ||| |||||||| ||||
Sbjct:  1054 AATCTGAATCTCTCCCTTCGCCACAAGGAGCATATAAATGCATATGGAGAGGGAATCCTC 1113

Query:   661 AGAAGGTTGACCGGAAAGCATGAAACTGCTAGTATTGACCAATTTTCATGGGGAGTTGCT 720
                | |||||| ||||| |||||||||| || |||||| ||||||||||||||||||
Sbjct:  1114 GAGAAGTTGACTGGAAACCATGAAACTGCAAGCATTGACAAATTTTCATGGGGAGTTGCA 1173

Query:   721 AACCGTGGTTGCTCAATCCGTGTGGGGCGTTACACTGAAAAAGAAGCCAGGGGTTATTTG 780
               |||||||  |||||||||||||||   | ||||||| ||  ||| ||  |||||||||
Sbjct:  1174 TTCCGTGGTGCCTCAATCCGTGTGGGCGCTGACACTGAGAAGCAAGGCAAAGGTTATTTG 1233

Query:   781 GAAGACCGCCGCCCAGCTTCAAACATGGACCCCTATGTTGTGACCGCATTACTTGCCGAA 840
             |||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||| | ||||||||||||||
Sbjct:  1234 GAAGACCGCCGTCCAGCTTCAAACATGGACCCCTATGTTGTGACTGGATTACTTGCCGAA 1293

Query:   841 ACTACTATACTGTGGGAGCCAACCCTTGAGGCTGAAGCTCTTGCTGCCCAAAAGATCTCA 900
             |||||||| |||||||||||||| |||||||||||||||||||| |||||| || ||
Sbjct:  1294 ACTACTATTCTGTGGGAGCCAACCAATGAGGCTGAAGCTCTTGCTGCTCAAAAGCTCGCA 1353

Query:   901 TTGAAGGTTT 910
              ||||||| |
Sbjct:  1354 CTGAAGGTAT 1363

 Score = 124 (34.3 bits), Expect = 0.0, Sum P(4) = 0.0
 Identities = 28/32 (87%), Positives = 28/32 (87%), Strand = Plus / Plus

Query:  1098 TTGGACTACTTTGAACATCTTTACCTTTCTTT 1129
             | | |||||||||||||| |||| ||||||||
Sbjct:  1542 TGGAACTACTTTGAACATATTTATCTTTCTTT 1573

 Score = 114 (31.5 bits), Expect = 0.0, Sum P(4) = 0.0
 Identities = 30/39 (76%), Positives = 30/39 (76%), Strand = Plus / Plus

Query:   971 GAAGCTTGTACCTTGTTGAGATTCCCTTATTTGGGAAAT 1009
             ||| ||||||||||||| |||||   || |  || ||||
Sbjct:  1431 GAAACTTGTACCTTGTTTAGATTGGGTTTTAGGGAAAAT 1469

 Score = 106 (29.3 bits), Expect = 0.0, Sum P(4) = 0.0
 Identities = 42/68 (61%), Positives = 42/68 (61%), Strand = Plus / Plus

Query:  1000 TTTGGGAAATTCTTGTAAAGGAATTCAAAATTTAACCAGTTCATCCTAGAAAGAGGTTCC 1059
             ||| || ||    |   || | |  || |||||| |   |    |    ||||||||||
Sbjct:  1458 TTTAGGGAAAATCTTGTAAAGGAACCACAATTTATCAGTTATTCCTATAAAAGAGGTTCC 1517

Query:  1060 TTAAGACA 1067
             ||||||||
Sbjct:  1518 TTAAGACA 1525
```

```
 Score = 98 (27.1 bits), Expect = 0.0, Sum P(3) = 0.0
 Identities = 22/25 (88%), Positives = 22/25 (88%), Strand = Plus / Plus

Query:   998 TATTTGGGAAATTCTTGTAAAGGAA 1022
             | || |||||| ||||||||||||
Sbjct:  1457 TTTTAGGGAAAATCTTGTAAAGGAA 1481
```

Fig. A2.1. Resultado parcial de uma busca de homologias entre a sequência total cDNA 14.A.1.2 (query) e sequências de ácidos nucleicos contidas em bancos de dados utilizando o programa BLAST, através de correio electrónico.

Os pares de sequências com elevada homologia (HSP, "High-scoring segment pairs ") estão alinhadas na tabela. A primeira coluna representa a base de dados que contem a sequência, a segunda o número de acesso e a terceira o nome que identifica a sequência no banco de dados.

O parâmetro Poisson-P reflecte a probabilidade de a mesma pontuação elevada ser obtida com uma sequência aleatória, que tenha a mesma composição em bases e o mesmo comprimento da sequência introduzida. Um número muito baixo denota semelhanças significativas para o par de sequências que obteve a pontuação.

O parâmetro EXPECT indica o o número de sequências ao acaso que se espera que obtenham uma pontuação igual ou maior do que a obtida. Por defeito é 10 mas podem especificar-se valores menores o que tem como resultado a listagem de sequências com semelhanças mais significativas. Por exemplo, o valor de EXPECT para a sequência NSGS2AA é 0,0 e para a sequência LEU15059 é 1,0e-272. Os valores muito baixos indicam homologias significativas entre o par de sequências consideradas. Valores elevados de EXPECT ou Poisson-P da ordem de 0,001 ou superior não são considerados significativos.

Em baixo encontra-se o resultado parcial obtido por comparação da sequência não codificante a 3' do cDNA 14.A.1.2 com sequências presentes em bases de dados (Fig. A2.2).

```
Query=  14non3
        (267 letters)

Database:  Non-redundant GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences
           303,803 sequences; 554,915,323 total letters.
```

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:		High Score	Smallest Sum Probability P(N)	N
gb|U15059|LEU15059	Lycopersicon esculentum chloroplas...	677	1.0e-48	1
emb|X66940|NSGS2AA	N.sylvestris GS-2 mRNA encoding gl...	124	5.4e-08	3
gb|U43400|HHU43400	Human herpesvirus-7 (HHV7) JI, com...	145	0.061	1
emb|Z75535|CEF14B4	Caenorhabditis elegans cosmid F14B...	130	0.69	1
gb|M17130|ATHH3GA	A.thaliana histone H3 gene, comple...	128	0.80	1
gb|U32380|BSU32380	Bacillus subtilis plasmid pTA1060,...	126	0.92	1
gb|AE000637|HPAE000637	Helicobacter pylori from bases 142...	124	0.98	1
emb|Z80771|HS253J14	Human DNA sequence from PAC 253J14...	113	0.9994	2
emb|Z98755|HS76C18	Human DNA sequence from PAC 76C18 ...	120	0.9997	1
gb|AF003142|CELF57C9	Caenorhabditis elegans cosmid F57C9	119	0.99995	1
emb|Z83232|CEK04B12	Caenorhabditis elegans cosmid K04B...	119	0.99995	1
emb|Z49128|CEM03C11	Caenorhabditis elegans cosmid M03C...	119	0.99995	1
emb|Z66568|SPAC12G12	S.pombe chromosome I cosmid c12G12.	108	0.99995	2

```
>gb|U15059|LEU15059 Lycopersicon esculentum chloroplast glutamine synthetase
          (gs) mRNA, partial cds.
          Length = 824

  Plus Strand HSPs:

 Score = 677 (187.1 bits), Expect = 1.0e-48, P = 1.0e-48
 Identities = 185/247 (74%), Positives = 185/247 (74%), Strand = Plus / Plus

Query:     1 AGTAATTGAGGGGAAATGTTTTCATCATAATCCTTCTTAGAATTTATGAGATAAGTGTGA 60
             ||||  ||||||||||  |||    |  |  | ||||||||||||||||||||||
Sbjct:   578 AGTATATGAGGGGAAATTGTTTTCATAATAATCCTCTTAGAATTTATGAGATAAGTTCTG 637

Query:    61 AGCTTGTACCTTGTTGAGATTCCCTTATTTGGGAAATTCTTGTAAAGGAATTCAAAATTT 120
             |   |    | |  |    || || |  || || ||    |   || | |  ||||||||
Sbjct:   638 AAGCTTGTACCTTGTTGAGTTTCCCTTATTTGGGAAAATCTTGTAAAGGAACCAAAATTT 697

Query:   121 AACCAGTTCATCCTAGAAAGAGGTTCCTTAAGACATGAGACTACTTTGGAGTTGAGGTGT 180
             | |   |    |    ||| ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:   698 ACCAGTTCATCCTAGAAAATAGGTTTCTTAAGACATGAGACTACTTTGGAGTTGAGGTGT 757

Query:   181 AATTGTTGGACTACTTTGAACATCTTTACCTTTCTTTTCTCCAGATGAATCCATTTCTCT 240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:   758 AATTGTTGGACTACTTTGAACATCTTTACCTTTCTTTTCTCCAGATGAATCCATTTCTCT 817

Query:   241 GAAATTC 247
             |||||||
Sbjct:   818 GAAATTC 824


>emb|X66940|NSGS2AA N.sylvestris GS-2 mRNA encoding glutamine synthetase
          Length = 1590

  Plus Strand HSPs:

 Score = 124 (34.3 bits), Expect = 5.4e-08, Sum P(3) = 5.4e-08
 Identities = 28/32 (87%), Positives = 28/32 (87%), Strand = Plus / Plus

Query:   186 TTGGACTACTTTGAACATCTTTACCTTTCTTT 217
             | | ||||||||||||||| |||| ||||||||
Sbjct:  1542 TGGAACTACTTTGAACATATTTATCTTTCTTT 1573

 Score = 114 (31.5 bits), Expect = 5.4e-08, Sum P(3) = 5.4e-08
 Identities = 30/39 (76%), Positives = 30/39 (76%), Strand = Plus / Plus

Query:    59 GAAGCTTGTACCTTGTTGAGATTCCCTTATTTGGGAAAT 97
             ||| ||||||||||||| |||||   || |  || ||||
Sbjct:  1431 GAAACTTGTACCTTGTTTAGATTGGGTTTTAGGGAAAAT 1469

 Score = 106 (29.3 bits), Expect = 5.4e-08, Sum P(3) = 5.4e-08
 Identities = 42/68 (61%), Positives = 42/68 (61%), Strand = Plus / Plus

Query:    88 TTTGGGAAATTCTTGTAAAGGAATTCAAAATTTAACCAGTTCATCCTAGAAAGAGGTTCC 147
             ||| || ||    |   || | |  || |||||| |   |    |    ||||||||||
Sbjct:  1458 TTTAGGGAAAATCTTGTAAAGGAACCACAATTTATCAGTTATTCCTATAAAAGAGGTTCC 1517

Query:   148 TTAAGACA 155
             ||||||||
Sbjct:  1518 TTAAGACA 1525

 Score = 98 (27.1 bits), Expect = 0.0091, Sum P(2) = 0.0090
 Identities = 22/25 (88%), Positives = 22/25 (88%), Strand = Plus / Plus

Query:    86 TATTTGGGAAATTCTTGTAAAGGAA 110
             | || |||||| ||||||||||||
Sbjct:  1457 TTTTAGGGAAAATCTTGTAAAGGAA 1481
```

Fig. A2.2 Resultado parcial da busca de homologias entre a sequência não codificante a 3' do cDNA 14.A.1.2 e sequências contidas em bases de dados, através do programa BLAST.

2.4 Obtenção de sequências contidas nos bancos de dados e outras informações através de ENTREZ

O número de acesso obtido para as sequências que apresentam semelhanças com a sequência introduzida permite obter, por correio electrónico, e utilizando o programa ENTREZ, a sequência completa assim como outros dados como o autor, referência bibliográfica, etc. e ainda o número de entrada na base de dados biblográfica MEDLINE, através do qual é possível obter o resumo da publicação, se existente. Para isso é necessário mandar uma mensagem para o endereço:

query@ncbi.nlm.nih.gov

A mensagem deve ser formatada de acordo com as instruções, que podem ser obtidas enviando a mensagem HELP para o endereço fornecido.

Para obter informações sobre a sequência NSGS2AA, cujo número de acesso é X66940, enviou-se a seguinte mensagem:

DB n
UID X66940

O resultado obtido foi o seguinte (Fig. A2.3):

```
To Obtain Help Documentation:  send e-mail to 'query@ncbi.nlm.nih.gov'
        with the word 'help' in the body of the mail message.

   This is ENTREZ-Query server, that use daily updatable Entrez service

*****************************************************************************

Requested WWW query:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-
post/Entrez/query?db=n&form=6&uid=X66940+&dopt=g&html=no

Content-type: text/html

Entrez Reports
---------------
LOCUS       NSGS2AA      1590 bp    RNA             PLN       08-DEC-1992
DEFINITION  N.sylvestris GS-2 mRNA encoding glutamine synthetase.
ACCESSION   X66940
NID         g19744
KEYWORDS    glutamate-ammonia ligase; glutamine synthetase.
SOURCE      wood tobacco.
  ORGANISM  Nicotiana sylvestris
            Eukaryotae; mitochondrial eukaryotes; Viridiplantae;
            Charophyta/Embryophyta group; Embryophyta; Magnoliophyta;
            Magnoliopsida; Solananae; Solanales; Solanaceae; Nicotiana.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1590)
  AUTHORS   Becker,T.W., Caboche,M., Carrayol,E. and Hirel,B.
  TITLE     Nucleotide sequence of a tobacco cDNA encoding plastidic glutamine
            synthetase and light inducibility, organ specificity and diurnal
            rhythmicity in the expression of the corresponding genes of tobacco
            and tomato
  JOURNAL   Plant Mol. Biol. 19 (3), 367-379 (1992)
  MEDLINE   92322968
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1590
                     /organism="Nicotiana sylvestris"
                     /db_xref="taxon:4096"
```

```
                     /tissue_type="leaf"
     gene            67..1462
                     /gene="GS-2"
     CDS             67..1462
                     /gene="GS-2"
                     /EC_number="6.3.1.2"
                     /note="glutamine synthetase"
                     /product="glutamate--ammonia ligase"
BASE COUNT      479 a    306 c    368 g    437 t
ORIGIN
        1 ttcatattct ctctcttcaa catatttttc cagcatagca ttaccaagtt agttggttag
       61 gtgaagatgg ctcagatctt ggctccatca ggagaatggc agatgagaat gacaaagagc
      121 tcaacagatg ctaatccctt gacttcaaag atgtggagtt ctgtggtgtt gaagataata
      181 aaagaacttg ctgttaaaag ctctgccaaa tttagattct ttgctctgga atctgatagt
      241 ggcactgtga accagagtga acagctgcta aacttggacg taactccata cactgacaag
      301 atcattgctg aatatatttg gatcggagga tcaggaattg acatgcgcag taaatcaagg
      361 actatttcaa agccagtcaa gcatgcttct gagctcccaa agtggaacta cgatggatca
      421 agtactggac aagcacctgg agaagacagt gaagtcattc tataccctca ggcaatattt
      481 aaagaccctt tccgtggtgg taacaacatc ttggttatct gtgatgccta cacaccagct
      541 ggagagccaa ttccatcaaa caaacgccat aaagctgctc agatttttag cgactcaaaa
      601 gttgtatctg aagttccatg gttcgaaata gaacaagagt acaccttact ccaacaaaat
      661 gtgaagtggc ctttaggttg gcctgttgga ggctatcctg gtactcaggg tccttactac
      721 ttgtgtgctg gagcggataa gtcatttggc cttgatatat cagatgctca ctacaaggct
      781 tgtctgtatg ctggaattaa cattagtggt actaacggag aggttatgcc aggacagtgg
      841 gaatttcagg taggtcctag tgttgggatt gaagctggag atcacatctg gtgcgccaga
      901 tacatccttg agagaattac tggacaagca ggagttgttc tctcacttga tccaaaacca
      961 attgagggcg actggaatgg tgccggatgc cacactaact acagtacact aagtatgaga
     1021 gaagatggag gatttgaagt aataaagaaa gcaaatctga atctctccct tcgccacaag
     1081 gagcatataa atgcatatgg agagggaatc ctcgagaagt tgactggaaa ccatgaaact
     1141 gcaagcattg acaaattttc atggggagtt gcattccgtg gtgcctcaat ccgtgtgggc
     1201 gctgacactg agaagcaagg caaaggttat ttggaagacc gccgtccagc ttcaaacatg
     1261 gacccctatg ttgtgactgg attacttgcc gaaactacta ttctgtggga gccaaccaat
     1321 gaggctgaag ctcttgctgc tcaaaagctc gcactgaagg tatgatgttt taattattta
     1381 agggcagatt gatccataat cttcttagag ttcatgatct gctaagtgaa gaaacttgta
     1441 ccttgtttag attgggtttt agggaaaatc ttgtaaagga accacaattt atcagttatt
     1501 cctataaaag aggttcctta agacaatgag actgtaattg ttggaactac tttgaacata
     1561 tttatctttc tttctccaga tgaaaaaaaa
//
```

Fig. A2.3. Obtenção da sequência NSGS2AA e informações adicionais, através do programa ENTREZ, via correio electrónico.

2.5 O algorítmo FASTA

O algorítmo FASTA (Pearson e Lipman, 1988), é utilizado para pesquisar homologias com sequências de nucleótidos e aminoácidos presentes em bancos de dados.

Resumidamente, o algoritmo FASTA numa primeira comparação com as sequências das bases de dados, encontra semelhanças locais, com elevada homologia, sem inclusão de espaços, as chamadas "regiões iniciais" e calcula uma pontuação para os segmentos encontrados. Para cada sequência encontrada são calculados os primeiros dez melhores valores. De cada sequência, a região inicial com maior pontuação é expressa na coluna ***Init1***.

Seguidamente, FASTA tenta a ligação das "regiões iniciais" de cada sequência, com as pontuações mais elevadas, para formar um alinhamento aproximado, com inclusão de espaços. O programa calcula então a pontuação obtida para a "semalhança inicial", ***Initn***, por adição de cada pontuação ***Init1*** e subtracção de uma penalidade (geralmente o valor 20) por cada ligação que for efectudada.

A ligação só é efectuada se o valor de ***Initn*** para a nova região fôr superior ao valor mais elevado de ***Init1***, caso contrário não se verifica a ligação.

Na tabela de resultados as sequências estão alinhadas por ordem da pontuação obtida para ***Initn***.

Finalmente, é obtido o alinhamento óptimo, com introdução de espaços, entre a sequência de interesse e cada sequência da bases de dados, sendo a pontuação deste alinhamento expressa na coluna ***Opt***.

2.6 Sequências de GS obtidas pelo programa FASTA, por comparação com a sequência 14.A.1.2

A seguir, encontra-se a listagem das primeiras 58 sequências, por ordem decrescente, obtidas pelo programa FASTA, na pesquisa de homologias com a sequência 14.A.1.2. O resultado apresentado é obtido pelo programa CATALOG do PC-GENE, que permite listar o conteúdo das bases de dados. O registo de cada sequência contem um conjunto de dados de várias categorias que inclui descrições, explicações e classificações em inglês, e que estão contidas em diferentes linhas. Cada linha tem o seu formato próprio e é identificada por um código de duas letras. Na listagem seguinte apenas a linha ID (identificação), AC (número de acesso), DE (descrição), KW (palavras-chave) e OS (organismo) estão descritas para cada sequência. Na linha ID estão representados o nome da sequência, o tipo de dados, o tipo de molécula (DNA, RNA ou proteína) a divisão dentro do EMBL (neste caso PLN, correspondendo a plantas) e o tamanho da sequência.

```
***********
* CATALOG *
***********

Catalog for data base: CDEM46IN.
Total number of entries in this data base is:  46216.
This catalog list all sequences indicated in library file: FASTTODA.

                    ---------------------------------------

ID   NSGS2AA     STANDARD; RNA; PLN; 1590 BP.
AC   X66940;
DE   N.SYLVESTRIS GS-2 MRNA ENCODING GLUTAMINE SYNTHETASE
KW   GLUTAMATE-AMMONIA LIGASE; GLUTAMINE SYNTHETASE.
OS   NICOTIANA SYLVESTRIS (TOBACCO)

ID   PVGSCH      STANDARD; RNA; PLN; 1510 BP.
AC   X12738;
DE   FRENCH BEAN MRNA FOR PLASTID-LOCATED GLUTAMINE SYNTHETASE (EC
DE   6.3.1.2)
KW   GLUTAMATE-AMMONIA LIGASE.
OS   PHASEOLUS VULGARIS (FRENCH BEAN)

ID   PSCHGS2A    STANDARD; RNA; PLN; 1540 BP.
AC   M20664; J03878;
DE   PISUM SATIVUM GLUTAMINE SYNTHETASE (CHLOROPLAST GS2) MRNA, COMPLETE
DE   CDS.
KW   GLUTAMINE SYNTHETASE (CHLOROPLAST GS2).
OS   PISUM SATIVUM (PEA)

ID   PSGSR2      STANDARD; RNA; PLN; 1304 BP.
AC   X05514;
DE   PEA LEAF MRNA FOR GLUTAMINE SYNTHETASE (EC 6.3.1.2)
KW   GLUTAMATE-AMMONIA LIGASE; SYNTHASE; SYNTHETASE.
OS   PISUM SATIVUM (PEA)
```

```
ID   BNGLUS      STANDARD; RNA; PLN; 1575 BP.
AC   X72751;
DE   B.NAPUS MRNA FOR GLUTAMINE SYNTHETASE
KW   GLUTAMINE SYNTHETASE.
OS   BRASSICA NAPUS

ID   S69727      BACKBONE; RNA; PLN; 1548 BP.
AC   S69727;
DE   LIGHT-REGULATED GLUTAMINE SYNTHETASE ISOENZYME [ARABIDOPSIS
DE   THALIANA, MRNA, 1548 NT]
OS   ARABIDOPSIS THALIANA

ID   ZMGS2       STANDARD; RNA; PLN; 1483 BP.
AC   X65931;
DE   Z.MAYS MRNA GS2 FOR GLUTAMINE SYNTHATASE
KW   GLUTAMINE SYNTHETASE.
OS   ZEA MAYS (MAIZE)

ID   OSSIGS31    STANDARD; RNA; PLN; 1649 BP.
AC   X14246;
DE   ORYZA SATIVA SHOOT GS2 MRNA FOR CHLOROPLASTIC GLUTAMINE SYNTHETASE
DE   (EC 6.3.1.2) (CLONE LAMBDA-GS31)
KW   GLUTAMATE-AMMONIA LIGASE.
OS   ORYZA SATIVA (RICE)

ID   HVGLN2      STANDARD; RNA; PLN; 1549 BP.
AC   X16000;
DE   HORDEUM VULGARE MRNA FOR GLUTAMINE SYNTHETASE PRECURSOR (EC
DE   6.3.1.2)
KW   GLUTAMATE-AMMONIA LIGASE.
OS   HORDEUM VULGARE (BARLEY)

ID   HVGLN2R     STANDARD; RNA; PLN; 1600 BP.
AC   X53580;
DE   BARLEY GLN MRNA FOR GLUTAMINE SYNTHETASE 2 (EC 6.3.1.2)
KW   GLUTAMATE-AMMONIA LIGASE.
OS   HORDEUM VULGARE (BARLEY)

ID   LSGLUSYN    STANDARD; RNA; PLN; 1429 BP.
AC   X60092;
DE   L.SATIVA MRNA FOR GLUTAMINE SYNTHETASE
KW   AMMONIA ASSIMILATION; GLUTAMATE-AMMONIA LIGASE;
KW   PHYTOCHROME-MEDIATED GENE; SEED GERMINATION.
OS   LACTUCA SATIVA

ID   BNGLN       STANDARD; RNA; PLN; 1354 BP.
AC   X82997;
DE   B.NAPUS MRNA FOR GLUTAMINE SYNTHETASE
KW   GLN GENE; GLUTAMATE--AMMONIA LIGASE; GLUTAMINE SYNTHETASE.
OS   BRASSICA NAPUS

ID   BNGLUTS     STANDARD; RNA; PLN; 1400 BP.
AC   X76736;
DE   B.NAPUS MRNA FOR GLUTAMINE SYNTHETASE
KW   GLUTAMINE SYNTHETASE.
OS   BRASSICA NAPUS

ID   VVGS1       STANDARD; RNA; PLN; 1416 BP.
AC   X94320;
DE   V.VINIFERA MRNA FOR CYTOSOLIC GLUTAMINE SYNTHETASE (CLONE PGS1;1)
KW   GLUTAMINE SYNTHETASE; GS GENE.
OS   VITIS VINIFERA

ID   S46513      BACKBONE; RNA; PLN; 1450 BP.
AC   S46513;
DE   CYTOSOLIC GLUTAMINE SYNTHETASE [GLYCINE MAX=SOYBEANS, VAR PRIZE,
DE   MRNA, 1450 NT]
OS   GLYCINE MAX (SOYBEAN)
```

```
ID   VAGLUSYN   STANDARD; RNA; PLN; 1407 BP.
AC   M94765;
DE   VIGNA ACONITIFOLIA NODULIN-SPECIFIC GLUTAMINE SYNTHETASE MRNA,
OS   VIGNA ACONITIFOLIA

ID   RSGS1AA    STANDARD; RNA; PLN; 1355 BP.
AC   D25324;
DE   RAPHANUS SATIVUS MRNA FOR GLUTAMINE SYNTHETASE.
KW   GLUTAMINE SYNTHETASE.
OS   RAPHANUS SATIVUS

ID   RSGS1BB    STANDARD; RNA; PLN; 1493 BP.
AC   D25325;
DE   RAPHANUS SATIVUS MRNA FOR GLUTAMINE SYNTHETASE.
KW   GLUTAMINE SYNTHETASE.
OS   RAPHANUS SATIVUS

ID   PVGSR1     STANDARD; RNA; PLN; 1454 BP.
AC   X04001;
DE   PHASEOLUS VULGARIS MRNA (PR-1) FOR GLUTAMINE SYNTHETASE (GS, EC
DE   6.3.1.2)
KW   GLUTAMATE-AMMONIA LIGASE; SYNTHETASE.
OS   PHASEOLUS VULGARIS (FRENCH BEAN)

ID   MS15591    STANDARD; RNA; PLN; 1372 BP.
AC   U15591;
DE   MEDICAGO SATIVA CYTOSOLIC GLUTAMINE SYNTHETASE (GS1) MRNA, COMPLETE
DE   CDS.
OS   MEDICAGO SATIVA

ID   NPGS       STANDARD; RNA; PLN; 1340 BP.
AC   M19055;
DE   N.PLUMBAGINIFOLIA CHLOROPLAST GLUTAMINE SYNTHETASE GENE, COMPLETE
DE   CDS.
KW   GLUTAMINE SYNTHETASE.
OS   NICOTIANA PLUMBAGINIFOLIA (TOBACCO)

ID   PVGSR2     STANDARD; RNA; PLN; 1353 BP.
AC   X04002;
DE   PHASEOLUS VULGARIS MRNA (PR-2) FOR GLUTAMINE SYNTHETASE (GS,EC
DE   6.3.1.2)
KW   GLUTAMATE-AMMONIA LIGASE; SYNTHETASE.
OS   PHASEOLUS VULGARIS (FRENCH BEAN)

ID   PSGLN      STANDARD; RNA; PLN; 1423 BP.
AC   X69822;
DE   P.SYLVESTRIS MRNA FOR GLUTAMINE SYNTHETASE
KW   GLN GENE; GLUTAMATE-AMMONIA LIGASE; GLUTAMINE SYNTHETASE.
OS   PINUS SYLVESTRIS

ID   PSGSR1     STANDARD; RNA; PLN; 1373 BP.
AC   X04763;
DE   PEA MRNA FOR GLUTAMINE SYNTHETASE (EC 6.3.1.2) (CLONE PGS341)
KW   GLUTAMATE-AMMONIA LIGASE; SYNTHASE; SYNTHETASE.
OS   PISUM SATIVUM (PEA)

ID   PSGSISO    STANDARD; RNA; PLN; 1332 BP.
AC   X74429;
DE   P.SYLVESTRIS MRNA FOR CYTOPLASMIC ISOFORM OF GLUTAMINE SYNTHASE
KW   CYTOPLASMIC PROTEIN; GLUTAMATE-AMMONIA LIGASE;
KW   GLUTAMINE SYNTHETASE; ISOFORM.
OS   PINUS SYLVESTRIS

ID   RSGS1C     STANDARD; RNA; PLN; 1337 BP.
AC   D25326;
DE   RAPHANUS SATIVUS MRNA FOR GLUTAMINE SYNTHETASE.
KW   GLUTAMINE SYNTHETASE.
OS   RAPHANUS SATIVUS
```

```
ID   PSGSCY1A   STANDARD; RNA; PLN; 1434 BP.
AC   M20663; J03878;
DE   PISUM SATIIVUM GLUTAMINE SYNTHETASE (CYTOSOLIC GS1) MRNA, COMPLETE
DE   CDS.
KW   GLUTAMINE SYNTHETASE (CYTOSOLIC GS1).
OS   PISUM SATIVUM (PEA)

ID   ZMGS3      STANDARD; RNA; PLN; 1433 BP.
AC   D14578;
DE   MAIZE MRNA FOR GLUTAMINE SYNTHETASE, COMPLETE CDS.
KW   CYTOSOLIC ISOFORM; GLUTAMINE SYNTHETASE.
OS   ZEA MAYS (MAIZE)

ID   OSRIGS8    STANDARD; RNA; PLN; 1169 BP.
AC   X14244;
DE   ORYZA SATIVA ROOT GS1 MRNA FOR CYTOSOLIC GLUTAMINE SYNTHETASE (EC
DE   6.3.1.2) (CLONE LAMBDA-GS8)
KW   GLUTAMATE-AMMONIA LIGASE.
OS   ORYZA SATIVA (RICE)

ID   HVCGSA     STANDARD; RNA; PLN; 1456 BP.
AC   X69087;
DE   H.VULGARE MRNA FOR CYTOPLASMIC GLUTAMINE SYNTHETASE
KW   GLUTAMINE SYNTHETASE.
OS   HORDEUM VULGARE (BARLEY)

ID   PVGSG1     STANDARD; RNA; PLN; 1448 BP.
AC   X14605;
DE   FRENCH BEAN MRNA FOR GLUTAMINE SYNTHETASE GAMMA-SUBUNIT (EC
DE   6.3.1.2)
KW   GLUTAMATE-AMMONIA LIGASE.
OS   PHASEOLUS VULGARIS (FRENCH BEAN)

ID   ZMGS4      STANDARD; RNA; PLN; 1416 BP.
AC   D14579;
DE   MAIZE MRNA FOR GLUTAMINE SYNTHETASE, COMPLETE CDS.
KW   CYTOSOLIC ISOFORM; GLUTAMINE SYNTHETASE.
OS   ZEA MAYS (MAIZE)

ID   ZMGS11     STANDARD; RNA; PLN; 1359 BP.
AC   X65926;
DE   Z.MAYS MRNA GS1-1 FOR GLUTAMINE SYNTHETASE
KW   GLUTAMINE SYNTHETASE.
OS   ZEA MAYS (MAIZE)

ID   PSGSR3     STANDARD; RNA; PLN; 1065 BP.
AC   X05515;
DE   PEA NODULE MRNA FOR GLUTAMINE SYNTHETASE (EC 6.3.1.2)
KW   GLUTAMATE-AMMONIA LIGASE; SYNTHASE; SYNTHETASE.
OS   PISUM SATIVUM (PEA)

ID   LAGLUSYN   STANDARD; RNA; PLN; 1043 BP.
AC   X15578;
DE   LUPINUS ANGUSTIFOLIUS MRNA FOR GLUTAMINE SYNTHETASE (EC 6.3.1.2)
DE   (PARTIAL)
KW   GLUTAMATE-AMMONIA LIGASE.
OS   LUPINUS ANGUSTIFOLIUS

ID   VVGS2      STANDARD; RNA; PLN; 1305 BP.
AC   X94321;
DE   V.VINIFERA MRNA FOR CYTOSOLIC GLUTAMINE SYNTHETASE (CLONE PGS1;2)
KW   GLUTAMINE SYNTHETASE; GS GENE.
OS   VITIS VINIFERA

ID   ZMGS1      STANDARD; RNA; PLN; 1422 BP.
AC   D14576;
DE   MAIZE MRNA FOR GLUTAMINE SYNTHETASE, COMPLETE CDS.
KW   CYTOSOLIC ISOFORM; GLUTAMINE SYNTHETASE.
OS   ZEA MAYS (MAIZE)
```

```
ID   ZMGS13      STANDARD; RNA; PLN; 1317 BP.
AC   X65928;
DE   Z.MAYS MRNA GS1-3 FOR GLUTAMINE SYNTHETASE
KW   GLUTAMINE SYNTHETASE.
OS   ZEA MAYS (MAIZE)

ID   ZMGS21      STANDARD; RNA; PLN; 1350 BP.
AC   D14577;
DE   MAIZE MRNA FOR GLUTAMINE SYNTHETASE, COMPLETE CDS.
KW   CYTOSOLIC ISOFORM; GLUTAMINE SYNTHETASE.
OS   ZEA MAYS (MAIZE)

ID   ZMGS15      STANDARD; RNA; PLN; 895 BP.
AC   X65930;
DE   Z.MAYS MRNA GS1-5 FOR GLUTAMINE SYNTHATASE
KW   GLUTAMINE SYNTHETASE.
OS   ZEA MAYS (MAIZE)

ID   ZMGS14      STANDARD; RNA; PLN; 1490 BP.
AC   X65929;
DE   Z.MAYS MRNA GS1-4 FOR GLUTAMINE SYNTHETASE
KW   GLUTAMINE SYNTHETASE.
OS   ZEA MAYS (MAIZE)

ID   OSSIGS28    STANDARD; RNA; PLN; 1553 BP.
AC   X14245;
DE   ORYZA SATIVA SHOOT GS1 MRNA FOR CYTOSOLIC GLUTAMINE SYNTHETASE (EC
DE   6.3.1.2) (CLONE LAMBDA-GS28)
KW   GLUTAMATE-AMMONIA LIGASE.
OS   ORYZA SATIVA (RICE)

ID   GMGS34      STANDARD; RNA; PLN; 1310 BP.
AC   X81460;
DE   G.MAX MRNA FOR GLUTAMINE SYNTHETASE
KW   GLUTAMINE SYNTHETASE; GS GENE.
OS   GLYCINE MAX (SOYBEAN)

ID   GMGSGENE    STANDARD; RNA; PLN; 1433 BP.
AC   X81700;
DE   G.MAX MRNA FOR GLUTAMINE SYNTHETASE
KW   GLUTAMATE-AMMONIA LIGASE; GLUTAMINE SYNTHETASE; GS GENE.
OS   GLYCINE MAX (SOYBEAN)

ID   PS28924     STANDARD; DNA; PLN; 5769 BP.
AC   U28924;
DE   PISUM SATIVUM CYTOSOLIC GLUTAMINE SYNTHETASE (GS3A) GENE, COMPLETE
DE   CDS.
OS   PISUM SATIVUM (PEA)

ID   PS28925     STANDARD; DNA; PLN; 4876 BP.
AC   U28925;
DE   PISUM SATIVUM CYTOSOLIC GLUTAMINE SYNTHETASE (GS3B) GENE, COMPLETE
DE   CDS.
OS   PISUM SATIVUM (PEA)

ID   LE14754     STANDARD; RNA; PLN; 804 BP.
AC   U14754;
DE   LYCOPERSICON ESCULENTUM GLUTAMINE SYNTHETASE MRNA, PARTIAL CDS.
OS   LYCOPERSICON ESCULENTUM

ID   LLNGS1G     STANDARD; DNA; PLN; 5913 BP.
AC   X71399;
DE   L.LUTEUS GENE FOR GLUTAMINE SYNTHETASE
KW   GLUTAMINE SYNTHETASE.
OS   LUPINUS LUTEUS
```

```
ID   MSGLNAG     STANDARD; DNA; PLN; 4464 BP.
AC   X03931;
DE   MEDICAGO SATIVA L. GLUTAMINE SYNTHETASE GENE
KW   GLUTAMATE-AMMONIA LIGASE.
OS   MEDICAGO SATIVA

ID   ZMGS12      STANDARD; RNA; PLN; 1369 BP.
AC   X65927;
DE   Z.MAYS MRNA GS1-2 FOR GLUTAMINE SYNTHETASE
KW   GLUTAMINE SYNTHETASE.
OS   ZEA MAYS (MAIZE)

ID   PVGS3E      STANDARD; RNA; PLN; 712 BP.
AC   M10159;
DE   P.VULGARIS L. GLUTAMINE SYNTHETASE (GS) MRNA, 3' END.
KW   GLUTAMATE-AMMONIA LIGASE.
OS   PHASEOLUS VULGARIS (FRENCH BEAN)

ID   GMGLUSYN    STANDARD; RNA; PLN; 656 BP.
AC   L20248;
DE   GLYCINE MAX GLUTAMINE SYNTHETASE (GSGME) MRNA, 3' END.
KW   GLUTAMINE SYNTHETASE.
OS   GLYCINE MAX (SOYBEAN)

ID   DSGS        STANDARD; RNA; PLN; 1301 BP.
AC   X15280;
DE   DUNALIELLA SALINA MRNA FOR GLUATMINE SYNTHETASE
KW   GLUTAMATE-AMMONIA LIGASE.
OS   DUNALIELLA SALINA

ID   MSGS        STANDARD; RNA; PLN; 276 BP.
AC   K03282;
DE   ALFALFA (MEDICAGO SATIVA) GLUTAMINE SYNTHETASE MRNA.
KW   GLUTAMATE-AMMONIA LIGASE.
OS   MEDICAGO SATIVA

ID   PVGLND3     STANDARD; DNA; PLN; 984 BP.
AC   X61292;
DE   P.VULGARIS GLN-DELTA GENE FOR PLASTID-LOCATED GLUTAMINE SYNTHETASE
DE   (TERMINATOR REGION)
KW   GLN-DELTA GENE; GLUTAMINE SYNTHETASE.
OS   PHASEOLUS VULGARIS (FRENCH BEAN)

ID   S71526      BACKBONE; DNA; PLN; 306 BP.
AC   S71526;
DE   GS (MTGSA)=GLUTAMINE SYNTHETASE (3' REGION, LAST EXON) [MEDICAGO
DE   TRUNCATULA, CV JEMALONG, SEEDS, GENOMIC, 306 NT].
OS   MEDICAGO TRUNCATULA

ID   S71527      BACKBONE; DNA; PLN; 306 BP.
AC   S71527;
DE   GS (MTGSB)=GLUTAMINE SYNTHETASE (3' REGION, LAST EXON) [MEDICAGO
DE   TRUNCATULA, CV JEMALONG, SEEDS, GENOMIC, 306 NT].
OS   MEDICAGO TRUNCATULA

ID   GMGS3       STANDARD; RNA; PLN; 361 BP.
AC   X68598;
DE   G.MAX CDNA FOR GLUTAMINE SYNTHETASE (3' REGION)
KW   GLUTAMATE-AMMONIA LIGASE; GLUTAMINE SYNTHETASE.
OS   GLYCINE MAX (SOYBEAN)
```

BIBLIOGRAFIA

Ahmed CMS, Sagar GR. 1981. Patterns of distribution of assimilates in tubers of *Solanum tuberosum* L. with time. Potato Res 24: 187-190.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215: 403-410.

Amaral JD. 1955. A Conservação da Batata. Livraria Sá da Costa, Lisboa.

Amersham, Immunogold detection from Amersham International. Amersham, UK.

Azcon-Bieto J, Talon M. 1993. Fisiologia y Bioquimica Vegetal. Interamericana-MacGraw Hill, Madrid.

Barratt DHP. 1980. Method for the detection of glutamine synthetase activity on starch gels. Plant Sci Lett 18: 249-255.

Basic Techniques and Exercises in Electrophoresis. 1988/89. Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, California.

Bauer D, Biehler K, Fock H, Carrayol E, Hirel B, Migge A, Becker TW. 1997. A role for cytosolic glutamine synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during water stress in tomato. Physiol Plant 99: 241-248.

Becker TW, Caboche M, Carrayol E, Hirel B. 1992. Nucleotide sequence of a tobacco cDNA encoding plastidic glutamine synthetase and light inducibility, organ specificity and diurnal rhythmicity in the expression of the corresponding genes of tobacco and tomato. Plant Mol Biol 19: 367-379.

Becker W, Apel K. 1993. Differences in gene expression between natural and artificially induced leaf senescence. Planta 189: 74-79.

Beebe DU, Turgeon R. 1992. Localization of galactinol, raffinose and stachyose synthesis in *Cucurbita pepo* leaves. Planta 188: 354-361.

Benhamou N, Asselin A. 1993. *In situ* immunocytochemical localization of plant proteins. In Glick BR, Thompson JE, eds, Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, pp 225-241. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Bennet MJ, Cullimore JV. 1989. Glutamine synthetase isoenzymes of *Phaseolus vulgaris* L.: subunit composition in developing root nodules and plumules. Planta 179: 433-440.

Bennet MJ, Lightfoot DA, Cullimore JV. 1989. cDNA sequences and differential expression of the gene encoding the glutamine synthetase γ polypeptide of *Phaseolus vulgaris* L. Plant Mol Biol 12: 553-565.

Berger MG, Woo WC, Wong SC, Fock HP. 1985. Nitrogen metabolism in senescing flag leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.) in the light. Plant physiol 78:779-783.

Biemond H, Vos J. 1992. Effects of nitrogen on the development and growth ofthe potato plant. 2. The partitioning of dry matter, nitrogen and nitrate. Ann Bot 70: 37-45.

Botella JR, Cánovas FM, Avila C, de Castro IN, Valpuesta V. 1986. Immunochemical comparison of glutamine synthetase from some Solanaceae Plants. Plant Physiol 82: 585-587.

Botella JR, Verbelen JP, Valpuesta V. 1988. Immunocytolocalization of glutamine synthetase in green leaves and cotyledons of *Lycopersicon esculentum*. Plant Physiol 88: 943-946.

Bould C, Hewitt EJ, Needham P. 1983. Diagnosis of mineral disorders in plants, vol 2. JBD Robinson, ed, MAFF/ARC, London.

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254.

Brangeon J, Hirel B, Forchioni A. 1989. Immunogold localization of glutamine synthetase in soybean leaves, roots, and nodules. Protoplasma 151: 88-97.

Brears T, Coruzzi GM. 1991. The molecular biology of amino acid biosynthesis in plants. Genetic Engineering 13: 221-236.

Brears T, Walker E, Coruzzi GM. 1991. A promoter sequence involved in cell-specific expression of the pea glutamine synthetase *GS3A* gene in organs of transgenic tobacco and alfalfa. Plant J 1: 235-244.

Buchanan-Wollaston V, Ainsworth C. 1997. Leaf senescence in *Brassica napus*: cloning of senescence related genes by subtractive hybridization. Plant Mol Biol 33: 821-834.

Burton WG. 1989. The Potato, 3rd edition. Longman Scientific & Technical, Harlow, UK.

Cabello P, de la Haba P, Maldonado JM. 1991. Isoforms of glutamine synthetase in cotyledons, leaves and roots of sunflower plants. J Plant Physiol 137: 378-380.

Cassab GI, Varner JE. 1987. Immunocytolocalization of extensin in developing soybean seed coats by immunogold-silver staining and by tissue printing on nitrocellulose paper. J Cell Biol 105: 2581-2588.

Church GM, Gilbert W. 1984. Genomic sequencing. Proc Natl Acad Sci USA 81: 1991-1995.

Clarkson DT, Touraine B. 1994. Morphological responses of plants to nitrate-deprivation: a role for abscisic acid?. In Roy J, Garnier E, eds, A Whole Plant Perspective on Carbon-Nitrogen Interactions pp 187-196. SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands.

Cock JM, Brock IW, Watson AT, Swarup R, Morby AP, Cullimore JV. 1991. Regulation of glutamine synthetase genes in leaves of *Phaseolus vulgaris*. Plant Mol Biol 17: 671-771.

Cock JM, Hemon P, Cullimore JV. 1992. Characterization of the gene encoding the plastid-located glutamine synthetase of *Phaseolus vulgaris*: regulation of ß-glucuronidase gene fusions in transgenic tobacco. Plant Mol Biol 18: 1141-1149.

Cock JM, Mould RM, Bennet MJ, Cullimore JV. 1990. Expression of glutamine synthetase genes in roots and nodules of *Phaseolus vulgaris* following changes in the ammonium supply and infection with various *Rhizobium* mutants. Plant Mol Biol 14: 549-560.

Cohen SN, Chang ACY, Hsu L. 1972. Noncromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc Natl Acad Sci USA 69: 2110.

Comission on Plant Gene Nomenclature. 1994. Plant Mol Biol Rep 12(2) Supplement.

Cordovilla MP, Ligero F, Lluch C. 1994. Effect of salinity on N fixation and assimilation in *Vicia faba*. J Exp Bot 45: 1483-1488.

Cordovilla MP, Ligero F, Lluch C. 1996. Growth and nitrogen assimilation in nodules in response to nitrate levels in *Vicia faba* under salt stress. J Exp Bot 47: 203-210.

Coruzzi GM. 1991. Molecular approaches to the study of amino acid biosynthesis in plants. Plant Sci 74:145-155.

Crawford NM. 1995. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. Plant Cell 7: 859-868.

Cullimore JV, Bennett MJ. 1988. The molecular biology and biochemistry of plant glutamine synthetase from root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. and other legumes. J Plant Physiol 132: 387-393.

Cullimore JV, Gebhardt C, Saarelainen R, Miflin BJ, Idler KB, Barker RF. 1984. Glutamine synthetase of *Phaseolus vulgaris* L.: organ-specific expression of a multigene family. J Mol Appl Genet 2: 589-599.

Cullimore JV, Lara M, Lea PJ, Miflin BJ. 1983. Purification and properties of two forms of glutamine synthetase from the plant fraction of *Phaseolus* root nodules. Planta 157: 245-253.

Cullimore JV, Miflin BJ. 1984. Immunological studies on glutamine synthetase using antisera raised to the two plant forms of the enzyme from *Phaseolus* root nodules. J Exp Bot 35: 581-587.

Cutter, EC. 1992. Structure and development of the potato plant. In Harris PM, ed, The Potato Crop - The Scientific Basis for Improvement, 2nd ed, pp 64-161. Chapman & Hall, London.

Datta DB, Cai X, Wong PP, Triplett EW. 1991. Immunocytochemical localization of glutamine synthetase in organs of *Phaseolus vulgaris* L. Plant Physiol 96: 507-512.

Desborough SL. 1985. Potato proteins. In Li PH, ed, Potato Physiology, pp 330-351. Academic Press, London.

Donn G, Tischer E, Smith JA, Goodman HM. 1984. Herbicide-resistant alfalfa cells: an example of gene amplification in plants. J. Mol Appl Genet 2: 621-635.

Dorfman DM. 1993. Amplification of bacteriophage library inserts using polymerase chain reaction. Meth Enzymol 218: 336-340.

Doyle JF, Doyle JL. 1991. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus (BRL), 12: 13-15.

Doyle JJ. 1991. Evolution of higher-plant glutamine synthetase genes: tissue specificity as a criterion for predicting orthology. Mol Biol Evol 8: 366-377.

Duball S, Wild A. 1988. investigation of the nitrogen metabolism of spruce needles in the relation to the occurence of novel florest decline. J Plant Physiol 132: 491-498.

Dubois F, Brugière N, Sangwan RS, Hirel B. 1996. Localization of tobacco ctosolic glutamine synthetase enzymes and the corresponding transcripts shows organ- and cell-specific patterns of protein synthesis and gene expression. Plant Mol Biol 31: 803-817.

Ducreux G, Rossignol L, Rossignol M ,1986. La pomme de terre. La Recherche 17: 193-203.

Dunn K, Dickstein R, Feinbaum R, Burnett BK, Peterman TK, Thoidis G, Goodman HM, Ausubel FM. 1988. Developmental regulation of nodule-specific genes in alfalfa root nodules. Mol Plant-Microbe Interact 1: 66-74.

Edwards JW, Coruzzi GM. 1989. Photorespiration and light act in concert to regulate the expression of the nuclear gene for chloroplast glutamine synthetase. Plant Cell 1: 241-248.

Edwards JW, Coruzzi GM. 1990. Cell-specific gene expression in plants. Annu Rev Genet 24: 275-303.

Edwards JW, Walker EL, Coruzzi GM. 1990. Cell-specific expression in transgenic plants reveals non-overlapping roles for chloroplast and cytosolic glutamine synthetase. Proc Natl Acad Sci USA 87: 3459-3463.

Emes MJ, Fowler MW. 1979. The intracellular location of the enzymes of nitrate assimilation in the apices of seedling pea roots. Planta 144: 249-253.

Erickson PA, Lewis GP, Fisher SK. 1993. Postembedding immunocytochemical techniques for light and electron microscopy. Meth Cell Biol 37: 283-310.

Ericson MC. 1985. Purification and properties of glutamine synthetase from spinach leaves. Plant Physiol 79: 923-927.

Esaguy N, Águas AP, Silva MT. 1989. High-resolution localization of lactoferrin in human neutrophils: labelling of secondary granules and cell heterogeneity. J Leukocite Biol 46: 51-62.

Esau K. 1977. Anatomy of Seed Plants. Wiley, New York.

Espinoza NO, Estrada R, Silva-Rodriguez D, Tovar P, Lizarraga R, Dodds JH. 1986, The potato: a model crop plant for tissue culture. Outlook on Agriculture 15: 21-26.

Ewing EE. 1985. Cuttings as simplified models of the potato plant. In Li PH, ed, Potato Physiology, pp 154-207. Academic Press, London.

Ewing EE, Struik PG. 1992. Tuber formation in potato: induction, initiation and growth. Hort Rev 14: 89-198.

Felker FC, Muhitch MJ, 1990. Immunohistochemical localization of glutamine synthetase in developing maize kernels. Can J Bot. 68: 1916-1920.

Feller U, Fischer A. 1994. Nitrogen metabolism in senescing leaves. Crit Rev Plant Sci 13: 241-273.

Ferro de Beça. 1995. Tratamentos de batateiras com agroquímicos. Estudos bioquímicos e ultraestruturais de plantas crescidas no campo. Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto.

Forde BG, Cullimore JV. 1989. The molecular biology of glutamine synthetase in higher plants. Oxford Surv Plant Mol Biol 6: 247-296.

Forde BG, Day HM, Turton JF, Shen W-J, Cullimore JV, Oliver JE. 1989. Two glutamine synthetase genes from *Phaseolus vulgaris* L. display contrasting developmental and spatial patterns of expression in transgenic *Lotus corniculatus* plants. Plant Cell 1: 391-401.

Freeman J, Marquez AJ, Wallsgrove RM, Saarelainen R, Forde BG. 1990. Molecular analysis of barley mutants deficient in chloroplast glutamine synthetase. Plant Mol Biol 14: 297-311.

Frohman MA. 1995. Rapid amplification of cDNA ends. In Dieffenbach CW, Dveksler GS, PCR Primer, a Laboratory Manual, pp 381-409. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Frohman MA, Dush MK, Matin GR. 1988. Rapid production of full length cDNAs from rare transcripts by amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. Proc Natl Acad Sci USA 85: 8998-9002.

Frommer WB , Sonnewald U. 1995. Molecular analysis of carbon partitioning in solanaceous species. J Exp Bot 46: 587-607.

Gálvez S, Gallardo F, Cánovas F. 1990. The ocurrence of glutamine synthetase isoenzymes in tomato plants is correlated to plastid differentiation. J Plant Physiol 137: 1-4.

Gan S, Amasino RM. 1996. Cytokinins in plant senescence: from spray and pray to clone and play. BioEssays 18: 557-565.

Gebhardt C, Oliver JE, Forde BG, Saarelainen R, Miflin BJ. 1986. Primary structure and differential expression of glutamine synthetase genes in nodules, roots and leaves of *Phaseolus vulgaris*. EMBO J 5: 1429-1435.

Gohsn CR, Gil DW, Spanoyannis AF, Stern ME. 1994. Synthesis of selective nonradioactive probes by unidirectional PCR. Biochemica (Boehringer Manheim) 11: 22-24.

Goping G, Kuijpers AJ, Vinet R, Pollard HB. 1996. Comparison of LR White and Unicryl as embedding media for light and electron immunomicroscopy of chromaffin cells. J Histochem Cytochem 44: 289-295.

Gubler U, Hoffman BJ. 1983. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. Gene 25:263.

Guilfoyle TJ, McClure BA, Gee MA, Hagen G. 1993. Tissue-print hybridization for detecting RNA directly. Meth Enzymol 218: 688-695.

Guiltinan MJ, McHenry L. 1995. Epitope tagging for the detection of fusion protein expression in transgenic plants. Meth Cell Biol 49: 143-151.

Guiz C, Hirel B, Shedlofski G, Gadal P. 1979. Occurrence and influence of light on the relative proportions of glutamine synthetase in rice leaves. Plant Sci Lett 15: 271-277.

Gunning BES, Steer MW. 1975. Ultrastructure and the Biology of Plant Cells. Edward Arnold Publishers, London.

Hahlbrock K, Griesebach H. 1979. Enzymic controls in the biosynthesis of lignin and flavonoids. Annu Rev Plant Physiol 30: 105-130.

Hames BD. 1988. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. In Hames BD, Rickwood D, eds, Gel Electrophoresis of Proteins, a practical approach, pp 1-91. IRL Press, Oxford.

Harel E, Lea PJ, Miflin BJ. 1977. The localization of enzymes of nitrogen assimilation in maize leaves and their activities during greening. Planta 134: 195-200.

Harlow E, Lane D. 1988. Antibodies: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Harris N. 1994. Immunocytochemistry for light and electron microscopy. In Harris N, Oparka KJ, eds, Plant Cell Biology, a practical approach, pp 158-176. IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

Hawes C. 1988. Subcellular localization of macromolecules by microscopy. In Shaw CH, ed, Plant Molecular Biology, a practical approach, pp 103-130. IRL Press at Oxford Press, Oxford.

Hawes C. 1994. Electron Microscopy. In Harris N, Oparka KJ, eds, Plant Cell Biology, a practical approach, pp 69-96. IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

Hayakawa T, Kamachi K, T, Oikawa M, Ojima K, Yamaya T. 1990. Response of glutamine synthetase and glutamate synthase isoforms to nitrogen sources in rice cell cultures. Plant Cell Physiol 31: 1071-1077.

Hayakawa T, Yamaya T, Kamachi K, Ojima K. 1992. Purification, characterization, and immunological properties of NADH-dependent glutamate synthase from rice cell cultures. Plant Cell Physiol 31: 1071-1077.

Haystead A. 1973. Glutamine synthetase in the chloroplasts of *Vicia faba*. Planta 111: 271-274.

Hemberg T. 1985. Potato rest. In Li PH, ed, Potato Physiology, pp 354-387. Academic Press, London.

Hensel LL, Grbic V, Baumgarten DA, Bleecker AB. 1993. Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in Arabidopsis. Plant Cell 5: 553-564.

Herman EM. 1988. Immunocytochemical localization of macromolecules with the electron microscope. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 39: 139-155.

Hirel B, Bouet C, King B, Layzell D, Jacobs F, Verma DPS. 1987. Glutamine synthetase genes are regulated by ammonia provided externally or by symbiotic nitrogen fixation. EMBO J 6: 1167-1171.

Hirel B, Gadal P. 1980. Glutamine synthetase in rice. A comparative study of the enzymes from roots and leaves. Plant Physiol 66: 619-623.

Hirel B, Gadal P. 1981. Glutamine synthetase isoforms in pea leaves: intracellular localization. Z Pflanzenphysiol 102: 315-319.

Hirel B, Gadal P. 1982. Glutamine synthetase isoforms in leaves of a C4 plant, *Sorghum vulgare* L. Physiol Plant 54: 69-74.

Hirel B, Marsolier MC, Hoarau A, Hoarau J, Brangeon J, Schafer R, Verma DPS. 1992. Forcing expression of a soybean root glutamine synthetase gene in tobacco leaves induces a native gene encoding cytosolic enzyme. Plant Mol Biol 20: 207-218.

Hirel B, Miao G-H, Verma DPS. 1993. Metabolic and developmental control of glutamine synthetase genes in legume and non-legume plants. In Verma DPS, ed, Control of Plant Gene Expression, pp 443-458. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Hirel B, Perrot-Rechenmann, Suzuki A, Vidal J, Gadal P. 1982a. Glutamine synthetase in spinach leaves. Plant Physiol 69: 983:987.

Hirel B, Vidal J, Gadal P. 1982b. Evidence for a cytosolic-dependent light induction of chloroplastic glutamine synthetase during greening of etiolated rice leaves. Planta 155: 17-23.

Hirel B, Weatherley C, Cretin C, Bergounioux C, Gadal P. 1984. Multiple subunit composition of glutamine synthetase of *Nicotiana tabacum* L. Plant Physiol 74: 448-450.

Hoagland DR, Arnon DI. 1950. The water culture method for growing plants without soil. Univ Calif Coll Agric Cir 347: 1-39.

Hoefer Scientific Instruments. 1988/89. Basic Techniques and Exercises in Electrophoresis. Hoefer, San Francisco, California.

Hoezle I, Finner JJ, McMulen MD, Streeter JG. 1992. Induction of glutamine synthetase activity in nonnodulated roots of *Glycine max, Phaseolus vulgaris* and *Pisum sativum.* Plant Physiol 100: 525-528.

Holthaus U, Schmitz K. 1991. Distribution and immunolocalization of stachyose synthase in *Cucumis melo* L. Planta 185: 479-486.

Hooker WJ. 1986.Compendium of Potato Deseases, 3rd edition, American Phytopatological Society, St Paul, Minnesota.

Hopfner M, Ochs G, Wild A. 1990. Glutamine synthetases of green and etiolated leaves of *Sinapsis alba*. Evidence of the identity of the respective enzyme proteins. Planta 181: 155-161.

Hopfner M, Reifferscheid G, Wild A. 1988. Molecular composition of glutamine synthetase of *Sinapsis alba* L. Z Naturforsch 43c: 194-1988

Hussey G, Stacey NJ. 1984. Factors affecting the formation of in vitro tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). Ann Bot 53: 565-578.

Huynh TV, Young R, Davis RW. 1985. Construction and screening of cDNA libraries in λgt10 and λgt11. In Glover DM, ed, DNA Cloning I, a practical approach, pp 49-78. IRL Press at Oxford Press, Oxford.

Immunogold detection from Amersaham International. Amersham UK.

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. 1987. GUS fusions: ß-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J 6: 3901-3907.

Jendrisak J, Young RA, Engel JD. 1987. Cloning cDNA into λgt10 and λgt11. Meth Enzymol 152: 359-371.

Joy KW. 1988. Ammonia, glutamine and asparagine: a carbon-nitrogen interface. Can J Bot 66: 2103-2109.

Kamachi K, Yamaya T, Hayakawa T, Mae, T, Ojima K. 1992a. Changes in cytosolic glutamine synthetase polypeptide and its mRNA in a leaf blade of rice plants during natural senescence. Plant Physiol 98: 1323-1329.

Kamachi K, Yamaya T, Hayakawa T, Mae, T, Ojima K. 1992b. Vascular bundle-specific localization of cytosolic glutamine synthetase in rice leaves. Plant Physiol 99: 1481-1486.

Kamachi K, Yamaya T, Mae, T, Ojima K. 1991. A role for glutamine synthetase in the remobilization of nitrogen during natural senescence in rice leaves. Plant Physiol 96: 411-417.

Karcher SJ. 1995. Molecular Biology, a Project Approach. Academic Press, San Diego, California.

Kawakami N, Watanabe A. 1988. Senescence-specific increase in cytosolic glutamine synthetase and its mRNA in radish cotyledons. Plant Physiol 88: 1430-1434.

Keys AJ, Bird IF, Cornelius MF, Lea PJ, Wallsgrove RM, Miflin BJ. 1978. Photorespiratory nitrogen cycle. Nature. 275: 741-742.

Knox RB, Vithanage HIMV, Howlett BJ. 1980. Botanical immunocytochemistry: a review with special reference to pollen antigens and allergens. Histochem J 12: 247-272.

Kozaki A, Sakamoto A, Tanaka K, Takeba G. 1991. The promoter of the gene for glutamine synthetase from rice shows ogan-specific and substrate-induced expresion in transgenic tobacco plants. Plant Cell Physiol 32: 353-358.

Kozaki A, Takeba G. 1996. Photorespiration protects C3 plants from photooxidation. Nature 384: 557-560.

Kumada Y, Benson DR, Hilleman D, Hosted TJ, Rochefort DA, Thompson CJ, Wohlleben W, Tateno Y. 1993. Evolution of the glutamine synthetase gene, one of the oldest existing and functioning genes. Proc Natl Acad Sci USA 90: 3009-3013.

Kung SD, Sakano K, Wildman SG. 1974. Multiple peptide composition of the large and small subunit of *Nicotiana tabacum* fraction I protein ascertained by fingerprint and isoelectric focusing. Biochem Biophys Acta 365: 138-147.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

Lam H-M, Coschigano KT, Oliveira IC, Melo-Oliveira R, Coruzzi GM. 1996. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 47: 569-593.

Lam H-M, Coschigano KT, Schultz C, Melo-Oliveira R, Tjaden G, Oliveira I, Ngai N, Hsieh M-H, Coruzzi G. 1995. Use of *Arabidopsis* mutants and genes to study amide amino acid biosythesis. Plant Cell 7: 887-898.

Lara M, Cullimore JV, Lea PJ, Miflin BJ, Johnston AWB, Lam JW. 1983. Appearance of a novel form of plant glutamine synthetase during nodule development in *Phaseolus vulgaris* L. Planta 157: 254-258.

Lara M, Porta H, Padila J, Folch J, Sanchez F. 1984. Heterogeneity of glutamine synthetase polypeptides in *Phaseolus vulgaris* L. Plant Physiol 76: 1019-1023.

Larcher W. 1995. Physiological Plant Ecology (3rd edition). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Lea PJ. 1993. Nitrogen metabolism. In Lea PJ, Leegood RC, eds, Plant Biochemistry and Molecular Biology, pp 155-180. John Wiley & Sons, Chichester, UK.

Lea PJ, Blackwell RD, Murray AJS, Joy KW. 1988. The use of mutants lacking glutamine synthetase and glutamate synthase to study their role in plant nitrogen metabolism. In Poulton JE, Romeo JT, Conn EE, eds, Recent Advances in Phytochemistry, vol 23, Plant Nitrogen Metabolism, pp 157-189. Plenum, New York, London.

Lea PJ, Miflin BJ. 1974. An alternate route for nitrogen assimilation in higher plants. Nature 251: 614-616.

Lea PJ, Miflin BJ. 1980. Transport and metabolism of asparagine and other nitrogen compounds within the plant. In Miflin BJ, ed, The Biochemistry of Plants, vol 5, pp 569-607. Academic Press, New York.

Lea PJ, Robinson SA, Stewart GR. 1990. The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate, and asparagine. In Miflin BJ, Lea PJ, eds, The Biochemistry of Plants, vol 16, pp 121-159. Academic Press, New York.

Levis R. 1995. Strategies for cloning PCR products. In Dieffenbach CW, Dveksler GS, PCR Primer, a Laboratory Manual, pp 539-554. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Li M-G; Villemur R, Hussey PJ, Silflow CD, Gantt JS, Snustad DP. 1993. Differential expression of six glutamine synthetase genes in *Zea mays*. Plant Mol Biol 23: 401-407.

Li X, Okita TW. 1995. Localization of RNA by high resolution *in situ* hybridization. Meth Cell Biol 49: 185-199.

Lightfoot DA, Green NK, Cullimore JV. 1988. The chloroplast-located glutamine synthetase of *Phaseolus vulgaris* L. Plant Mol Biol 11: 191-202.

Loulakakis KA, Roubelakis-Angelakis. 1996. Characterization of *Vitis vinifera* L. glutamine synthetase and molecular cloning of cDNAs for the cytosolic enzyme. Plant Mol Biol 31: 983-992.

Loyola-Vargas VM, Sánchez de Jiménez E. 1986. Effect of nitrate, ammonium and glutamine on nitrogen assimilation enzymes during callus growth of maize. J Plant Physiol. 125: 235-242.

Mack G, Tischner R. 1990. Gutamine synthetase of oligomers and isoforms in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). Planta 181: 10-17.

Manderscheid R, Bender J, Weigel H-J, Jager H-J. 1991. Low doses of ozone affect nitrogen metabolism in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves. Biochem Physiol Pflanzen 187: 283-291.

Manderscheid R, Jager H-J. 1993. Seasonal changes in nitrogen metabolism of spruce needeles (Picea abies (L.) Karst.) as affected by water stress and ambient air pollutants. J Plant Physiol 141: 494-501.

Manderscheid R, Jager H-J, Kress LW. 1992. Effects of ozone on foliar nitrogen metabolism of *Pinus taeda* L. and implications for carbohydrate metabolism. New Phytol 121: 623-633.

Mann AF, Fentem, PA, Stewart GR. 1979. Identification of two forms of glutamine synthetase in barley (*Hordeum vulgare* L.) Biochem Biophys Res Commun 88: 515-521.

Marschner H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, London.

Marsolier M-C, Hirel B. 1993. Metabolic and developmental control of cytosolic glutamine synthetase genes in soybean. Physiol Plant 89: 613-617.

McCauley MM, Evert RF. 1988. Morphology and vasculature of the leaf of potato (*Solanum tuberosum*). Am J Bot 75: 377-390.

McCauley MM, Evert RF. 1989. Minor veins of the potato (*Solanum tuberosum* L.) leaf: ultrastructure and plasmodesmatal frequency. Bot Gaz 150: 351-368.

McGrath RB, Coruzzi GM. 1991. A gene network controlling glutamine and asparagine biosynthesis in plants. Plant J 1: 275-280.

McNally SF, Hirel B. 1983. Glutamine synthetase isoforms in higher plants. Physiol Vég 21: 761-774.

McNally SF, Hirel B, Gadal P, Mann AF, Stewart GR. 1983. Glutamine synthetases of higher plants. Plant Physiol 72: 22-25.

Miao G-H, Hirel B, Marsolier MC, Ridge RW, Verma DPS. 1991. Ammonia-regulated expression of a soybean gene encoding cytosolic glutamine synthetase in transgenic *Lotus corniculatus*. Plant Cell 3:11-22.

Miflin BJ. 1974. The localization of nitrite reductase and some other enzymes related to amino acid biosynthesis in the plastids of roots and leaves. Plant Physiol 54: 550-555.

Miflin BJ, Lea PJ. 1976. The pathway of nitrogen assimilation in plants. Phytochemistry 15: 873-885.

Miflin BJ, Lea PJ. 1980. Ammonia assimilation. In Miflin BJ, ed, The Biochemistry of Plants, vol 5, pp 169-202. Academic Press, New York.

Millard P. 1988. The accumulation and storage of nitrogen by herbaceous plants. Plant Cell Environ 11: 1-8.

Millard P, Catt JW. 1988. The influence of nitrogen supply on the use of nitrate and ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase as leaf nitrogen stores for growth of potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). J Exp Bot 39: 1-11.

Millard P, MacKerron DKL. 1986. The effects of nitrogen application on growth and nitrogen distribution within the potato canopy. Ann Appl Biol 109: 427-437.

Misra N, Dwivedi UN. 1990. Nitrogen assimilation in germinating *Phaseolus aureus* seeds under saline stress. J Plant Physiol 132: 491-498.

Moore PJ. 1995. Advances in immunoelectron microscopy. Meth Cell Biol 49: 45-56.

Moreno U. 1985. Environmental effects o growth and developmemt of potato plants. In Li PH, ed, Potato Physiology, pp 481-501. Academic Press, London.

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15:473-497.

Nato F, Hirel B, Gadal P. 1984. Chloroplastic glutamine synthetase from tobacco leaves: a glycosylated protein. FEBS Lett 175: 443-446.

Newman GR. 1987. Use and abuse of LR White. Histochem J 19: 118-120.

Nolte KD, Koch KE. 1993. Companion-cell specific localization of sucrose synthase in zones of phloem loading and unloading. Plant Physiol 101: 899-905.

O'Farrell PH. 1975. High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem 250: 4007-4021.

O'Neal D, Joy KW. 1973. Glutamine synthetase of pea leaves. I. Purification, stabilization and pH optima. Arch Biochem Biophys 159: 113-122.

Oaks A. 1994a. Efficiency of nitrogen utilization in C3 and C4 cereals. Plant Physiol 106: 407-414.

Oaks A. 1994b. Primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation. Can J Bot 72: 739-750.

Oaks A, Hirel B. 1985. Nitrogen metabolism in roots. Annu Rev Plnt Physiol 36: 345-365.

Okayama H, Berg P. 1982. High efficiency cloning of full-length cDNA. Mol Cell Biol 2: 161-170.

Pearson WR, Lipman DJ. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. Proc Natl Acad Sci USA 85: 2444.

Peat LJ, Tobin AK. 1996. The effect of nitrogen nutrition on the cellular localization of glutamine synthetase isoforms in barley roots. Plant Phisiol 111: 1109-1117.

Peoples MB, Gifford RM. 1997. Regulation of the transport of nitrogen and carbon in higher plants. In Dennis DT, Turpin DH, Lefebvre DD, Layzell DB, eds, Plant Metabolism, 2nd edition, pp 525-538. Longman, Harlow, UK.

Pérez-García A, Cánovas FM, Gallardo F, Hirel B, de Vicente A. 1995. Differential expression of glutamine synthetase isoforms in tomato detached leaflets infected with *Pseudomonas syringae* pv. tomato. Mol Plant-Microbe Interact 8: 96-103.

Pérez-García A, Pereira S, Pissarra J, Salema R, Vicente A, Cánovas FM. 1996. Immmunocytolocalization of a novel cytosolic glutamine synthetase in mesophyll cells of tomato leaves infected by *Pseudomonas syringae* pv. tomato or trated with phosphinothricin. 10th Federation of European Societies of Plant Physiology Congress. Florencia, Italia.

Pérez-Rodríguez J, Valpuesta V. 1996. Expression of glutamine synthetase genes during natural senescence of tomato leaves. Physiol Plant 97: 576-582.

Pesole G, Bozzetti MP, Lanave C, Preparata G, Saccone C. 1991. Glutamine synthetase gene evolution: a good molecular clock. Proc Natl Acad Sci USA 88: 522-526.

Peterman TK, Goodman HM. 1991. The glutamine synthetase gene family of *Arabidopsis thaliana*: light-regulation and differential expression in leaves, roots and seeds. Mol Gen Genet 230: 145-154.

Peterson CA, Peterson RL, Barker WG. 1981. Observations on the structure and osmotic potentials of parenchyma associated with the internal phloem of potato tubers. Am Pot J 58: 575-584.

Peterson RL, Barker WG, Howarth MJ. 1985. Development and structure of tubers. In Li PH, ed, Potato Physiology, pp 123-152. Academic Press, London.

Promega Protocols and Aplications Guide. 1991, Promega Corporation, Madison.

Pujade-Renaud V, Clement A, Perrot-Rachenmann C, Prevot J-C, Chrestin H, Jacob J-L, Guern J. 1994. Ethylene-induced increase in glutamine synthetase activity and mRNA levels in *Hevea brasiliensis* latex cells. Plant Physiol 105: 127-132.

Rathnam CKM, Edwards GE. 1976. Distribution of nitrate-assimilating enzymes between mesophyll protoplasts and bundle sheath cells in leaves of three groups of C4 plants. Plant Physiol 57: 881-885.

Redinbaugh MG, Campbell WH. 1993. Glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamate synthase expression in maize (Zea mays) root primary response to nitrate. Plant Physiol 101: 1249-1255.

Reeve RM, Hautala E, Weaver ML. 1969. Anatomy and compositional variations within potatoes. I. Developmental histology of the tuber. Am Potato J 46: 361-373.

Reeve RM, Hautala E, Weaver ML. 1970. Anatomy and compositional variations within potatoes. III. Gross compositional gradients. Am Potato J 47: 148-162.

Reeve RM, Timm E, Weaver ML. 1973. Parenchyma cell growth in potato tubers. II. Cell divisions vs. cell enlargement. Am Potato J 50: 71-78.

Reynolds ES. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol 17: 208-212.

Ribrioux S, Kleymann G, Haase W, Heitmann K, Ostermeier C, Michel H. 1996. Use of nanogold- and fluorescent-labeled antibody Fv fragments in immunocytochemistry. J Histochem Cytochem 44: 207-213.

Riesmeier JW, Hirner B, Frommer WB. 1993. Potato sucrose transporter expression in minor veins indicates a role in phloem loading. Plant Cell 5: 1591-1598.

Robert FM, Wong PP. 1986. Isoenzymes of glutamine synthetase in *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus lanatus* L. root nodules. Plant Physiol 81: 142-148.

Robinson DL, Kahn ML, Vance CP. 1994. Cellular localization of nodule-enhanced aspartate aminotransferase in *Medicago sativa* L. Planta 192: 202-210.

Robinson SA, Slade AP, Fox GG, Phillips R, Ratcliffe RG, Stewart GR. 1991. The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. Plant Physiol 95: 509-516.

Roche D, Temple SJ, Sengupta-Gopalan C. 1993. Two classes of differentially regulated glutamine synthetase genes are expressed in the soybean nodule: a nodule-specific class and and a constitutively expressed class. Plant Mol Biol 22: 971-983.

Sakakibara H, Kawabata S, Takahashi H, Hase T, Sugiyama T. 1992a. Molecular cloning of the family of glutamine synthetase genes from maize: expression of genes for glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamate synthase in photosynthetic and non-photosynthetic tissues. Plant Cell Physiol 33: 49-58.

Sakakibara H, Kawabata S, Hase T, Sugiyama T. 1992b. Differential effects of nitrate and light on the expression of glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize. Plant Cell Physiol 33: 1193-1198.

Sakamoto A, Ogawa M, Matsumura T, Shibata D, Takeba G, Tanaka K, Fujii S. 1989. Three cDNA sequences coding for glutamine synthetase polypeptides in *Oryza sativa* L. Plant Mol Biol 13:611-614.

Sakamoto A, Takeba G, Shibata D, Tanaka K. 1990. Phytochrome-mediated activation of the gene for cytosolic glutamine synthetase (GS1) during imbibition of photosensitive lettuce seeds. Plant Mol Biol 15: 317-323.

Sakurai N, Hayakawa T, Nakamura T, Yamaya T. 1996. Changes in the cellular localization of cytosolic glutamine synthetase protein in vascular bundles of rice leaves at various stages of development. Planta 200: 306-311.

Salema R. 1969. Amido - Estudo ultrastrutural da sua biogénese em plantas superiores Brotéria (CN) 38: 1-111

Salema R, Brandão I. 1973. The use of PIPES buffer in the fixation of plant cells for electron microscopy. J Submicr Cytol 5: 79-96

Salema R, Santos I. 1992. Microscopia Electrónica de Transmissão. Instrumentação e Técnicas para Material Biológico. Instituto Nacional de Investigação Científica, Lisboa.

Sambrook, J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sanger F. 1981. Determination of nucleotide sequences in DNA. Science 214: 1205-1210.

Santos I, Salema R. 1989. Penicillins and activity of nitrogen metabolism enzymes in plant tissue cultures. Plant Sci 59: 119-125.

Santos I, Salema R. 1992. Effect of nitrogen nutrition on nitrate and nitrite reductase, glutamine synthetase, glutamate synthase and glutamate dehydrogenase in the CAM plant *Kalanchoe lateritia* Engl. Plant Sci 84: 145-152.

Scala C, Cenacchi G, Ferrari C, Pasquinelli G, Preda P, Manara GC. 1992. A new acrylic resin formulation: a useful tool for histological, ultrastructural, and immunocytochemical investigations. J Histochem Cytochem 40: 1799-1804.

Schjoerring JK, Kyllingsbaek A, Mortensen JV, Byskov-Nielsen S. 1993. Field investigations of ammonia exchange between barley plants and the atmosphere. II. Nitrogen reallocation, free ammonium content and activities of ammonium-assimilating enzymes in different leaves. Plant Cell Environ 16: 169-178.

Sechley KA, Yamaya T, Oaks A. 1992. Compartmentation of nitrogen assimilation in higher plants. Int Rev Cytol 134: 85-163.

Sieciechowicz KA, Joy KW, Ireland RJ. 1988. The metabolism of asparagine in plants. Phytochemistry 27: 663-671.

Silva MT, Santos Mota JM, Melo JVC, Carvalho Guerra F. 1971. Uranyl salts as fixatives for electron microscopy. Study of the membrane ultrastructure and phospholipid loss in bacilli. Biochem Biophys Acta 233: 513-520.

Simon CJ, Schnorr KM. 1992. PCR preparation of DNA inserts from lambda and plasmid vectors for RFLP mapping. Plant Mol Biol Rep 10: 367-371.

Snustad DP, Hunsperger JP, Chereskin BM, Messing J. 1988. Maize glutamine synthetase cDNAs: isolation by direct genetic selection in *E. coli*. Genetics 120: 1111-1124.

Soltner D. 1980. Les grandes productions vegetales. Coll Sci et Tecniques Agricoles, pp 247-257. Angers, Le Clos Lorelle.

Somerville CR, Ogren WL. 1980. Inhibition of photosynthesis in *Arabidopsis* mutants lacking leaf glutamate synthase activity. Nature 286: 257-259.

Stanford AC , Larsen K, Barker DG, Cullimore JV. 1993. Differential expression within the glutamine synthetase gene family of the model legume *Medicago truncatula*. Plant Physiol 103: 73-81.

Steward FC, Moreno, U, Rocca WM. 1981. Growth, form and composition of potato plants as affected by environment. Ann Bot 48 (supp2): 1-45.

Stewart GR, Mann AF, Fentem PA. 1980. Enzymes of glutamate formation: glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase. In Miflin BJ, ed, The Biochemistry of Plants, vol 5, pp 271-327. Academic Press, New York.

Stoddart JL, Thomas H. 1982. Leaf senescence. In Boulter D, Parthier B, eds, Enciclopedia of Plant Physiology, vol 14A, pp 592-636. Springer-Verlag, Berlin.

Sugiharto B, Sugiyama T. 1992. Effect of nitrate and ammonium on gene expression of phosphoenolpyruvate carboxilase and nitrogen metabolism in maize leaf tissue during recovery from nitrogen stress. Plant Physiol 98: 1403-1408.

Sukanya R, Li M, Snustad DP. 1994. Root- and shoot-specific responses of individual glutamine synthetase genes of maize to nitrate and ammonium. Plant Mol Biol 26: 1935-1946.

Suzuki A, Gadal P, Oaks A. 1981. Intracellular distribution of enzymes associated with nitrogen assimilation in roots. Planta 151: 457-461.

Ta CT. 1991. Nitrogen metabolism in the stalk tissue of maize. Plant physiol 97: 1375-1380.

Taylor CB. 1997. Promoter fusion analysis: an insufficient measure of gene expression. Plant Cell 9: 273-275.

Temple SJ, Bagga S, Sengupta-Gopalan C. 1994. Can glutamine synthetase activity levels be modulated in transgenic plants by the use of recombinant DNA technology? Biochem Soc Trans 22: 915-920.

Temple SJ, Heard J, Ganter G, Dunn K, Sengupta-Gopalan C. 1995. Characterization of nodule-enhanced glutamine synthetase from alfalfa: nucleotide sequence, *in situ* localization, and transcript analysis. Mol Plant-Microbe Interact 8: 218-227.

Temple SJ, Sengupta-Gopalan C. 1997 Manupulating aminoacid biosynthesis. In Foyer CH e Quick, PW, eds, A Molecular Approach to Primary Metabolism in Higher Plants, pp 155-177. Taylor and Francis, London.

Thomas H, Stoddart JL. 1980. Leaf senescence. Ann Rev Plant Physiol 31: 83-111.

Tingey SV, Coruzzi GM. 1987. Glutamine synthetase of *Nicotiana plumbaginifolia*: Cloning and *in vivo* expression. Plant Physiol 84: 366-373.

Tingey SV, Tsai FY, Edwards JW, Walker EL, Coruzzi GM. 1988. Chloroplast and cytosolic glutamine synthetase are encoded by homologous nuclear genes which are differentially expressed in vivo. J Biol Chem 263: 9651-9657.

Tingey SV, Walker EL, Coruzzi GM. 1987. Glutamine synthetase genes of pea encode distinct polypeptides which are differentially expressed in leaves, roots and nodules. EMBO J 6: 1-9.

Tjaden G, Coruzzi GM. 1993. Glutamine and asparagine biosynthesis: the regulation of genes for enzymes along a common nitrogen-metabolic pathway.In Verma DPS, ed, Control of Plant Gene Expression, pp 459-470. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Tjaden G, Edwards JW, Coruzzi GM. 1995. *cis* elements and *trans*-acting factors affecting regulation of a nonphotosynthetic light-regulated gene for chloroplast glutamine synthetase. Plant Physiol 108: 1109-1117.

Tobin AK, Ridley SM, Stewart GR. 1985. Changes in the activities of chloroplast and cytosolic isoenzymes of glutamine synthetase during normal leaf growth and plastid development in wheat. Planta 163: 544-548.

Tokuyasu KT. 1986. Immunocytochemistry on ultra-thin frozen sections. Histochemistry 12: 381-403.

Towbin H, Staehlin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 76: 4350-4354.

Valentine RC. 1966. Citado por Salema R. 1969.

Van Bel AJE. 1993. Strategies of phloem loading. Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol 44: 253-281.

Vázquez-Flota F, Quiroz J, Scorer KN, Loyola-Vargas. 1989. Effect of the auxin/cytokinin ratio on the enzymes of nitrogen metabolism in Canavalia ensiformis L. tissue cultures. J Plant Physiol 135: 57-62.

Venable JH, Goggeshall R. 1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. J Cell Biol 25: 407-408.

Verma DPS, Fortin MG, Stanley J, Mauro VP, Purohit S, Morrison N. 1986. Nodulins and noduline genes in *Glycine max*. Plant Mol Biol 7: 51-61.

Vézina L-P, Langlois JR. 1989. Tissue and cellular distribution of glutamine synthetase in roots of pea (*Pisum sativum*) seedlings. Plant Physiol 90: 1129-1133.

Vézina L-P, Margolis HA. 1990. Purification and properties of glutamine synthetase in leaves and roots of *Pinus banksiana* Lamb. Plant Physiol 94: 657-664.

Walker EL, Coruzzi GM. 1989. Developmentally regulated expression of the gene family for cytosolic glutamine synthetase in *Pisum sativum*. Plant Physiol 91:702-708.

Walker EL, Weeden NF, Taylor CB, Green P, Coruzzi GM. 1995. Molecular evolution of duplicate copies of genes encoding cytosolic glutamine synthetase in *Pisum sativum*. Plant Mol Biol 29: 1111-1125

Wallsgrove RM, Lea PJ, Miflin BJ. 1979. Distribution of the enzymes of nitrogen assimilation within the pea leaf cell. Plant Physiol 63: 232-236.

Wallsgrove RM, Turner JC, Hall NP, Kendall AC, Bright SWJ. 1987. Barley mutants lacking chloroplast glutamine synthetase - biochemical and genetic analysis. Plant Physiol 83: 155-158.

Wang Q, Monroe J, Sjolund RD. 1995. Identification and characterization of a phloem-specific ß-amylase. Plant Physiol 109: 743-750.

Watanabe A, Hamada K, Yokoi H, Watanabe A. 1994. Biphasic and differential expression of cytosolic glutamine synthetase genes of radish during seed germination and senescence of cotyledons. Plant Mol Biol 26: 1807-1817.

Watson CJ, Demmer J. 1995. Procedures for cDNS cloning. In Glover DM, Hames BD, eds, DNA Cloning I, a practical approach, pp 85-119. IRL Press at Oxford Press, Oxford.

Weber M, Schmidt S, Schuster C; Mohr H. 1990. Factors involved in coordinate apparence of nitrate reductase and glutamine synthetase in mustard (*Sinapsis alba* L.) seedling. Planta 180: 429-434.

Woodall J, Boxall JG, Forde BG, Pearson J. 1996. Changing perspectives in plant nitrogen metabolism: the central role of glutamine synthetase. Science Progress 79: 1-26.

Yamaya T, Hayakawa T, Tanasawa K, Kamachi K, Mae, T, Ojima K. 1992. Tissue distribution of glutamate synthase and glutamine synthetase in leaves. Occurrence of NADH-dependent glutamate synthase protein and activity in the unexpanded, nongreen leaf blades. Plant Physiol 100: 1427-1432.

Yamaya T, Ishida H, Kamachi K, Ojima K. 1990. Immunochemical analysis of multiple subunit polypeptides of glutamine synthetase in methionine sulfoximine-sensitive and tolerant tobacco cell cultures. Plant Cell Physiol 31: 325-331.

Yamaya T, Oaks A. 1988. Distribution of two isoforms of glutamine synthetase in bundle sheath and mesophyll cells of corn leaves. Physiol Plant 72: 23-28.

Yamaya T, Oaks A, Matsumoto H. 1984. Characteristics of glutamate dehydrogenase in mitochondria prepared from corn shoots. Plant Physiol 76: 1009-1013.

Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33:103-119.

Yeh K, Juang R, Su J. 1992. A rapid and efficient method for RNA isolation from plant with high carbohydrate content. Focus (BRL)13: 102-103.

Young RA, Davis RW. 1983a. Efficient isolation of genes by using antibody probes. Proc Natl Acad Sci USA 80: 1194-1198.

Young RA, Davis RW. 1983b. Yeast RNA polymerase II genes: isolation with antibody probes. Science 222: 778-782.