

Revisão / Review**MANIPULAÇÃO DE CEREAIS PARA ACÚMULO DE LISINA EM SEMENTES**

Silvia Maria Guerra Molina¹; Salete Aparecida Gaziola¹; Peter John Lea²; Ricardo Antunes Azevedo^{1*}

¹*Depto. de Genética - USP/ESALQ, C.P.83 - CEP: 13400-970 - Piracicaba, SP.*

²*Department of Biological Sciences, University of Lancaster, LA1 4YQ - Lancaster, UK.*

*Autor correspondente <razeved@carpa.ciagri.usp.br>

RESUMO: A lisina é um aminoácido essencial cuja via de biossíntese faz parte da via metabólica do ácido aspártico, pela qual são também sintetizados os aminoácidos treonina, metionina e isoleucina. Além disso, a lisina é o principal aminoácido limitante em todos os cereais e por cerca de 30 anos a via do ácido aspártico tem sido estudada em plantas, com o intuito de desvendar e caracterizar os principais pontos chave na regulação das vias de biossíntese desses aminoácidos. Duas etapas distintas, uma primeira originada a partir do desenvolvimento da cultura de tecidos (anos 70-80) e a segunda a partir do desenvolvimento de técnicas para a transformação de plantas (anos 90), permitiram que mutantes bioquímicos e plantas transgênicas fossem produzidos com alterações específicas em passos metabólicos chave, levando à superprodução e acúmulo de treonina em vários tecidos das plantas. Entretanto, a acumulação de lisina em sementes não foi obtida. Tal fato, associado a estudos bioquímicos da via de degradação da lisina em cereais e em leguminosas, indicou que a manipulação da degradação seria tão ou mais importante que a manipulação da biossíntese de lisina para o acúmulo deste aminoácido em sementes dos cereais. Em milho, o uso e estudo de outros mutantes tais como o opaco-2 e variedades QPM (Quality Protein Maize) contribuíram significativamente para a compreensão dos eventos regulatórios. As estratégias para a obtenção de materiais ricos em lisina e sua relevância à manipulação de outros aminoácidos são revisados.

Palavras-chave: lisina, nutrição, aminoácidos essenciais, cereais

MANIPULATING CEREAL CROPS FOR HIGH LYSINE ACCUMULATION IN SEEDS

ABSTRACT: The nutrition value of a protein is directly related to its amino acid composition. Some of these amino acids, termed essential amino acids, cannot be synthesized by humans and therefore must be supplied in the diet for adults and in particular for infants and children. Lysine is an essential amino acid synthesized via the aspartic acid metabolic pathway, in which threonine, methionine and isoleucine are also endproducts. Moreover, lysine is the first limiting amino acid in all cereal grains. For over 30 years, the aspartic acid metabolic pathway has been studied in higher plants with the aim of identifying and characterizing the key regulatory points controlling the biosynthetic pathway. Two clear distinct time periods, one beginning with the development of tissue culture techniques (1970-80's) and the second with the development of plant transformation techniques (90's), has encouraged the production of biochemical mutants and transgenic plants with specific alterations in key enzymes of the pathway, leading to the overproduction and accumulation of threonine in all plant tissues. However, the accumulation of lysine in seeds has been particularly difficult to achieve. Such an observation, associated with the recent biochemical studies on lysine degradation in cereal and legume plant species, has indicated that the manipulation of lysine degradation is as important as the manipulation of lysine synthesis, if the goal of accumulating this amino acid in cereal seeds is to be achieved. In maize, the study and use of other mutants such as the opaque-2 and QPM (Quality Protein Maize) varieties, has contributed significantly to our understanding of the regulatory aspects of the aspartate pathway. The strategies of obtaining cereals rich in lysine and their relevance to the manipulation of other amino acids have been discussed.

Key words: lysine, nutrition, essential amino acids, cereal crops

Aminoácidos, proteínas e nutrição

O valor nutritivo de uma proteína está estreitamente relacionado à proporção de aminoácidos que a compõem. Alguns destes devem ser fornecidos por meio da dieta aos organismos adultos, aos jovens em crescimento ou a ambos, uma vez não têm a capacidade de sintetizá-los. Para o ser humano adulto, são essenciais os seguintes

aminoácidos: isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, enquanto para crianças, além destes é necessária a histidina, existindo algumas evidências de que também o seja para o indivíduo adulto (Lajolo & Tirapegui, 1998). As quantidades relativas de aminoácidos presentes nas proteínas ingeridas devem ser próximas aos requerimentos do organismo em questão. Por

outro lado, quando a ingestão de carboidratos é baixa, a quantidade de proteína utilizada pelo organismo para fins anabólicos reduz-se, sendo desviada para a produção de energia. Torna-se relevante portanto, integrar as informações relativas à qualidade e quantidade da proteína ingerida com as do valor energético total da dieta (Angelis, 1986).

As proteínas da dieta devem ter uma composição adequada para que substituam satisfatoriamente as proteínas degradadas no catabolismo. Entretanto, com exceção do leite materno para os recém nascidos, os demais alimentos são relativamente incompletos para satisfazer as necessidades nutricionais da espécie humana. Em geral, as proteínas de origem animal têm valor biológico mais elevado que as de origem vegetal e ainda, a digestibilidade das proteínas vegetais é baixa, quando comparada às de origem animal (Sgarbieri, 1987).

Em termos protéicos, entretanto, não só a falta, mas também o excesso de um ou mais aminoácidos pode ser prejudicial. Assim, o valor de uma proteína pode ser limitado não apenas por deficiências de aminoácidos como pelo excesso, parecendo ser esse o caso do milho que tem elevado valor de leucina (Oliveira et al., 1982).

Entre os casos patológicos por desequilíbrio de aminoácidos cita-se na literatura clínica infantil, correlação com distúrbios mentais (fenilalanina, histidina, valina) assim como alterações morfológicas no sistema nervoso os quais estariam associados a deficiências protéicas. A falta de lisina e triptofano, associada ao excesso de leucina (proteína do milho comum) proporciona crescimento mais lento em ratos quando comparado ao milho comum suplementado com os aminoácidos limitantes lisina e triptofano até o teor contido no milho opaco-2. Contudo, a dieta com proteínas do milho comum adicionada destes suplementos não atinge o nível de crescimento dos animais alimentados com a própria variedade de milho opaco-2. Além do mais, quando o milho opaco-2 é suplementado com leucina no nível presente em milho comum, o ritmo de crescimento dos animais diminui até o nível do milho comum suplementado com lisina e triptofano, indicando que o excesso de leucina é prejudicial ao crescimento (Angelis, 1986).

A combinação de alimentos específicos também pode contribuir para que a mistura de suas proteínas numa mesma refeição faça com que as deficiências de aminoácidos em uma delas seja complementada pelos excessos destes em outras, obtendo-se eventualmente um valor nutritivo superior ao de cada integrante, isoladamente. Neste sentido, pode-se combinar cereais, deficientes em lisina (mais treonina ou triptofano) e excesso de sulfurados, com leguminosas, deficientes em sulfurados, mas contendo excesso de lisina. Por outro lado, cerca de dois terços da população mundial ainda utilizam essencialmente arroz, milho, trigo e mandioca como fonte principal de proteínas, sendo aquela de origem animal ainda limitada.

No caso de animais ruminantes, por serem poligástricos, as diferentes fontes protéicas apresentam

valor biológico equivalente, pois após a ingestão e fermentação irão formar as proteínas dos microrganismos as quais são, de fato, a fonte protéica para o animal.

Finalmente, o valor biológico de uma proteína também é afetado pelo método de preparação dos alimentos sendo a lisina bastante comprometida nas reações que ocorrem entre as funções redutoras dos glicídios e os grupos $-NH_2$ das proteínas. De fato, principalmente em alimentos de origem vegetal, ocorrem interações que podem diminuir a digestibilidade de suas proteínas bem como sua biodisponibilidade. Isto deve-se à presença nesses alimentos de substâncias fenólicas e substâncias aldeídicas e cetônicas (açúcares redutores, produtos de degradação de ácidos graxos insaturados).

As proteínas destacam-se na hierarquia bioquímica que mantém a homeostase do organismo vivo, não apenas por suas funções de sustentação de órgãos e tecidos, como por sua atuação como hormônios protéicos e enzimas, relacionadas a quase todas as etapas do metabolismo. Assim, entre os grupos de substâncias associados à alimentação e nutrição, a carência de proteínas reflete-se mais intensamente sobre o equilíbrio dinâmico do metabolismo que outros grupos integrantes da alimentação de seres humanos e animais. Isto torna-se mais evidente em estados de carência, que persistindo por certo período compromete o indivíduo levando a danos irreversíveis (Angelis, 1986; Azevedo et al., 1997).

Nesse contexto, destaca-se a importância de se obter, via melhoramento genético, cereais com conteúdo de aminoácidos mais adequados aos requisitos nutricionais da espécie humana.

Regulação da biossíntese de lisina

A regulação da biossíntese de alguns aminoácidos por retro-inibição tem sido demonstrada previamente em bactérias e plantas superiores (Lea et al., 1992). Os aminoácidos essenciais lisina, treonina, metionina e isoleucina são sintetizados em uma mesma via metabólica a partir de um precursor comum, o ácido aspártico (Azevedo et al., 1997). A deficiência dos cereais, primariamente em lisina e em escala menor, em outros aminoácidos, é fator extremamente preocupante visto que este grupo vegetal representa cerca de 70% da matéria seca produzida e cerca de 73% da proteína vegetal consumida, tanto na alimentação humana como na alimentação animal (FAO, 1991). Estudos bioquímicos, genéticos e moleculares contribuíram consideravelmente para o conhecimento dos aspectos regulatórios da via do ácido aspártico (Figura 1), mostrando que as enzimas chave são positiva ou negativamente reguladas por retroinibição (Azevedo et al., 1997). Dentre estas enzimas, os papéis da aspartato quinase (AK), homoserina desidrogenase (HSDH) e dihidropicolinato sintase (DHDPS) foram investigados em detalhes e mostraram ser os principais pontos de controle de fluxo de carbono da via.

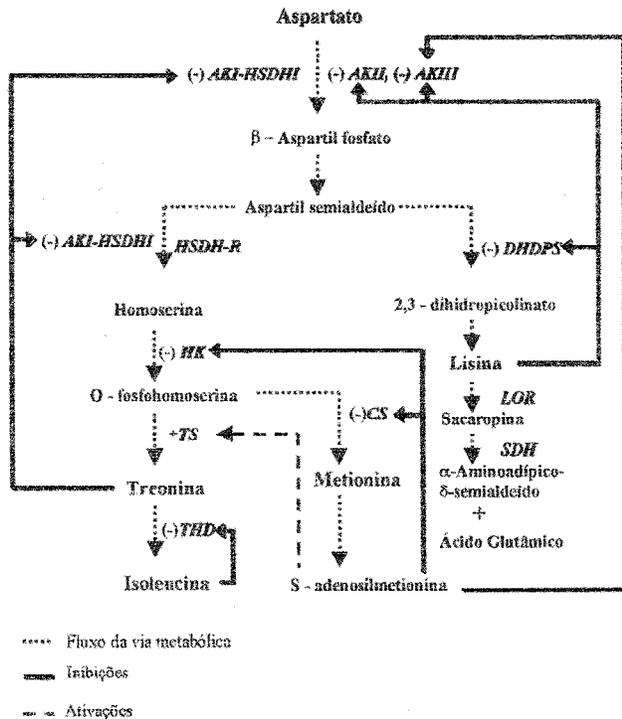


Figura 1 - Vias do ácido aspártico e de degradação da lisina em plantas superiores. Os pontos regulatórios estão indicados como (-) para retro-inibição ou repressão e (+) para ativação enzimática. AKII e AKIII, isoenzimas da aspartato quinase sensíveis a inibição por retro-inibição pela lisina e SAM + lisina; AKI-HSDHI, isoenzima bifuncional da aspartato quinase-homoserina desidrogenase sensível a treonina em ambos domínios catalíticos; HSDH-R, dihidrodipicolinato sintase sensível a lisina; CS, cistationina γ -sintase reprimida por SAM; TS, treonina sintase ativada por SAM; THD, treonina desidratase sensível a inibição por isoleucina; LOR-SDH, enzima bifuncional lisina 2-oxoglutarato redutase-sacaropina desidrogenase.

A primeira enzima da via, a AK, que converte o ácido aspártico em β -aspartil fosfato, foi bem caracterizada em plantas superiores, incluindo arroz, cevada, milho e tabaco (Azevedo et al., 1992a; Frankard et al., 1992; Lea et al., 1992; Teixeira et al., 1998). Duas classes de isoenzimas da AK que podem ser inibidas por lisina ou por treonina foram observadas em plantas (Azevedo et al., 1992a; Lea et al., 1992; Heremans & Jacobs, 1995; Teixeira et al., 1998). Estudos bioquímicos com mutantes têm mostrado que até duas isoenzimas sensíveis a lisina podem estar presentes (Azevedo et al., 1997). A sensibilidade à lisina é sinergisticamente aumentada na presença de S-adenosilmetionina (SAM) (Rognes et al., 1980) que pode também sozinha inibir a atividade da AK ou até, curiosamente, estimular a atividade da AK de *Arabidopsis* em concentrações mais altas (Heremans & Jacobs, 1995). A isoenzima da AK sensível a inibição pela treonina normalmente não é a forma predominante com exceção apenas de *Coix lacryma-jobi* e de soja (Matthews & Widholm, 1979; Lugli & Azevedo, 1999).

Apesar do avanço dos estudos bioquímicos, apenas recentemente a clonagem de genes que codificam as isoenzimas da AK foi relatada (Azevedo et al., 1997). Um clone de cDNA que codifica uma AK monofuncional de *Arabidopsis* sensível a lisina foi isolado por dois grupos separadamente (Frankard et al., 1997; Tang et al., 1997). A análise molecular evidenciou uma alta expressão em folhas e órgãos florais (Tang et al., 1997). No caso de milho, o gene *ask1* que codifica uma AK monofuncional sensível a lisina foi mapeado no cromossomo 7 estando ligado ao gene *opaco-2* (Azevedo et al., 1990).

Um aspecto dos estudos regulatórios para AK e que vem causando controvérsia é um possível papel regulatório do cálcio e da calmodulina. O Ca^{2+} é conhecido por modular a atividade de várias enzimas (Pandey & Sopory, 1998) sendo também um importante mensageiro em transdução de sinal em plantas (Snedden & Fromm, 1998). A calmodulina é um importante componente na regulação de complexos de quinases interagindo com vários tipos de moléculas efetoras (Soderling, 1999). Alguns trabalhos têm sugerido a estimulação das isoenzimas de AK por Ca^{2+} e a participação da calmodulina como uma das subunidades da holoenzima (Kochhar et al., 1998). Por outro lado, vários outros trabalhos não encontraram qualquer evidência para apoiar tal papel regulatório para o Ca^{2+} ou para a calmodulina (Bonner et al., 1986; Azevedo et al., 1992c; Lugli et al., 2000).

A enzima HSDH, que catalisa a redução do aspartato semialdeído em homoserina, está presente em plantas na forma de isoenzimas, uma resistente (HSDH-R) a inibição pela treonina e a outra sensível (HSDH-S) (Azevedo et al., 1997). Por meio de análises bioquímicas e moleculares, observou-se que a isoenzima sensível a treonina é na realidade parte de um polipeptídeo bifuncional que contém também a atividade de AK sensível a treonina (Wilson & Gray, 1991; Azevedo et al., 1992b). Desde então, a existência deste polipeptídeo foi observada em todas as espécies estudadas (Azevedo et al., 1997). Genes que codificam para a enzima bifuncional AK-HSDH têm sido isolados e estudados em várias espécies de plantas (Azevedo et al., 1997). A expressão do gene que codifica a AK-HSDH de tabaco mostrou estar sujeita a regulação espacial e temporal em tecidos vegetativos, flores e sementes em desenvolvimento (Zhu-Shimoni et al., 1997).

No ramo da via do ácido aspártico que leva à biossíntese de lisina, a enzima DHDPS, que catalisa a fusão do piruvato e aspartato semialdeído em dihidrodipicolinato, apresenta papel chave na regulação, tendo sido purificada e caracterizada em várias espécies de plantas (Azevedo et al., 1997) ocorrendo em apenas uma forma, fortemente inibida por baixas concentrações de lisina (Wallsgrave & Mazelis, 1981). Clones de cDNA codificando DHDPS foram isolados de várias espécies de plantas (Azevedo et al., 1997). O gene da DHDPS de milho foi submetido a mutagenese dirigida e mostrou que substituições simples de aminoácidos nas posições 157, 162 e 166 eliminaram a sensibilidade da enzima a inibição pela lisina (Shaver et al., 1996).

Regulação da degradação de lisina

O catabolismo da lisina foi pela primeira vez demonstrado em plantas em experimentos utilizando lisina- C^{14} com a radioatividade sendo incorporada ao aminoácido semialdeído e ao glutamato, indicando a degradação da lisina via sacaropina (Figura 1) (Brandt, 1975; Sodek & Wilson, 1970).

Apesar dos avanços nos estudos da biossíntese de lisina, pouco ainda é conhecido do seu catabolismo. Estudos recentes têm fortemente indicado que o catabolismo da lisina tem um papel importante na acumulação deste aminoácido em sementes. Em milho, os primeiros estudos com enzimas do catabolismo da lisina sugeriram que o catabolismo é um dos mecanismos que controlam a concentração da lisina solúvel no endosperma (Arruda et al., 1982). A quantidade de lisina que é translocada para o endosperma em desenvolvimento, para a síntese de proteínas de reserva é 2-3 vezes mais alta do que seria necessária (Arruda & da Silva, 1983). Conseqüentemente, seria esperado que houvesse acúmulo de lisina. Contudo, este não foi o caso, pois a concentração de lisina durante o desenvolvimento do endosperma manteve-se baixa, provavelmente para não inibir a AK e conseqüentemente a biossíntese de metionina (Figura 1).

O catabolismo da lisina é regulado pela ação de duas enzimas: a lisina 2-oxoglutarato redutase (LOR) (também denominada lisina α -cetoglutarato redutase, LKR), que condensa a lisina e o 2-oxoglutarato a sacaropina, e a sacaropina desidrogenase (SDH), que catalisa a hidrólise da sacaropina em aminoácido semialdeído e glutamato. Estas enzimas têm sido isoladas e caracterizadas em detalhe em milho (Gonçalves-Butruille et al., 1996), arroz (Gaziola et al., 1997) e feijão (Lima, 1999). De forma similar ao observado em mamíferos, as atividades da LOR e SDH também fazem parte de um mesmo polipeptídeo bifuncional (Gonçalves-Butruille et al., 1996; Gaziola et al., 1997; Tang et al., 1997; Lima, 1999). No caso de cereais, LOR e SDH mostraram ser específicas do endosperma, apresentando massas moleculares da holoenzima entre 200 e 260 kDa (Gonçalves-Butruille et al., 1996; Gaziola et al., 1997).

Recentemente também foi demonstrado em plantas que as atividades de LOR-SDH são afetadas diferentemente por Ca^{2+} , força iônica e fosforilação (Karchi et al., 1995; Miron et al., 1997; Kemper et al., 1998; Gaziola et al., 2000). A atividade de LOR de milho mostrou ser modulada por Ca^{2+} enquanto que a atividade de SDH não o foi (Kemper et al., 1998). O aumento de atividade de LOR dependente de Ca^{2+} pode ser inibido por EGTA e antagonistas de calmodulina, contudo não foi observada a ligação de calmodulina no domínio LOR (Kemper et al., 1998). Estes resultados foram também observados para a LOR-SDH de arroz (Gaziola et al., 2000). Também para força iônica foi observado que a atividade de LOR

foi estimulada, enquanto que a atividade de SDH permaneceu inalterada, tanto em milho (Kemper et al., 1998) como em arroz (Gaziola et al., 2000). No caso das enzimas de tabaco e soja, a atividade de LOR mostrou ser modulada por fosforilação, mas não a atividade de SDH (Karchi et al., 1995; Miron et al., 1997). A autoregulação por lisina e fosforilação da atividade de LOR também foi observada em milho (Kemper et al., 1999).

Sequências genômicas e de cDNA de LOR-SDH foram isoladas e revelaram um domínio amina correspondente a LOR e um domínio carboxila para SDH (Epelbaum et al., 1997). No caso de milho, a expressão do gene *ZLKRSDH* mostrou-se reduzida em aproximadamente 90% em sementes opaco-2 (Kemper et al., 1999). A redução da atividade de LOR-SDH entre 2-18 vezes em comparação com o tipo normal, também foi demonstrada no mutante opaco-2 e em tipos QPM (Quality Protein Maize) (Brochetto-Braga et al., 1992; Gaziola et al., 1999).

O efeito de um análogo de lisina, a aminoetilcisteína (AEC), e da SAM foram testados na atividade de LOR-SDH de arroz (Gaziola et al., 2000). A AEC mostrou substituir a lisina como substrato da LOR, mas menos efetivamente que a lisina, não confirmando resultados anteriores para a LOR de milho (Brochetto-Braga et al., 1992). A AEC ainda foi capaz de inibir a atividade de LOR, possivelmente refletindo uma capacidade mais baixa de conversão a sacaropina com a AEC como substrato, comparado à lisina como substrato (Gaziola et al., 2000). Como mencionado anteriormente, a SAM inibe a AK sensível a lisina, assim como estimula a biossíntese de treonina pela indução da atividade de treonina sintase (TS) (Laber et al., 1999). Em arroz, foi demonstrado que a SAM não afeta as atividades de LOR-SDH, indicando que apesar de atuar na regulação da biossíntese de lisina, a SAM não apresenta nenhum aspecto regulatório no catabolismo (Gaziola et al., 2000).

Mutantes bioquímicos e plantas transgênicas

Melhorar o valor nutritivo dos vegetais vem sendo, há algum tempo, um ponto de consenso entre pesquisadores. Muitas estratégias foram idealizadas com o intuito de produzir cereais com sementes acumulando lisina. Quatro estratégias principais têm sido adotadas: melhoramento genético convencional, identificação de mutantes espontâneos em populações naturais, indução de mutantes bioquímicos e produção de plantas transgênicas.

Pelo melhoramento genético convencional, genótipos de milho têm sido selecionados apresentando variabilidade para a concentração de lisina (Paez et al., 1969; Zuber et al., 1975; Moro et al., 1996). Esta técnica, no entanto, é mais difícil que outras atualmente disponíveis e requer um longo tempo para se atingir algum progresso.

O isolamento de mutantes naturais apresentou-se como uma primeira alternativa de progresso significativo. A identificação do mutante opaco-2 (*o2*) de milho (Mertz et al., 1964) e do mutante de cevada Hiproly (*lys1*) para alta lisina (Munck, 1992) foi uma descoberta importante que traçou rumos de pesquisas desde então. Contudo, após a euforia inicial devida à alta concentração de lisina dos mutantes, seguiu-se um grande desapontamento pela associação nestes mutantes, de características agrônômicas indesejáveis como queda de produção e alta susceptibilidade a patógenos. Apesar disto, em anos recentes, a descoberta de genes modificadores que induzem mudanças pronunciadas no fenótipo do grão, mantendo o valor nutritivo do opaco-2, foi um fato marcante (Vasal, 1994). Os programas de melhoramento resultaram na liberação dos "Quality Protein Maize" (QPM) que estão disponíveis no mercado de sementes, tendo sua área de produção aumentada nos últimos anos.

O extenso estudo enzimológico da via do ácido aspártico apresentou evidências diretas de regulação por retro-inibição em seus passos chave. A possibilidade de seleção de mutantes bioquímicos caracterizou-se como mais uma ferramenta importante a contribuir para o entendimento da regulação da via. Vários estudos demonstraram que estes mutantes apresentam enzimas alteradas na sua sensibilidade à retro-inibição, podendo exibir aumentos nos aminoácidos produtos-finais. Estes mutantes foram obtidos pela utilização de mutagênese de sementes ou de células *in vitro* que foram então submetidas ao processo de seleção em meio contendo esses aminoácidos ou seus análogos (Lea et al., 1992).

Em milho, Hibberd & Green (1982) selecionaram mutantes resistentes a inibição por lisina + treonina. Estes mutantes apresentaram no endosperma altas concentrações de treonina, mas não de lisina. Os genes denominados de *ask1* e *ask2* codificam isoenzimas da AK sensíveis a lisina e que nestes mutantes estavam insensíveis à inibição (Dotson et al., 1990). O duplo mutante *Ask1/opaco-2* exibiu um efeito sinérgico no aumento de treonina (144 vezes), na concentração total de aminoácidos solúveis (3 vezes) e na concentração das proteínas de reserva do endosperma (Azevedo et al., 1990). Análises posteriores sugeriram que o gene *opaco-2* possa ter um papel regulatório sob o gene *ask1* (Brennecke et al., 1996; Gaziola et al., 1999).

Assim como no caso de milho, outros mutantes em outras espécies demonstraram resultados similares (Azevedo et al., 1997). Tais resultados sugeriram que o ponto regulado pela DHDPS deveria ser fundamental para o acúmulo de lisina nos mutantes, visto que esta enzima também é inibida por lisina e que nos mutantes permanecia sensível. Desta forma, mutantes para a DHDPS foram obtidos em algumas espécies, mas apesar da enzima estar insensível a inibição pela lisina, acúmulo deste aminoácido foi observado em folhas, mas não no

endosperma (Frankard et al., 1992; Heremans & Jacobs, 1994; Azevedo & Arruda, 1995).

Baseado nesta idéia geral de selecionar mutantes para a AK e a DHDPS e com o desenvolvimento das técnicas de transformação, plantas transgênicas expressando AK e DHDPS insensíveis a inibição pela lisina foram produzidas inicialmente em tabaco (Shaul & Galili, 1992a; 1992b). Em um primeiro momento, uma AK insensível a inibição pela lisina de *E. coli* foi utilizada na transformação (Shaul & Galili, 1992a) e em outro grupo de transformantes, a DHDPS de *E. coli* foi utilizada, sendo esta, naturalmente, cerca de 50 vezes mais resistente a inibição pela lisina (Shaul & Galili, 1992b). Os resultados observados para tabaco foram idênticos àqueles observados para os mutantes bioquímicos, ou sejam, acúmulo de treonina em todos os tecidos da planta transformada com AK e acúmulo de lisina nas folhas de plantas transformadas com DHDPS.

Utilizando estratégia similar, obteve-se super-produção e acúmulo de lisina em cevada (Brinch-Pedersen et al., 1996), canola (Falco et al., 1995) e soja (Falco et al., 1995). No caso de canola e soja, o acúmulo de lisina foi observado também em sementes assim como o de ácido amino adípico em canola e de sacaropina em soja (Falco et al., 1995).

Em geral, pode-se obter a super-produção de lisina pela alteração da sensibilidade da DHDPS a lisina (Bittel et al., 1996), mas o acúmulo em sementes de cereais parece depender de manipulações envolvendo também a via de degradação da lisina, via LOR e/ou SDH. A favor desta hipótese, destacam-se cinco aspectos principais: (1) Todos os mutantes bioquímicos e plantas transgênicas não apresentaram acúmulo significativo de lisina nas sementes, mas apenas em outros tecidos. (2) Apenas em cereais as enzimas da degradação, LOR e SDH, são específicas do endosperma. (3) O mutante opaco-2 de milho, que apresenta alta concentração de lisina solúvel e protéica nas sementes, apresenta as atividades de LOR e SDH muitas vezes reduzidas em relação ao tipo selvagem (normal) (Brochetto-Braga et al., 1992; Gaziola et al., 1999; Kemper et al., 1999). (4) Constatou-se acúmulo de intermediários do catabolismo de lisina nas sementes de soja e canola transgênicas superprodutoras de lisina (Falco et al., 1995). (5) Entre os cereais, apesar da concentração de lisina ainda ser abaixo do recomendado pela FAO (1991), o arroz destaca-se por apresentar uma concentração mais alta de lisina na semente, o que pode ser explicado pela constatação de atividades mais baixas de LOR e SDH nesta planta (Gaziola et al., 1997). Além disto, em feijão, as atividades de LOR e SDH mostraram ser cerca de 10 vezes mais baixas que no endosperma de milho (Lima, 1999).

Ao contrário do que ocorre com a lisina, a superprodução e acúmulo de treonina podem ser obtidos alterando-se apenas a AK, sugerindo que o controle da concentração deste aminoácido, pela sua via de degradação, não é rigoroso.

CONCLUSÕES

Existem evidências substanciais de que a enzima DHDPS exerce controle sobre a via de biossíntese da lisina em plantas superiores. Contudo, não se tem obtido o seu acúmulo em sementes de cereais, muito provavelmente devido à indução de uma via de degradação de lisina pela ação das atividades da LOR-SDH, que são específicas da semente neste grupo vegetal. A regulação desta via de degradação é um processo dependente de modulação por cálcio, força iônica e fosforilação/desfosforilação. Ainda permanece em aberto a questão da possibilidade desse mecanismo ser controlado para permitir a produção de culturas contendo altas concentrações de lisina na semente. Por outro lado, as manipulações para o acúmulo de lisina e treonina em tecidos como folhas, possivelmente ainda poderão ser aplicadas a culturas utilizadas como forrageiras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGELIS, R.C. **Fisiologia da Nutrição**. São Paulo: Nobel, 1986. 320p.
- ARRUDA, P.; SODEK, L.; SILVA W.J. Lysine-ketoglutarate reductase activity in developing maize endosperm. **Plant Physiology**, v.69, p.988-989, 1982.
- ARRUDA, P.; DA SILVA W.J. Lysine-ketoglutarate reductase-activity in maize – Its possible role in lysine metabolism of developing endosperm. **Phytochemistry**, v.22, p.2687-2689, 1983.
- AZEVEDO, R.A.; ARANA, J.L.; ARRUDA, P. Biochemical genetics of the interaction of the lysine plus threonine resistant mutant *Ltr*19* with *opaque-2* maize mutant. **Plant Science**, v.70, p.81-90, 1990.
- AZEVEDO, R.A.; ARRUDA, P. Dominant and recessive mutations conferring resistance to S-2-aminoethyl-L-cysteine in maize. **Journal of Plant Physiology**, v.145, p.321-326, 1995.
- AZEVEDO, R.A.; ARRUDA, P.; TURNER, W.L.; LEA, P.J. The biosynthesis and metabolism of the aspartate derived amino acids in higher plants. **Phytochemistry**, v.46, p.395-419, 1997.
- AZEVEDO, R.A.; BLACKWELL, R.D.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Three aspartate kinase isoenzymes from maize. **Phytochemistry**, v.31, p.3725-3730, 1992a.
- AZEVEDO, R.A.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Aspects of aspartate kinase regulation in maize: co-purification of aspartate kinase and homoserine dehydrogenase sensitive to threonine. **Phytochemistry**, v.31, p.3731-3734, 1992b.
- AZEVEDO, R.A.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Aspartate kinase regulation in maize: regulation by calcium and calmodulin. **Phytochemistry**, v.31, p.3735-3737, 1992c.
- BITTEL, D.C.; SHAVER, J.M.; SOMERS, D.A.; GENGENBACH, B.G. Lysine accumulation in maize cell cultures transformed with a lysine-insensitive form of maize dihydrodipicolinate synthase. **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, p.70-77, 1996.
- BONNER, P.L.R.; HETHERINGTON, A.M.; LEA, P.J. Lysine-sensitive plant aspartate kinase is not regulated by calcium or calmodulin. **FEBS Letters**, v.195, p.119-121, 1986.
- BRANDT, A.B. In vivo incorporation of lysine-C¹⁴ into the endosperm proteins of wild type and high lysine barley. **FEBS Letters**, v.52, p.288-291, 1975.
- BRENNECKE, K.; SOUZA-NETO, A.J.; LUGLI, J.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Aspartate kinase in the maize mutants *Ask1-LT19* and *opaque-2*. **Phytochemistry**, v.41, p.707-712, 1996.
- BRINCH-PEDERSEN, H.; GALILI, G.; KNUDSEN, S.; HOLM, P.B. Engineering of the aspartate family biosynthetic pathway in barley (*Hordeum vulgare* L.) by transformation with heterologous genes encoding feed-back-insensitive aspartate kinase and dihydrodipicolinate synthase. **Plant Molecular Biology**, v.32, p.611-620, 1996.
- BROCHETTO-BRAGA, M.R.; LEITE, A.; ARRUDA, P. Partial purification and characterization of lysine-oxoglutarate reductase activity in normal and opaque-2 maize endosperms. **Plant Physiology**, v.98, p.1139-1147, 1992.
- DOTSON, S.B.; FRISCH, D.A.; SOMERS, D.A.; GENGENBACH, B.G. Lysine insensitive aspartate kinase in two-overproducing mutants of maize. **Planta**, v.182, p.546-552, 1990.
- EPELBAUM, S.; McDEVITT, R.; FALCO, S.C. Lysine-ketoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*: nucleotide sequence and characterization. **Plant Molecular Biology**, v.35, p.735-748, 1997.
- FALCO, S.C.; GUIDA, T.; LOCKE, M.; MAUVAIS, J.; SANDERS, C.; WARD, R.T.; WEBER, P. Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. **Bio-Technology**, v.13, p.577-582, 1995.
- FAO/WHO. **Protein quality evaluation Report of Joint FAO/WHO**. Rome: FAO, 1991. (Expert Consultation FAO Food and Nutrition Paper S1)
- FRANKARD, V.; GHISLAIN, M.; JACOBS, M. Two feedback-insensitive enzymes of the aspartate pathway in *Nicotiana sylvestris*. **Plant Physiology**, v.99, p.1285-1293, 1992.
- FRANKARD, V.; VAUTERIN, M.; JACOBS, M. Molecular characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA coding for a monofunctional aspartate kinase. **Plant Molecular Biology**, v.34, p.233-242, 1997.
- GAZIOLA, S.A.; ALESSI, E.S.; GUIMARÃES, P.E.O.; DAMERVAL, C.; AZEVEDO, R.A. Quality protein maize: a biochemical study of enzymes involved in lysine metabolism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.1268-1275, 1999.
- GAZIOLA, S.A.; SODEK, L.; ARRUDA, P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Degradation of lysine in rice seeds: effect of calcium, ionic strength, S-adenosylmethionine and S-2-aminoethyl-L-cysteine on lysine 2-oxoglutarate reductase-saccharopine dehydrogenase bifunctional enzyme. **Physiologia Plantarum**, v.110, p.164-171, 2000.
- GAZIOLA, S.A.; TEIXEIRA, C.M.G.; LUGLI, J.; SODEK, L.; AZEVEDO, R.A. The enzymology of lysine catabolism in rice seeds. Isolation, characterization, and regulatory properties of a lysine 2-oxoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase bifunctional polypeptide. **European Journal of Biochemistry**, v.247, p.364-371, 1997.
- GONÇALVES-BUTRUILLE, M.; SZAJNER, P.; TORIGOI, E.; LEITE, A.; ARRUDA, P. Purification and characterization of the bifunctional enzyme lysine-ketoglutarate reductase-saccharopine dehydrogenase from maize. **Plant Physiology**, v.110, p.765-771, 1996.
- HEREMANS, B.; JACOBS, M. Selection of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Mutants resistant to aspartate-derived amino acids and analogues. **Plant Science**, v.101, p.151-162, 1994.
- HEREMANS, B.; JACOBS, M. Threonine accumulation in a mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. With an altered aspartate kinase. **Journal of Plant Physiology**, v.146, p.249-257, 1995.
- HIBBERD, K.A.; GREEN, C.E. Inheritance and expression of lysine plus threonine resistance selected in maize tissue culture. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.79, p.559-563, 1982.

- KARCHI, H.; MIRON, D.; BENYAACOV, S.; GALILI, G. The lysine-dependent stimulation of lysine catabolism in tobacco seed requires calcium and protein-phosphorylation. **The Plant Cell**, v.7, p.1963-1970, 1995.
- KEMPER, E.L.; CORD-NETO, G.; CAPELLA, A.N.; GONÇALVES-BUTRUILLE, M.; AZEVEDO, R.A.; ARRUDA, P. Structure and regulation of the bifunctional enzyme lysine-oxoglutarate reductase-saccharopine dehydrogenase in maize. **European Journal of Biochemistry**, v.253, p.720-729, 1998.
- KEMPER, E.L.; CORD-NETO, G.; PAGES, F.; MARTINEZ MORAES, K.C.; LEITE, A.; ARRUDA, P. The role of opaque-2 on the control of lysine degrading activities in developing maize endosperm. **The Plant Cell**, v.11, p.1981-1994, 1999.
- KOCHHAR, S.; KOCHHAR, V.K.; SANE, P.V. Subunit structure of lysine sensitive aspartate kinase from spinach leaves. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v.44, p.795-806, 1998.
- LABER, B.; MAURER, W.; HANKE, C.; GRAFE, S.; EHLER, S.; MESSERSCHMIDT, A.; CLAUSEN, T. Characterization of recombinant *Arabidopsis thaliana* threonine synthase. **European Journal of Biochemistry**, v.263, p.212-221, 1999.
- LAJOLO, F.M.; TIRAPEGUI, J. **Proteínas e aminoácidos**. In: OLIVEIRA, J.E.D.; MARCHINI, J.S. **Ciências nutricionais**. São Paulo: Sarvier, 1998. 403p.
- LEA, P.J.; BLACKWELL, R.D.; AZEVEDO, R.A. Analysis of barley metabolism using mutant genes. In: SHEWRY, P.R. (Ed) **Barley: genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology**. Wallingford: CAB International, 1992. p.181-208.
- LIMA, S.T.C. Caracterização da enzima lisina cetoglutarato redutase (LKR)/sacaropina desidrogenase (SDH) estudada em *Phaseolus vulgaris*. Campinas, 1999. 91p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
- LUGLI, J.; AZEVEDO, R.A. Aspartate kinase isoenzymes of rice are not modulated by calcium or calmodulin. **Amino Acids**, v.17, p.102, 1999. /Resumo/
- LUGLI, J.; GAZIOLA, S.A.; AZEVEDO, R.A. Effects of calcium, S-adenosylmethionine, S-(2-aminoethyl)-L-cysteine, methionine, valine and salt concentration on rice aspartate kinase isoenzymes. **Plant Science**, v.150, p.51-58, 2000.
- MATTHEWS, B.F.; WIDHOLM, J.M. Expression of aspartokinase, dihydrodipicolinate synthase and homoserine dehydrogenase during growth of carrot (*Daucus carota* cultivar Danvars) cell suspension culture on lysine-supplemented and threonine supplement media. **Zeitschrift für Naturforsch**, v.34, p.1177-1185, 1979.
- MERTZ, E.T.; BATES, L.S.; NELSON, O.E. Mutant gene that changes protein composition and increase lysine content of maize endosperm. **Science**, v.145, p.279-280, 1964.
- MIRON, D.; Bem-YAACOV, S.; KARCHI, H.; GALILI, G. *In vitro* dephosphorylation inhibits the activity of soybean lysine-oxoglutarate reductase in a lysine-regulated manner. **Plant Journal**, v.12, p.1453-1458, 1997.
- MORO, G.L.; HABBEN, J.E.; HAMAKER, B.R.; LARKINS, B.A. Characterization of the variability in lysine content for normal and opaque-2 maize endosperm. **Crop Science**, v.36, p.1651-1659, 1996.
- MUNCK, L. The case of high-lysine barley breeding. In: SHEWRY, P.R. (Ed.) **Barley: genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology**. Wallingford: CAB International, 1992. P.573-601.
- OLIVEIRA, J.E.D.; SANTOS, A.C.; WILSON, E.D. **Nutrição básica**. São Paulo: Sarvier, 1982. 286p.
- PAEZ, A.V.; USSARY, J.P.; HELM, J.L.; ZUBER, M.S. Survey of maize strains for lysine content. **Agronomy Journal**, v.61, p.896-899, 1969.
- PANDEY, S.; SOPORY, S.K. Biochemical evidence for a calmodulin-stimulated calcium dependent protein kinase in maize. **European Journal of Biochemistry**, v.255, p.718-726, 1998.
- ROGNES, S.E.; LEA, P.J.; MIFLIN, B.J. S-adenosylmethionine - a novel regulator of aspartate kinase. **Nature**, v.287, p.357-359, 1980.
- SGARBIERI, V.C. **Alimentação e nutrição: fator de saúde e desenvolvimento**. Campinas: UNICAMP, 1987. 387p.
- SHAVER, J.M.; BITTEL, D.C.; SELLNER, J.M.; FRISCH, D.A.; SOMERS, D.A.; GENGENBACH, B.G. Single amino acid substitutions eliminate lysine inhibition of maize dihydrodipicolinate synthase. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.93, p.1962-1966, 1996.
- SHAUL, O.; GALILI, G. Increased lysine synthesis in tobacco plants that express high levels of bacterial dihydrodipicolinate synthase in their chloroplasts. **Plant Journal**, v.2, p.203-209, 1992a.
- SHAUL, O.; GALILI, G. Threonine overproduction in transgenic tobacco plants expressing a mutant desensitized aspartate kinase of *Escherichia coli*. **Plant Physiology**, v.100, p.1157-1163, 1992b.
- SNEDDEN, W.A.; FROMM, H. Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment. **Trends in Plant Science**, v.3, p.299-304, 1998.
- SODEK, L.; WILSON, C.M. Incorporation of leucine-C¹⁴ into protein in the developing of normal and opaque-2 corn. **Archives of Biochemistry et Biophysics**, v.140, p.29-38, 1970.
- SODERLING, T.R. Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase cascade. **Trends in Biochemical Science**, v.24, p.232-236, 1999.
- TANG, G.; MIRON, D.; ZHU-SHIMONI, J.X.; GALILI, G. Regulation of lysine catabolism through lysine-oxoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v.9, p.1305-1316, 1997.
- TEIXEIRA, C.M.G.; GAZIOLA, S.A.; LUGLI, J.; AZEVEDO, R.A. Isolation, partial purification and characterization of aspartate kinase isoenzymes from rice seeds. **Journal of Plant Physiology**, v.153, p.281-289, 1998.
- VASAL, S.K. High quality protein corn. In: HALLAWER, A.R. (Ed.) **Specialty corns**. CRC Press, 1994. P.79-120.
- WALLSGROVE, R.M.; MAZELIS, M. Spinach leaf dihydrodipicolinate synthase: partial purification and characterization. **Phytochemistry**, v.20, p.2651-2655, 1981.
- WILSON, B.J.; GRAY A.C. Matthews BF Bifunctional protein in carrot contains both aspartokinase and homoserine dehydrogenase activities **Plant Physiology**, v.97, p.1323-1328, 1991.
- ZHU-SHIMONI, J.X.; LEV YADUM, S.; MATTHEWS, B.; GALILI, G. Expression of na aspartate kinase homoserine dehydrogenase gene is subject to specific spatial and temporal regulation in vegetative tissues, flowers, and developing seeds. **Plant Physiology**, v.113, p.695-706, 1997.
- ZUBER, M.S.; SKRDLA, W.H.; CHLOE, B. Survey of maize selections for endosperm lysine content. **Crop Science**, v.15, p.93-94, 1975.

Recebido em 16.06.00