ISSN 1678-9644
Maio, 2012

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Arroz e Feijão
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Documentos 273

Arroz C_4: Desafios e Perspectivas

Milene Alves de Figueiredo Carvalho
Anna Cristina Lanna
Vanessa Cristina Stein

Embrapa Arroz e Feijão
Santo Antônio de Goiás, GO
2012

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Arroz e Feijão
Rod. GO 462, Km 12
Caixa Postal 179
75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO
Fone: (0xx62) 3533 2110
Fax: (0xx62) 3533 2123
www.cnpaf.embrapa.br
sac@cnpaf.embrapa.br

Comitê de Publicações
Presidente: *Camilla Souza de Oliveira*
Secretário-Executivo: *Luiz Roberto Rocha da Silva*
Membros: *Flávia Aparecida de Alcântara*
Luís Fernando Stone
Ana Lúcia Delalibera de Faria
Heloísa Célis de Paiva Breseghello
Roselene de Queiroz Chaves
Henique César de Oliveira Ferreira
Adriano Pereira de Castro
Orlando Peixoto de Morais

Supervisor editorial: *Camilla Souza de Oliveira*
Revisão de texto: *Camilla Souza de Oliveira*
Normalização bibliográfica: *Ana Lúcia D. de Faria*
Tratamento de ilustrações: *Fabiano Severino*
Editoração eletrônica: *Fabiano Severino*

1ª edição
Versão online (2012)

Todos os direitos reservados
A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Arroz e Feijão

Carvalho, Milene Alves de Figueiredo.
Arroz C_4 : desafios e perspectivas / Milene Alves de Figueiredo Carvalho, Anna Cristina Lanna, Vanessa Cristina Stein. - Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão, 2012.
40 p. - (Documentos / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9644 ; 273)

1. Arroz – Fotossíntese. 2. Arroz – Carbono. 3. Arroz – Fisiologia vegetal. I. Lanna, Anna Cristina. II. Stein, Vanessa Cristina. III. Embrapa Arroz e Feijão. IV. Série.

CDD 633.18 (21. ed.)

© Embrapa 2012

Autores

Milene Alves de Figueiredo Carvalho
Engenheira agrônoma, Doutora em Fisiologia Vegetal, pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, milene@cnpaf.embrapa.br

Anna Cristina Lanna
Química, Doutora em Fisiologia Vegetal, pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, aclanna@cnpaf.embrapa.br

Vanessa Cristina Stein
Bióloga, Doutora em Fisiologia Vegetal, professora adjunta da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, vanessa.stein@hotmail.com

Apresentação

No Brasil, em 2010, a participação do sistema de cultivo de arroz irrigado com irrigação controlada na produção total de arroz foi de 79%, seguido pelo arroz de terras altas, 21%. As pesquisas revelam que o teto médio de produtividade das atuais cultivares de arroz irrigado é de, aproximadamente, 10 toneladas por hectare e das atuais cultivares de arroz de terras altas é de, aproximadamente, cinco toneladas por hectare. Apesar de todas as modificações nas características agronômicas realizadas pelo Programa de Melhoramento Genético do Arroz para alcançar essa produtividade, observa-se que nos últimos anos, somente incrementos periféricos ocorreram no potencial de produtividade do arroz. Em busca de mais eficiência e produtividade, as pesquisas avançam para adaptar novas características às plantas de arroz, gramínea do grupo C_3. Em 2006, um consórcio internacional de instituições de pesquisa foi criado para avaliar a viabilidade de desenvolver uma planta de arroz com mecanismo fotossintético C_4. Plantas C_4 utilizam o CO_2 disponível de forma mais eficiente por possuírem uma série de atributos anatômicos e bioquímico-fisiológicos que as caracterizam como plantas mais tolerantes a estresses ambientais e mais produtivas do que as plantas C_3. A pesquisa para introduzir características de planta C_4 no arroz, que é C_3, é considerada o avanço mais significativo que está sendo preparado nos últimos anos para a orizicultura.

As autoras

Sumário

Introdução **9**
Mecanismos de Assimilação de Carbono (CO_2) **10**
Mecanismo C_3 e sua baixa eficiência fotossintética 10
Mecanismo C_4 e suas variações mecanicistas 14
Prospectos para Introdução da Fotossíntese C_4 em Plantas C_3 ..... **19**
Estado da arte sobre o desenvolvimento do arroz C_4 24
Referências **32**

Arroz C_4: Desafios e Perspectivas

Milene Alves de Figueiredo Carvalho
Anna Cristina Lanna
Vanessa Cristina Stein

Introdução

A cultura do arroz é considerada a mais importante do mundo em termos de número de pessoas que dependem dela como sua principal fonte de calorias e nutrição. Após um rápido aumento da produção de arroz ao longo da segunda metade do século XX, constata-se que o aumento da produtividade ainda é uma meta a ser perseguida (ZHU et al., 2010a, 2010b). Grande esforço científico internacional tem sido despendido objetivando a melhoria da eficácia fotossintética do arroz, o que significa, para os especialistas, a transformação do arroz, planta C_3, em planta C_4 (SHEEHY et al., 2007). Em 2006, um consórcio internacional de instituições de pesquisa foi criado para avaliar a viabilidade de desenvolver uma planta de arroz com mecanismo fotossintético C_4, liderado pelo cientista Dr. John Sheehy do "International Rice Research Institute". Assim, em 2009, um programa trianual, com orçamento de U$ 11 milhões de dólares da fundação "Bill and Melinda Gates", iniciou a pesquisa de engenharia C_4 em arroz (http://C4rice.irri.org) (SAGE; ZHU, 2011). A busca por um arroz mais produtivo tem origem nas previsões de que será preciso alimentar uma população mundial que pode alcançar 8,3 bilhões de pessoas, em 2030, com uma demanda de arroz da ordem de 771 milhões de toneladas. Para atender a esse aumento, a produção mundial de arroz, que em 2005 era de 618 milhões de toneladas, deverá ser

incrementada, em cerca de 153 milhões de toneladas. De acordo com o secretário da Comissão Internacional do Arroz da FAO, Nguu Nguyen, a produção sustentável de arroz requer um importante aumento de rendimento por hectare e o arroz C_4 tem potencial para superar, entre 15 e 20%, o rendimento das melhores variedades e híbridos de arroz existentes (FAO..., 2006). As principais diferenças entre plantas C_3 e C_4 residem em características anatômicas e bioquímicas. Na maioria das espécies vegetais terrestres C_4, a fotossíntese C_4 depende da cooperação de dois tipos de células especializadas, localizadas nas folhas, as células da bainha do feixe vascular e as células do mesofilo. Essas células possuem enzimas-chave com função de concentrar gás carbônico (CO_2) no ambiente intracelular, para que não ocorra o processo de competição entre os gases CO_2 e oxigênio molecular (O_2) pelo centro ativo da Rubisco (ribulose 1,5 - bifosfato carboxilase/oxigenase), enzima responsável em fixar o CO_2 atmosférico, mas que também pode fixar O_2, como ocorre, principalmente, em plantas C_3 que, em consequência, possui menor eficiência fotossintética. Assim, esse documento objetiva levar ao conhecimento dos leitores as principais características bioquímico-fisiológicas de plantas C_3 e C_4, além de descrever o estado da arte sobre o desenvolvimento do arroz C_4.

Mecanismos de Assimilação de Carbono (CO_2)

Mecanismo C_3 e sua baixa eficiência fotossintética

A fotossíntese, processo pelo qual os organismos autótrofos fixam o CO_2 com a utilização de energia proveniente da luz solar, compreende dois processos acoplados. O primeiro deles, de caráter fotoquímico, tem a função de converter energia luminosa em energia química (ATP e NADPH). Esse processo de transdução de energia ocorre nos tilacóides, que são sistemas de membranas internas do cloroplasto e sítio de localização dos complexos antena ou complexos de captação de luz (CCL). Esses complexos são constituídos por moléculas de clorofila e carotenóides (pigmentos acessórios) que possuem como principal função a absorção de

luz fotossinteticamente ativa (LFA). O segundo processo, de caráter bioquímico, ocorre no estroma (matriz do cloroplasto), em que o CO_2 é fixado pela enzima Rubisco e reduzido a compostos orgânicos (açúcares). Esse processo é conhecido como Ciclo de Calvin-Benson ou Rota C_3, devido à produção do primeiro intermediário fotossintético ser um composto orgânico de três carbonos, denominado 3-fosfoglicerato (3-PGA) (BUCHANAN et al., 2000; TAIZ; ZEIGER, 2004; MARTINOTTO et al., 2006). A etapa bioquímica da fotossíntese compreende as fases de carboxilação, redução e regeneração. Esse ciclo inicia-se com a reação de carboxilação da molécula aceptora de CO_2, ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP), pela enzima Rubisco; seguida pela redução do 3-PGA, produto da reação de carboxilação, em gliceraldeído fosfato (G-3P) e dihidroxicetona fosfato, via reações que consomem ATP e NADPH (produtos da etapa fotoquímica da fotossíntese); e regeneração do ciclo que envolve uma série de reações que regeneram parte das trioses fosfato geradas em RuBP (TAIZ; ZEIGER, 2004).

A taxa de fixação de CO_2, realizada pela ação carboxilase da enzima Rubisco, pode ser reduzida em função do seu papel adicional, que é sua atividade oxigenase. Nessa catálise, a Rubisco utiliza, ao invés de CO_2, o O_2 como substrato (Figura 1). No caso da fixação de O_2, as plantas geram apenas uma molécula de 3-PGA, uma vez que, no evento primário dessa via, duas moléculas de 2-fosfoglicolato (composto de dois carbonos) são formadas e, logo em seguida, são convertidas em uma molécula de 3-PGA e uma molécula de CO_2. Isso significa que 25% do carbono fixado é perdido para a atmosfera e 75% é recuperado pelo ciclo oxidativo fotossintético C_2 do carbono e retornado ao ciclo de Calvin (BUCHANAN et al., 2000; TAIZ; ZEIGER, 2004). Nesse caso, a oxigenação é a reação primária em um processo conhecido como ciclo C_2 ou fotorrespiração (TAIZ; ZEIGER, 2004), que é uma rota não somente exigente em energia, mas que, além disso, leva a uma perda líquida de CO_2 (GOWIK; WESTHOFF, 2011). A fotorrespiração é uma via metabólica complexa que envolve enzimas presentes nos cloroplasto, peroxissomo, citosol e mitocôndria (STITT et al., 2010; RAINES, 2011).

O balanço entre os ciclos fotossintético e fotorrespiratório, em plantas C_3, é determinado por três fatores: propriedades cinéticas da Rubisco, concentrações dos substratos CO_2 e O_2 no ambiente intracelular e temperatura. Variações ambientais tais como alta temperatura e deficiência hídrica, condições usuais em regiões de clima tropical, podem resultar em um aumento da atividade oxigenase da Rubisco. Em outras palavras, com o aumento da temperatura, a concentração do gás CO_2, presente em uma solução aquosa em equilíbrio com o ar, decresce mais rapidamente do que a concentração do gás O_2 e, consequentemente, a razão entre concentração de CO_2 e O_2 decresce (TAIZ; ZEIGER, 2004; RAINES, 2011). Como resultado dessa propriedade, a taxa fotorrespiratória (atividade oxigenase da Rubisco) aumenta comparativamente à taxa fotossintética (atividade carboxilase da Rubisco). Tal efeito é acentuado pelas propriedades cinéticas da Rubisco, uma vez que a velocidade da reação oxigenase é maior que a de carboxilase, principalmente, por causa do aumento da concentração de O_2 no ambiente. Em geral, o aumento progressivo da temperatura altera o balanço entre Ciclo de Calvin e Ciclo oxidativo fotossintético C_2 do carbono, com esse último se beneficiando em detrimento do primeiro (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Retomando à produção de fotoassimilados via Ciclo de Calvin, enquanto a maioria das trioses fosfato (cinco-sextos) produzidas neste ciclo permanecem nele para reciclar RuBP (fase de regeneração), um-sexto do carbono fixado é destinado a vias biossintéticas essenciais para o crescimento e desenvolvimento da planta (RAINES; PAUL, 2006; SMITH; STITT, 2007). Os produtos da fotossíntese são convertidos em (a) trioses e hexoses fostatos para a síntese de sacarose e amido, usados para suprir a necessidade energética da planta; (b) eritrose fosfato para participar, como intermediário, da rota do ácido chiquímico para a biossíntese de aminoácidos e lignina; (c) gliceraldeído fosfato para participar da rota isoprenóide; e (d) ribulose fosfato, utilizado para o metabolismo de nucleotídeos, tiamina e biossíntese de parede celular (RAINES, 2011) (Figura 1). Diante da diversidade de rotas metabólicas que drenam o

carbono fixado, torna-se evidente que o Ciclo de Calvin é chave no metabolismo primário do carbono e, portanto, sua manipulação por meio da engenharia genética tem grande potencial no incremento da produtividade da cultura (RAINES; PAUL, 2006; RAINES, 2011).

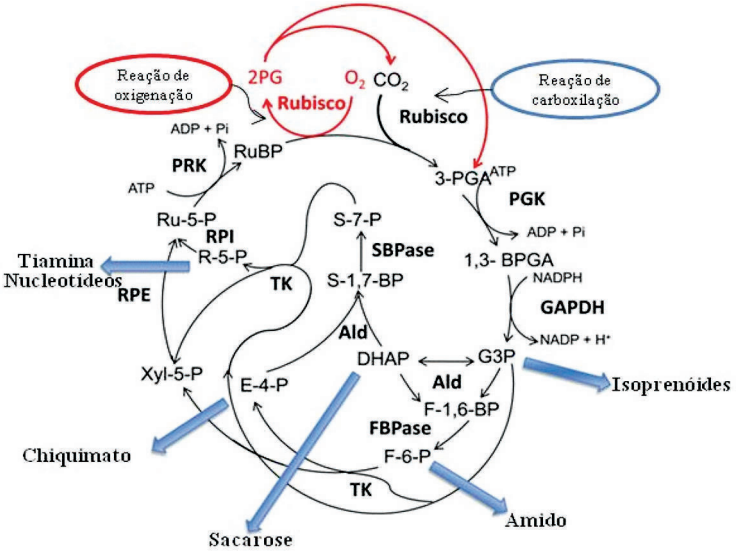

Figura 1. A rota C_3. A reação de carboxilação catalisada pela Rubisco fixa CO_2 na molécula aceptora ribulose-1,5-bifosfato (RuBP), formando fosfoglicerato (3-PGA). A fase redutora do ciclo segue com duas reações catalisadas pela 3-PGA quinase (PGK) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), produzindo gliceraldeído fosfato (G-3-P). O G-3-P entra na fase regenerativa catalisada pela aldolase (Ald) e/ou frutose bisfosfatase (FBPase) ou sedoheptulose-1,7-bisfosfatase (SBPase), produzindo Frutose-6-fosfato (F-6-P) e sedoheptulose-7-fosfato (S-7-P). F-6-P e S-7-P são então utilizadas em reações catalisadas pela transcetolase (TK), ribulose-5-fosfato isomerase (RPI), e ribulose-5-fostato epimerase (RPE), produzindo ribulose-5-fosfato (Ru-5-P). O passo final converte Ru-5-P em RuBP, catalisada pela fosforibuloquinase (PRK). A reação de oxigenação da Rubisco fixa O_2 na molécula aceptora RuBP, formando PGA e 2-fosfoglicolato (2PG), e o processo da fotorrespiração (mostrado em vermelho) libera CO_2 e PGA . Os cinco pontos de exportação da rota são mostrados nas setas azuis

Fonte: Raines (2011).

Em síntese, o ciclo C_3 é a rota primária de assimilação de carbono (CO_2), perfazendo o maior fluxo de carbono orgânico da biosfera com, aproximadamente, 100 bilhões de toneladas de CO_2 por ano, 15% do carbono na atmosfera (RAINES, 2011). Entender a resposta do Ciclo de Calvin por demandas de fotoassimilados pela planta crescida em condições ideais e em condições adversas ao ambiente é essencial para almejar o redirecionamento do carbono para produtos-chave que culminam no aumento do rendimento da cultura (RAINES, 2011).

As espécies vegetais líderes economicamente, em nível mundial, são arroz, trigo, soja, batata, algodão, tomate, uva, maçã, amendoim, mandioca, milho e cana-de-açúcar; sendo somente as duas últimas, plantas C_4. Ademais, os principais grãos arroz, trigo, cevada, aveia e centeio são espécies C_3, como são os legumes, tubérculos, fibras e frutas (SAGE; ZHU, 2011).

Em se tratando do arroz, que utiliza o caminho fotossintético C_3 para fixar o CO_2 atmosférico, a redução da taxa fotossintética pela fotorrespiração, nos níveis atuais de CO_2 atmosférico, é estimada em 25-35% a 30-35 °C (SAGE, 2001), o que significa uma baixa eficiência fotossintética sob um ambiente em aquecimento.

Mecanismo C_4 e suas variações mecanicistas

A desfavorável reação oxigenase da Rubisco pode ser explicada como uma relíquia da história evolutiva dessa enzima, quando a concentração de CO_2 atmosférica era alta e a de O_2 baixa. No entanto, desenvolveram-se nas plantas diferentes maneiras de convivência com essa situação e, talvez, a mais bem sucedida foi a fotossíntese C_4 (GOWIK; WESTHOFF, 2011), em que o primeiro produto estável gerado são ácidos orgânicos de quatro carbonos (oxaloacetato, malato e aspartato) (BUCHANAN et al., 2000), diferentemente das plantas C_3, em que o primeiro produto estável são compostos orgânicos de três carbonos.

A rota fotossintética C_4, uma via metabólica adicional ao ciclo C_3, inclui uma série de alterações no desenvolvimento foliar, biologia celular e bioquímica que permite o aumento do suprimento de CO_2 para Rubisco, reduzindo assim a competição entre a reação de oxigenação e a de carboxilação (MARSHALL et al., 2007; GOWIK; WESTHOFF, 2011; RAINES, 2011).

De maneira geral, existem três tipos de sistema C_4, o primeiro deles são as plantas C_4 com anatomia tipo Kranz (palavra alemã que significa coroa), que sob o ponto vista anatômico, significa compartimentalização de funções entre diferentes tipos de células foliares: células do mesofilo e células da bainha do feixe vascular (STITT et al., 2010). As células parenquimáticas do mesofilo encontram-se organizadas ao redor das células da bainha do feixe vascular; as quais, por sua vez, estruturam-se em volta do tecido vascular e, quando essa estrutura é observada em corte transversal, tem aspecto de coroa (Kranz). Plantas C_4 com anatomia do tipo Kranz possuem cloroplastos dimórficos entre as células parenquimáticas do mesofilo e da bainha do feixe vascular devido principalmente à diferença no tipo e quantidade de moléculas de enzimas, localização de amido (predominantemente nos cloroplastos das células da bainha vascular) e ultra-estrutura do cloroplasto (relacionadas às variações de requerimento de energia entre as células do mesofilo e da bainha vascular dos diferentes subgrupos encontrados). Este dimorfismo é muito aparente em espécies C_4 do tipo EM-NADP (enzima málica dependente de NADP), onde os cloroplastos das células parenquimáticas do mesofilo apresentam o sistema de membranas internas bem desenvolvidas, enquanto que os cloroplastos da bainha vascular não são tão robustos (EDWARDS et al., 2004; CASTRO et al., 2005). Sob o ponto de vista bioquímico, a fixação inicial de CO_2 ocorre no citosol das células mesofílicas, onde o CO_2 reage com o fosfoenolpiruvato (PEP), via enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), para formar oxalacetato (OAA). Subsequentemente, esse composto pode ser reduzido a malato com utilização do NADPH ou pode ser aminado a aspartato. O sistema enzimático presente

determinará se uma planta C_4 é formadora de malato ou de aspartato. Em seguida, esses compostos, produzidos nas células mesofílicas, são transportados até as células da bainha do feixe vascular, onde são descarboxilados, liberando CO_2 e convertidos, novamente, em piruvato. O CO_2 liberado é, então, refixado, pela Rubisco, via ciclo de Calvin. O piruvato, resultante da descarboxilação, retorna às células mesofílicas onde é convertido em PEP, regenerando o aceptor inicial de CO_2 via atividade da PEPC (CASTRO et al., 2005) (Figura 2).

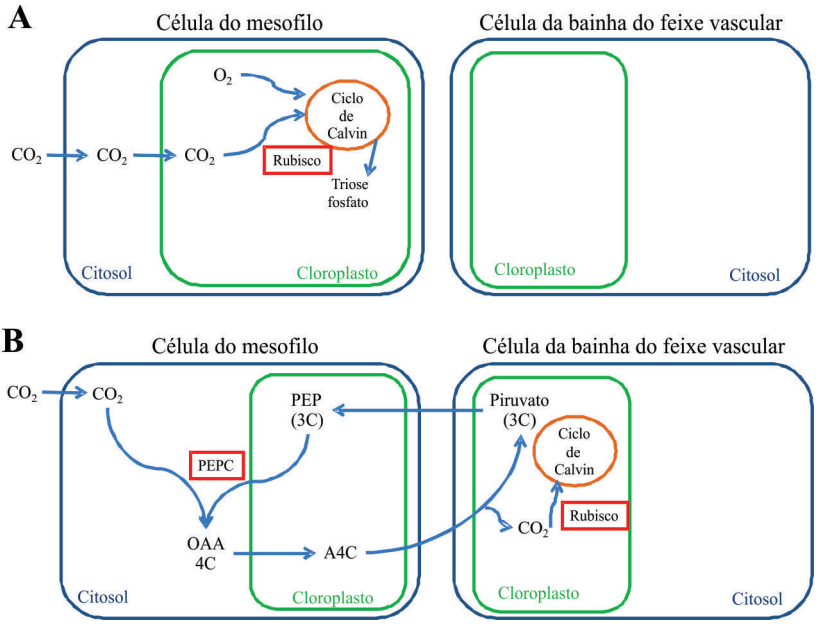

Figura 2. Esquema da fotossíntese de plantas C_3 (A) e de plantas C_4 (B). PEP – fosfoelnolpiruvato; PEPC - fosfoenolpiruvato carboxilase; OAA – oxalacetato; A4C – ácido orgânico de quatro carbonos.

Comparando as células da bainha do feixe de plantas C_3 (importante salientar que as plantas C_3 possuem esse tipo de célula) com as de plantas C_4, essas apresentam funções fisiológicas adicionais, devido ao seu caráter hipertrófico e ao maior conteúdo de

organelas (MARSHALL et al., 2007; GOWIK; WESTHOFF, 2011). As células dessa bainha ao redor do feixe vascular, em plantas C_4, têm paredes celulares espessas, são pouco permeáveis aos gases (CO_2 e O_2) e não apresentam espaços intercelulares. A relação superfície/volume nas células da bainha vascular é relativamente baixa, situação pouco favorável à perda de vapor de água e CO_2 (CASTRO et al., 2005).

Os outros sistemas C_4, descobertos mais recentemente, foram identificados em plantas que realizam a rota C_4 sem compartimentalização intercelular. As plantas, citadas a seguir, possuem uma rota C_4 que funciona completamente nas células do mesofilo: *Suaeda aralocaspica* (LAMBERS et al., 2008), *Bienertia cycloptera* (EDWARDS et al., 2004; CHUONG et al., 2006; LAMBERS et al., 2008); *Borszczowia aralocaspica* (EDWARDS et al., 2004); *Bienertia sinuspersici* (CHUONG et al., 2006; LARA et al., 2006; OFFERMANN et al., 2011a, 2011b) e *Suaeda aralocaspica* (CHUONG et al., 2006; LARA et al., 2006). Essas espécies são capazes de realizar fotossíntese C_4 dentro de uma única célula clorenquimática, por meio da partição de funções entre compartimentos celulares (EDWARDS et al., 2004).

O primeiro sistema C_4, em célula única, é o monomórfico (Figura 3), o qual apresenta cloroplastos contendo descarboxilases, para produção de CO_2, e as enzimas do ciclo C_3, como a Rubisco e outras enzimas essenciais para a funcionalidade da rota. Esse sistema é representado tanto pelas plantas aquáticas C_4, tal como *Hydrilla* e *Orcuttia*, quanto pelas plantas originárias dos esforços da engenharia genética em introduzir fotossíntese C_4 em plantas C_3. O segundo é o dimórfico (Figura 4), apresentando dois tipos de cloroplastos, bioquímica e funcionalmente diferentes, proporcionando a compartimentalização espacial dentro de uma única célula, semelhantemente à da anatomia do tipo Kranz. Este sistema está presente em algumas plantas C_4, como a *Bienertia sinuspersici* (EDWARDS et al., 2004; OFFERMANN et al., 2011a, 2011b).

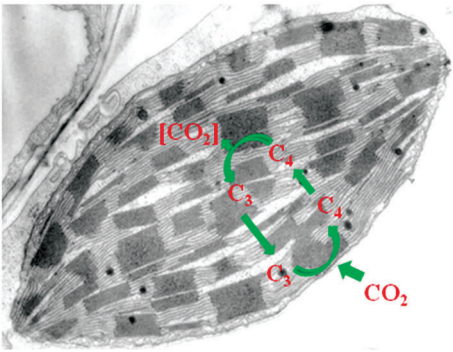

Figura 3. Esquema ilustrativo do sistema monomórfico em plantas C_4 em células únicas. Foto cloroplasto: http://biologiacelularufg.blogspot.com/

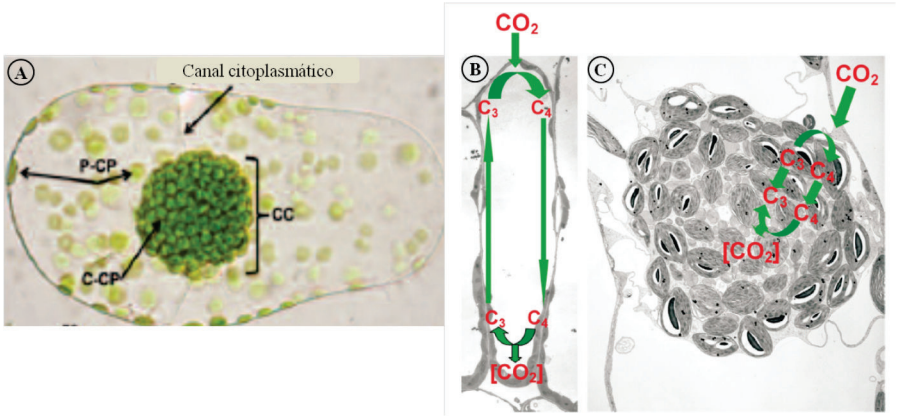

Figura 4. Sistema dimórfico em plantas C_4 em células únicas. (A) Micrografia de uma célula clorenquimática de *Bienertia sinuspersici* mostrando cloroplastos periféricos (P-CP), compartimento citoplasmático (CC) e cloroplastos do compartimento citoplasmático central (C-CP). Os dois compartimentos são conectados via canais citoplasmáticos. (B) Eletromicroscopia de *Borszczowia aralocaspica* e (C) *Bienertia cycloptera*, ilustrando o esquema fotossintético C_4 e os cloroplastos em dois compartimentos citoplasmáticos. Fonte: Edwards et al. (2004); Offermann et al. (2011a).

Esses sistemas, terrestres e aquáticos, demonstram a notável plasticidade inerente à célula vegetal e fornecem exemplos incomuns do controle de processos subcelulares, que podem ser exercidos para realizar funções bioquímicas altamente complexas (EDWARDS et al., 2004).

Os principais fatores que governam a distribuição ecológica de plantas C_4 são a alta taxa fotossintética encontrada em plantas de clima tropical (alta temperatura) e a alta eficiência do uso da água. Esse último justifica-se pelo fato de existir baixa taxa transpiratória, em decorrência de baixa condutância estomática, e por existir um mecanismo concentrador de CO_2, anterior ao Ciclo de Calvin (LAMBERS et al., 2008). Devido a sua habilidade em concentrar CO_2 nas proximidades da Rubisco, a fotossíntese C_4 possui baixa taxa fotorrespiratória e, por conseguinte, maior capacidade fotossintética, agregada à alta eficiência no uso da água, nitrogênio e radiação, comparativamente às plantas C_3, cultivadas em clima tropical (LONG, 1999). Consequentemente, o mecanismo C_4 apresenta muitas vantagens sobre o C_3 em regiões produtoras de arroz. De acordo com SAGE (2001), a maioria das plantas daninhas de arroz usa fotossíntese C_4 e a redução na produtividade causada por essas plantas em campos de arroz de terras altas pode exceder 90%, na ausência de medidas intensivas de controle. A discrepância de desempenho fotossintético entre espécies C_3 e C_4, em regiões produtoras de arroz, tem levado a conclusão que introduzir fotossíntese C_4 em arroz pode causar uma "superprodução" do cereal e, por conseguinte, elevar o suprimento alimentar humano (MITCHELL; SHEEHY, 2006; HIBBERD et al., 2008).

Prospectos para Introdução da Fotossíntese C_4 em Plantas C_3

A descoberta da fotossíntese C_4, na década de 60, e a comprovação de sua alta capacidade fotossintética, comparativamente à da rota C_3, deu início a uma onda de interesse sobre o impacto da fotorrespiração na economia do carbono em plantas C_3, sua origem na reação oxigenase da Rubisco, e no relacionamento ecofisiológico entre plantas C_3 e C_4. Até o momento, tentativas têm sido feitas para transferir vantagens da fotossíntese C_4 (taxa fotorrespiratória reduzida, aumento na eficiência do uso da água e do nitrogênio e, sob certas condições, aumento na eficiência do uso da radiação solar) para plantas C_3, por meio do melhoramento genético. Vários resultados já foram obtidos, alguns

promissores outros não muito; e, de acordo com Leegood (2002), o mais estratégico, em termos de viabilidade, é a obtenção, por meio da engenharia genética, de mecanismos concentradores de CO_2 do tipo célula única C_4, tal qual a encontrada na planta aquática *Hydrilla verticillata*, quando comparado com a introdução de uma anatomia foliar Kranz, com suas divisões de trabalho entre células mesofílicas de paredes finas e células da bainha do feixe vascular clorenquimáticas.

De maneira geral, a fotossíntese C_4 tem um número de mecanismos essenciais para concentrar CO_2 em sítios próximos via Ciclo de Calvin, dentre esses: (a) sistema ativo de captura de CO_2, dirigido fotossinteticamente; (b) suprimento de energia fotossintética; (c) *pool* de metabólitos intermediários de CO_2 capturado; (d) mecanismo de liberação de CO_2 a partir do *pool* de metabólitos intermediários; (e) compartimento de concentração e de fixação de CO_2; (f) barreira física e/ou química de reduzir o vazamento de CO_2 no sítio de concentração; (g) modificação das propriedades cinéticas da Rubisco; e (h) arranjos especializados para o transporte intra e intercelular de metabólitos, bem como diferenças em sua regulação (LEEGOOD, 2002). Em outras palavras, dentre os requisitos mínimos necessários para que plantas apresentem mecanismos concentradores de CO_2 em suas células, levando em consideração os ajustes anatômicos e bioquímicos, pode-se citar o aumento no número/atividade das enzimas envolvidas na fotossíntese C_4 em células específicas (por exemplo, PEPC nas células do mesofilo, bem como decarboxilases e Rubisco nas células da bainha dos feixes vasculares em plantas com anatomia tipo Kranz); e, em complemento, ajustes de atividade dos fotossistemas e, consequentemente, do fluxo de elétrons; de atividade das proteínas transportadoras de metabólitos tanto intra quanto intercelularmente; conexões simplásticas de fonte e dreno separados espacialmente de metabólitos de transporte de ácidos orgânicos de quatro carbonos e; barreiras para difusão de CO_2 entre o local de fixação de CO_2 pela PEPC em células do mesofilo e locais de perda e refixação de CO_2 pela Rubisco nas células da bainha do feixe vascular (EDWARDS et al., 2001), no caso de plantas com anatomia tipo Kranz. Essas adaptações, não muito simples, apresentam a possibilidade de explorar esse "nicho"

científico para aumentar a eficiência fotossintética das plantas C_3 (GOWIK; WESTHOFF, 2011, PRICE et al., 2011).

De acordo com Hibberd et al. (2008), a transferência do aparato fotossintético C_4 para espécies C_3, visando redução da fotorrespiração e aumento da produtividade, é uma meta ambiciosa que requer prova de conceito, antes de qualquer grande investimento de tempo e dinheiro. A concretização dessa estratégia será provavelmente a longo prazo; no entanto, as pesquisas iniciadas e os projetos em vias de aprovação devem ser executados para que se determine a criticidade das etapas da via C_4, seus requerimentos básicos (WANG et al., 2009), e no caso de compartimentalização de funções entre células, alterações na anatomia foliar (HIBBERD et al., 2008; ZHU et al., 2010a, 2010b). Como morfologia e metabolismo foliar são coordenados, defende-se que os estudos iniciais devam ser projetados para investigar a interface mecanicista entre morfologia foliar e metabolismo em folhas de C_3 e C_4 (HIBBERD et al., 2008).

Organismo modelo de sistema C_4 para a biologia moderna é de fundamental importância e, até recentemente, nenhuma planta C_4 tinha sido atraente, sob o ponto de vista de figurar como modelo genético para fotossíntese C_4, fato que contribuiu para o declíneo da pesquisa sobre mecanismo C_4, no último quarto do século passado. Espécie C_4 ou espécies intermediárias C_3-C_4 do gênero *Flaveria* suportaram extensiva pesquisa até o início dos anos 80 (BROWN et al., 2005); contudo, sua fonte genética era limitada, e a manipulação complicada pelo grande porte das plantas na maturidade, significando exigência de grande espaço para crescimento, elevados níveis de radiação solar e vários meses para estabelecimento e produção de sementes maduras. Consequentemente, *Flaveria* tem sido mais usada como um modelo bioquímico e evolucionário do que como modelo genético (SAGE; ZHU, 2011). *Cleome gynandra* tem, recentemente, sido referendada como modelo C_4 (BROWN et al., 2005; MARSHALL et al., 2007; BRÄUTIGAM et al., 2011a, 2011b). As principais características das plantas do gênero *Cleome*, consideradas plantas intermediárias, são: aumentada venação foliar, expansão de células da bainha, proliferação

de mitocôndrias e cloroplastos e acúmulo de proteínas e transcritos necessários à fotossíntese C_4 (MARSHALL et al., 2007). Essas características reforçam o conceito da evolução de C_4, a partir de plantas C_3, e demonstram a possibilidade de alteração do mecanismo fotossintético C_3 para C_4. No entanto, a utilidade de *C. gynandra* como modelo genético é limitada porque seu genoma não é tão pequeno quanto o de *Arabidposis* e pode apresentar dificuldade de crescimento em condições de baixa luminosidade, no caso de pesquisas realizadas em países de clima frio. Outro fator limitante é que, tanto *Flaveria* quanto *Cleome* são dicotiledôneas e, portanto, podem apresentar reduzida utilidade para sistemas de monocotiledôneas como arroz e trigo (SAGE; ZHU, 2011).

Brutnell et al. (2010) e Li e Brutnell (2011) propuseram *Setaria viridis* como modelo genético ideal para suporte das pesquisas C_4, uma vez que essa espécie possui genoma pequeno (510 Mb), facilidade de se desenvolver em salas de crescimento, elevado número de sementes em curto espaço de tempo (seis semanas), sequenciamento genômico em fase de término e, atualmente, sistema de transformação padronizado. *Setaria* é o único modelo genético proposto para o clado PACMAD de gramíneas, incluindo as culturas bioenergéticas líderes: *Saccharum officinarum* L (cana-de-açúcar), *Zea mays* (milho), *Panicum virgatum*, *Andropogon gerardii* e *Miscanthus*. É importante salientar, aqui, que a família das gramíneas é filogeneticamente subdividida em um pequeno número de linhas, divergentes geneticamente, e dois maiores clados monofiléticos, o clado BEP e o clado PACMAD (BARKER et al., 2001; KELLOGG, 2002; CHRISTIN et al., 2009). A maioria das gramíneas pertence ao clado PACMAD, o qual compreende todas as espécies C_4 e gramíneas C_3 dentro das subfamílias *Panicoidaea*, *Arundinoideae*, *Danthonioideae* e *Micrairoideae* (KELLOGG, 2002; CHRISTIN et al., 2009). O clado BEP inclui, exclusivamente, plantas C_3, subfamílias *Bambusoideae*, *Erhartoideae* (a qual o arroz pertence) e *Pooideae* (BROWN, 1958; CAROLIN et al., 1973).

Adicionalmente, *Setaria* é amplamente distribuída, com muitas linhagens adaptadas ao estresse de baixa temperatura e deficiência

hídrica, o que também possibilitará a exploração dessa fonte valiosa para o entendimento da biologia molecular do estresse abiótico em plantas C_4 (LI; BRUTNELL, 2011).

Segundo Kajala et al. (2011), a fotossíntese C_4 evoluiu várias vezes, indicando que as espécies C_3 podem, de alguma forma, ser convertidas em espécies C_4 (HIBBERD; QUICK, 2002; SAGE, 2004). Em segundo lugar, enzimas que são proeminentes na rota C_4, de maneira geral, também existem nas folhas C_3, embora suas atividades sejam mais baixas (SHEEHY et al.; 2007; ZHU et al., 2010b). Plantas de tabaco, tipicamente C_3, apresentam características da rota C_4 em células próximas aos vasos do xilema e floema de caules (HIBBERD; QUICK, 2002; BROWN et al., 2010). Em terceiro lugar, a estimativa atual é de que aproximadamente apenas 3% do transcriptoma de folhas de plantas C_3 diferem das espécies C_4 e a maioria dessas alterações de expressão gênica é encontrada entre as células do mesofilo e as da bainha do feixe vascular (BRÄUTIGAM et al., 2011a).

Uma estratégia apontada para melhorar o desempenho fotossintético de plantas C_3 é a aplicação da biotecnologia, por meio da genética direta e reversa, com o objetivo de identificar os genes que controlam funções fisiológicas, o padrão de desenvolvimento e as respostas a variações ambientais; além de inserir genes por meio da tecnologia do DNA recombinante (SAGE; ZHU, 2011). A estratégia, baseada no cenário evolutivo, permite que enzimas envolvidas na rota C_4 sejam expressas em níveis elevados e em locais desejados nas folhas das plantas C_3. De acordo com Miyao (2003), plantas transgênicas C_3 superproduzindo enzimas múltiplas envolvidas na rota C_4 já estão sendo desenvolvidas para a melhoria da performance fotossintética das plantas C_3.

Compreender a base molecular da especialização anatômica e os processos regulatórios que determinam a localização e o nível de expressão de enzimas específicas da fotossíntese C_4 é fundamental para tentar alocar componentes da rota C_4 em plantas C_3 (BRÄUTIGAM et al., 2011a; HIBBERD; COVSHOFF, 2010). Resultados iniciais obtidos por Hibberd e Covshoff (2010) indicam que alguns genes de

espécies C_4 são capazes de se expressar nas células do mesofilo ou da bainha vascular em folhas de plantas C_3; contudo são resultados preliminares e pesquisas adicionais necessitam ser implementadas para fundamentar tais descobertas. Existe a necessidade de determinar se as redes regulatórias que geram acumulação de proteínas relacionadas à fotossíntese em folhas C_4 já estão presentes nas folhas C_3. Embora essa vertente da pesquisa ainda não tenha avançado a contento, a combinação de novos sequenciamentos e tecnologias de proteômica e metabolômica conduz ao otimismo para o sucesso futuro desta área (RAINES, 2011).

Sage e Sage (2009) concluíram em seu trabalho que há um enorme potencial para utilizar a filogenia, fisiologia e anatomia fotossintética do mesofilo para identificar as adaptações fotossintéticas em gramíneas C_3, grupo cuja anatomia funcional ainda permanece pouco estudada, muito dispersa e carente de detalhes. Os autores supracitados afirmaram ainda que, em muitos dos estudos relativos a esse tema, ou falta efetivo controle ambiental ou estes foram conduzidos sob condições que mascararam as principais características que indicam a função adaptativa. Por exemplo, percebe-se que condições de crescimento sob baixa luminosidade foram particularmente desfavoráveis quando tentaram interpretar a anatomia foliar funcional de gramíneas C_3 de habitats abertos.

Estado da arte sobre o desenvolvimento do arroz C_4

Mudanças climáticas provavelmente resultarão em variações mais extremas no clima e causarão alterações adversas no padrão climático mundial. Escassez de água e demanda crescente tanto por alimentos quanto por biocombustíveis resultarão na busca frenética pelo aumento de produtividade das espécies que figuram como fonte alimentar e bioenergética para a população mundial. No continente asiático, onde se cultiva e se consome 90% do arroz produzido no mundo, cada hectare de terra que produz arroz fornece, nos dias atuais, alimento para 27 pessoas; já em 2050, estima-se que cada hectare de terra deverá alimentar pelo menos 43 pessoas. Isso significa que a produtividade deve ser aumentada, em pelo menos, 50% nos próximos

40 anos para se prevenir a desnutrição em massa de 700 milhões de asiáticos que, atualmente, dependem do arroz para mais de 60% do seu consumo calórico diário. Os modelos de previsão, após constatação de que o processo evolutivo aumentou a eficiência fotossintética em 50% nas plantas C_4, sugerem que um aumento de produtividade dessa magnitude, em plantas C_3, particularmente o arroz, poderá ser alcançado somente se a capacidade fotossintética for aumentada; e, portanto, uma solução promissora é o desenvolvimento do arroz C_4 (ZEIGLER, 2007; HIBBERD et al., 2008; SAGE; SAGE, 2009; GOWIK; WESTHOFF, 2011; KAJALA et al., 2011).

De acordo com cientistas do International Rice Research Institute (2010), o arroz com fotossíntese C_4 contribuirá enormemente para a segunda revolução verde. Contudo, ainda não há informação de como essa alteração afetaria o crescimento e desenvolvimento da planta de arroz, tornando-se evidente a necessidade de investimento em pesquisa para entender, em nível molecular, a fisiologia dessa espécie. Os cientistas relataram ainda que o arroz é a cultura mais importante, no mundo, para alimentação humana e que o ganho de produtividade proveniente da primeira revolução verde parece não ser mais suficiente para garantir a sustentabilidade alimentar no futuro. De acordo com esses cientistas, a produção de arroz deveria ser refletida como uma relação direta entre a fração máxima de energia solar e a quantidade máxima de energia química em grão, no tempo mais curto possível. E, ainda, que essa conversão deve ser alcançada usando uma menor quantidade de terra, água e fertilizantes.

Duas alternativas de pesquisa, referentes a parte anatômica, têm sido propostas para o desenvolvimento do arroz C_4. A primeira delas é baseada na anatomia Kranz (ZHU et al., 2010b; GOWIK; WESTHOFF, 2011; KAJALA et al., 2011) e a segunda, no remanejamento de funções metabólicas a partir de células únicas (LARA et al., 2006; HIBBERD; COVSHOFF, 2010; MIYAO et al., 2011; OFFERMANN et al., 2011a, 2011b). Em relação à primeira opção, a construção da anatomia Kranz no arroz poderia requerer redução no número de células mesofílicas, aumento no número de células da bainha do feixe

vascular, aumento na densidade de organelas no interior das células da bainha do feixe vascular e aumento da densidade do tecido vascular (BROWN; HATTERSLEY, 1989; DENGLER et al., 1994; DENGLER; NELSON, 1999). Na literatura, tem sido citado que o arroz possui uma razão de volume tecido vascular/mesofilo intermediária entre gramíneas C_3 de clima temperado e gramíneas C_4 (UENO et al., 2006). A espessura do mesofilo do arroz possui valor próximo àquele de folhas C_4 (CHONAN, 1970, 1978; DENGLER et al., 1994) e as células da bainha do feixe vascular são bem desenvolvidas, com um modesto número de cloroplastos (CHONAN, 1970, 1978; DENGLER et al., 1994; UENO et al., 2006). Já em 2008, Hibberd et al. descobriram acessos de arroz com uma distância intervenal diminuída e volume ideal dos cloroplastos, dentro das células da bainha do feixe vascular, e propuseram superação no desafio de transformação do arroz, planta C_3, em planta C_4. No entanto, existem relatos contraditórios sobre a anatomia foliar de plantas de arroz encontrados na literatura científica, em que alguns autores como Edwards e Walker (1983) e Cutter (1987) descreveram que folhas de plantas de arroz, semelhantemente às de plantas C_4, possuem células da bainha do feixe vascular desprovidas de cloroplastos; já Matsuo e Hoshikawa (1993) observaram, ao microscópio eletrônico, células da bainha do feixe vascular, em arroz, com presença de cloroplastos e grãos de amido. Pinheiro et al. (2000) detectaram a presença de cloroplastos nas células da bainha vascular da linhagem CNA6189 e consideraram-na promissora para o desenvolvimento de uma variedade de arroz C_4.

Dentro de uma abordagem filogenética, ainda não se tem dados conclusivos relativos à arquitetura das células do mesofilo em arroz e, em decorrência, pode haver restrição à capacidade de evoluir para fotossíntese C_4. Sabe-se que as células do mesofilo foliar de arroz e de outras gramíneas C_3 de clima tropical são distintas das de gramíneas C_3 de clima temperado. Estas últimas possuem vacúolos ocupando a maioria do espaço celular, enquanto que os cloroplastos, peroxissomos e mitocôndrias são posicionados próximos à membrana plasmática. Em 2009, Sage e Sage relataram que, no caso do arroz,

66% do volume do protoplasto é ocupado por cloroplastos, os quais ocupam mais que 95% da periferia celular; outras organelas como mitocôndrias e peroxissomos, em menor número, se encontram intimamente associadas a esses cloroplastos. Dessa forma, esses autores construíram a hipótese de que a arquitetura do clorênquima (tecido parenquimático clorofiliano presente no mesofilo das folhas, contendo grande quantidade de cloroplastos, organelas citoplasmáticas dotadas de clorofila) de arroz aumenta a condutância difusiva de CO_2 e maximiza a eliminação de CO_2 fotorrespirado. A dupla membrana do cloroplasto forma uma barreira física para que o CO_2 fotorrespirado, ao invés de sair da célula, seja refixado pela Rubisco, via Ciclo de Calvin.

O conhecimento sobre a arquitetura genética da fotossíntese C_4 e as redes regulatórias de genes subjacentes são um pré-requisito para que esse empreendimento (engenharia C_4 em arroz) tenha sucesso. Para elucidação dessas redes, diferentes abordagens como levantamentos genéticos com arroz mutagenizado e sorgo, além da genética reversa estão sendo realizadas com a finalidade de identificar genes específicos que conferem certas características às plantas C_4, tais como, ponto de compensação de CO_2 reduzido, alta densidade de vasos e expansão das células da bainha vascular. A análise de transcriptoma, proteoma e metaboloma de diferentes estádios de desenvolvimento das folhas C_4 também auxiliará na compreensão de como a diferenciação foliar de C_4 e o estabelecimento da anatomia Kranz são regulados. A integração bem sucedida desses diferentes dados, a identificação de reguladores-chave peculiares em C_4, e a geração de uma estratégia de como plantas de arroz C_3 deveriam ser geneticamente modificadas para apresentar a rota C_4 devem tornar-se marcos no, relativamente jovem, campo da biologia sintética (MARSHALL et al., 2007; GOWIK; WESTHOFF, 2011).

Referente à segunda opção, desenvolvimento de arroz C_4 a partir de células únicas, numerosas tentativas têm sido feitas para introduzir componentes enzimáticos da fotossíntese C_4 em plantas C_3, como o arroz, tabaco e batata. Essas tentativas foram baseadas no sistema

existente na planta aquática *H. verticillata* (isto é, carboxilação do PEP no citosol de células mesofílicas e descarboxilação de ácidos orgânicos de quatro carbonos no cloroplasto das mesmas células) e na premissa de que o mecanismo concentrador de CO_2, em célula única, poderia operar nas células mesofílicas de folhas de plantas C_3 (LEEGOOD, 2002). A planta C_4 de arroz, célula única, também foi criada por Matsouka et al. (2001); Burnell (2011) e Miyao et al. (2011), em que todos os referidos trabalhos demonstraram que o ciclo C_4 pode ser inserido em células do mesofilo do arroz mas, sem o restante da maquinaria C_4, tal como compartimentalização celular e sistemas de transporte torna-se inviável a geração do arroz C_4. Assim, os esforços para construção da fotossíntese C_4, em célula única, não produziram resultados satisfatórios no aumento da taxa fotossintética e, portanto, na produtividade da planta de arroz (SAGE; ZHU, 2011). Para os pesquisadores Sage e Sage (2009), a anatomia das células mesofílicas do arroz é incompatível com a fotossíntese C_4 em célula única.

Está claro que é improvável obter um grande impacto sobre a taxa fotossintética de plantas C_3 introduzindo uma única enzima ou mesmo uma porção incompleta do ciclo C_4. Contudo, existem evidências que manipulações podem levar a um redirecionamento dos fluxos, como pode ser observado nos trabalhos descritos a seguir. Ku et al. (1999) transformaram plantas de arroz com o gene *PEPC* do milho, obtendo alto nível de expressão do mesmo. A atividade da enzima PEPC foi duas a três vezes maior em folhas do arroz transgênico, mesmo quando comparado ao milho convencional, e a enzima perfez acima de 12% do total de proteínas solúveis da folha. Como resultado desse trabalho, os autores concluíram que, apesar do aumento na quantidade de PEPC, isoladamente, não ocorreu efeito significativo sobre a taxa fotossintética, mas, resultou, por outro lado, na alteração da condutância estomatal. Interessantemente, nos trabalhos iniciais de BJÖRKMAN et al. (1971), com *Atriplex*, os autores já haviam concluído que a atividade elevada da PEPC (aumento acima de 10 vezes) não produziu efeito algum sobre o ponto de compensação de CO_2, taxa fotossintética, ou efeito inibitório do O_2 na fotossíntese.

Em 2000, Suzuki et al. super expressaram uma PEP carboxiquinase (PPCK) da planta C_4, *Urochloa panicoides*, em cloroplastos de células foliares de arroz. Em experimentos com carbono marcado isotopicamente, $^{14}CO_2$, acima de 20% da radioatividade foi incorporada em ácidos orgânicos de quatro carbonos (malato, oxaloacetato e aspartato) em folhas de plantas transgênicas, quando comparado a, aproximadamente, 1% em folhas de plantas convencionais. Quando ^{14}C-malato foi analisado nas folhas, verificou-se que a extensão da incorporação da radioatividade na molécula de sacarose foi três vezes superior nas plantas transgênicas do que nas plantas convencionais e o nível de aspartato marcado, radioativamente, foi significativamente menor em plantas transgênicas. Assim, a expressão de PPCK em cloroplastos de arroz levou a uma alteração no fluxo de carbono em células mesofílicas contendo o caminho fotossintético C_4. Nesse mesmo ano, Takeuchi et al. concluíram que, após transformar o arroz com o gene que expressa a enzima málica dependente de NADP do milho, localmente no cloroplasto, obtiveram estruturas de cloroplastos anormais e aberrantes, com membranas tilacoidais agranais, e uma correlação inversa entre atividade da enzima málica dependente de NADP e a atividade do fotossistema II, bem como com o teor de clorofila. Outros estudos com arroz super expressando essa enzima têm também indicado redução no conteúdo de clorofila, redução do crescimento e fotoinibição intensificada (TSUCHIDA et al., 2001), o que pode ser explicado baseando-se na super-redução do *pool* de NADP, resultante da alta atividade da enzima super expressada *in vivo*.

Em 2004, outro estudo conduzido por Chi e colaboradores mostrou que, após transformação de plantas de arroz com a enzima málica dependente de NADP, foi observado alto nível de expressão do seu gene, mas não foi observada melhoria nas propriedades fotossintéticas relacionadas com a assimilação de CO_2, concluindo que a inserção dessa enzima, isoladamente, não contribuiu para a melhoria do desempenho da fotossíntese em plantas de arroz. Portanto, a introdução de outras enzimas relacionadas ao ciclo C_4, além de NADP-ME, como PEPC e piruvato, ortofosfato diquinase (PPDK), poderia

ser necessária para conduzir a rota fotossintética C_4 em plantas C_3. Estudos adicionais relacionados a esse tema também devem esclarecer a coordenação dos parâmetros necessários para a fotossíntese C_4.

Miyao et al. (2011) descreveram a tentativa de introduzir, em arroz, a rota C_4 em célula única, sistema tipo monomórfico, em que a captura e liberação de CO_2 ocorrem nas células do mesofilo, como a encontrada na planta aquática *Hydrilla verticillata* (Lf) Royle. Quatro enzimas envolvidas nesta rota foram superproduzidas com sucesso nas folhas de arroz transgênico; e 12 diferentes grupos de arroz transgênico que superproduziam estas enzimas, de forma independente ou em combinação, foram produzidos e analisados. Embora nenhum destes transformantes tenha mostrado melhorias no processo fotossintético, estes estudos apresentaram importantes implicações para a evolução de genes fotossintéticos C_4 e sua regulação metabólica, revelando aspectos únicos da fisiologia e metabolismo do arroz. Por exemplo, a atividade de transporte de PEP através da membrana do cloroplasto parece ser a questão mais crítica para o funcionamento da rota C_4 em célula única, em arroz. Adicionalmente, dificuldades com a importação de OAA para os cloroplastos, a direção da reação da enzima málica dependente de NADP e a importância da elevação da atividade de malato desidrogenase dependente de NADP (NADP-MDH) também foram detectados. Esse não é o único caso em que plantas transgênicas mostraram fenótipos inesperados, levando à descoberta de novos mecanismos de regulação e interações metabólicas que não teriam sido descobertos usando as tradicionais abordagens fisiológicas e bioquímicas.

Em 2009, Wang et al. observaram evidências de evolução adaptativa em plantas de arroz que apresentaram genes PEPC de plantas C_4 com significativa abundância de substituições de aminoácidos em regiões com funções específicas e alta taxa Ka/Ks. Ka e Ks são estimados para inferir a taxa de evolução de um gene, sendo Ka a relação entre substituições não sinônimas e todos os possíveis sítios não sinônimos e Ks a relação entre substituições sinônimas e todos os possíveis sítios sinônimos. A taxa Ka/Ks entre espécies é então uma medida clássica

da evolução de maneira global em um gene. Quando o valor de Ka/Ks é maior que um, indica seleção adaptativa ou positiva. Frente aos resultados obtidos, os autores levantaram duas hipóteses: a possível evolução adaptativa observada no gene PEPC em plantas de arroz poderia ser a base para a nova origem da via C_4; ou essa observação indicaria uma adaptação funcional de uma planta que não apresenta o metabolismo C_4.

Alguns tipos de arroz silvestre apresentam características anatômicas peculiares às plantas C_4 e outros tipos têm pontos de compensação de CO_2 usualmente semelhantes aos de plantas intermediárias C_3-C_4 (Sheehy et al., 2007). De acordo com Hibberd e Covshoff (2010), introduzir parte do sistema fotossintético C_4 realizado em uma única célula em células do mesofilo de arroz, mediante a expressão de enzimas-chave do ciclo C_4, tem gerado um ciclo C_4 parcial, com poucos efeitos benéficos. Os autores sugerem que a adição de transportadores associados à rota C_4 nessas linhagens, objetivando aumentar a funcionalidade do ciclo, em sua totalidade e que para se promover o funcionamento apropriado da fotossíntese C_4 seja necessário a compartimentalização espacial observada em plantas do tipo Kranz, devido à interferência na expressão dos genes de plantas C_4 em células específicas. A abordagem transgênica é, portanto, uma poderosa ferramenta para a pesquisa básica em ciência de plantas e que contribuirá com a engenharia metabólica de plantas de arroz (MIYAO et al., 2011).

Em resumo, existem ainda muitos gargalos a serem superados para a inserção da rota C_4 em plantas C_3, como a dificuldade na obtenção de organismo modelo de sistema C_4 e a escassez de estudos filogenéticos, fisiológicos e anatômicos, visando identificar as adaptações fotossintéticas, principalmente de gramíneas C_3. Dentro da abordagem filogenética do arroz, ainda não se tem dados conclusivos relativos a arquitetura das células do mesofilo, essenciais para a determinação de sua capacidade de evolução para fotossíntese C_4 e, como consequência, a obtenção e integração bem sucedida da arquitetura genética e bioquímica da fotossíntese C_4 e redes regulatórias de genes

envolvidos para o estabelecimento de estratégias de transformação genética bem direcionada para a geração do arroz C_4.

A obtenção do arroz C_4 através de métodos biotecnológicos ainda requer o auxílio de métodos de melhoramento de plantas para terminalização da tecnologia. A avaliação de outras características importantes relacionadas a arquitetura de plantas, qualidade de grãos, tolerância a estresses bióticos e abióticos, além de aspectos regulatórios para lançamento de novas variedades, são aspectos importantes que incrementam a chance de sucesso das variedades C_4 junto ao produtor.

Referências

BARKER, N. P.; CLARK, L. G.; DAVIS, J. I.; DUVALL, M. R.; GUALA, G. F.; HSIAO, C.; KELLOGG, E. A.; LINDER, H. P.; MASON-GAMER, R. J.; MATHEWS, S. Y.; SIMMONS, M. P.; SORENG, R. J.; SPANGLER, R. E. Phylogeny and subfamilial classification of the grasses (Poaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 88, n. 3, p. 373-457, 2001.

BJÖRKMAN, O.; NOBS, M.; PEARCY, R.; BOYNTON, J.; BERRY, J. Characteristics of hybrids between C_3 e C_4 species of Atriplex. In: HATCH, M. D.; OSMOND, C. B.; SLATYER, R. O. (Ed.). **Photosynthesis and photorespiration**. New York: Wiley, 1971. p. 105-119.

BRÄUTIGAM, A.; KAJALA, K.; WULLENWEBER, J.; SOMMER, M.; GAGNEUL, D.; WEBER, K. L.; CARR, K. M.; GOWIK, U.; MASS, J.; LERCHER, M. J.; WESTHOFF, P.; HIBBERD, J. M.; WEBER. A. P. M. An mRNA blueprint for C_4 photosynthesis derived from comparative transcriptomics of closely related C_3 and C_4 species. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 155, n. 1, p. 142–156, Jan. 2011a.

BRÄUTIGAM, A.; MULLICK T.; SCHLIESKY, S.; WEBER, A. P. M. Critical assessment of assembly strategies for non-model species mRNA-Seq data and application of next-generation sequencing to the comparison of C_3 and C_4 species. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 9, p. 3093-3102, May 2011b.

BROWN, W. V. Leaf anatomy in grass systematics. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 119, p. 170-178, 1958.

BROWN, R. H.; HATTERSLEY, P. W. Leaf anatomy of C_3-C_4 species as related to evolution of C_4 photosynthesis. **Plant Physiology,** Minneapolis, v. 91, n. 4, p. 1543-1550, Dec. 1989.

BROWN, N. J.; PARSLEY, K.; HIBBERD, J. M. The future of C_4 research - maize, *Flaveria* or *Cleome*? **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 10, n. 5, p. 215-221, May 2005.

BROWN, N. J.; PALMER, B. G.; STANLEY, S.; HAJAJI, H.; JANACEK, S. H.; ASTLEY, H. M.; PARSLEY, K.; KAJALA, K.; QUICK, W. P.; TRENKAMP, S.; FERNIE, A. R.; MAURINO, V. G; HIBBERD, J. M. C_4 acid decarboxylases required for C_4 photosynthesis are active in the mid-vein of the C_3 species *Arabidopsis thaliana*, and are important in sugar and amino acid metabolism. **Plant Journal**, Oxford, v. 61, n. 1, p. 122–133, Jan. 2010.

BRUTNELL, T. P.; WANG, L.; SWARTWOOD, K.; GOLDSCHMIDT, A.; JACKSON, D.; ZHU, X. G.; KELLOGG, E.; VAN ECK, J. *Setaria viridis*: a model for C_4 photosynthesis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, n. 8, p. 2537-2544, 2010.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEN, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. 1367 p.

BURNELL, J. N. Hurdles to engineering greater photosynthetic rates in crop plants: C_4 rice. In: RAGHAVENDRA, A. S.; SAGE, R. F. (Ed.). **C_4 photosynthesis and related CO2 concentrating mechanisms.** Dordrecht: Springer, 2011. p. 361-378.

CAROLIN, R. C.; JACOBS, S. W. L.; VESK, M. The structure of cells of mesophyll and parenchymatous bundle sheath of Gramineae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 66, n. 4, p. 259-275, June 1973.

CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A.; PERES, L. E. P. **Manual de fisiologia vegetal:** teoria e prática. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2005. 650 p.

CHI, W.; ZHOU, J.-S.; ZHANG, F.; WU, N.-H. Photosynthetic features of transgenic rice expressing sorghum C_4 type NADP-ME. **Acta Botanica Sinica**, Peiping, v. 46, n. 7, p. 873-882, July 2004.

CHONAN, N. Comparative anatomy of mesophyll among the leaves of gramineous crops. **JARQ**, Tokyo, v. 12, n. 3, p. 128-131, 1978.

CHONAN, N. Studies on the photosynthetic tissues in the leaves of cereal crops. V. Comparison of the mesophyll structure among seedling leaves of cereal crops. **Proceedings of the Crop Science Society of Japan**, Tokyo, v. 39, p. 418-425, 1970.

CHRISTIN, P. A.; SALAMIN, N.; KELLOGG, E. A.; VINCENTINI, A.; BESNARD, G. Integrating phylogeny into studies of C_4 variation in the grasses. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 149, n. 1, p. 82-87, Jan. 2009.

CHUONG, S. D. X.; FRANCESCHI, V. R.; EDWARDS, G. E. The cytoskeleton maintains organelle partitioning required for single-cell C_4 photosynthesis in Chenopodiaceae species. **The Plant Cell**, Rockville, v. 18, n. 9, p. 2207–2223, Sept. 2006.

CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal:** órgãos, experimentos e interpretação. São Paulo: Roca, 1987. 336 p.

DENGLER, N. G.; NELSON, T. Leaf structure and development in C_4 plants. In: SAGE, R. F.; MONSON, R. K. (Ed.). **C_4 plant biology**. San Diego: Academic Press, 1999. p. 133-172.

DENGLER, N. G.; DENGLER, R. E.; DONNELLY, P. M.; HATTERSLEY, P. W. Quantitative leaf anatomy of C_3 and C_4 grasses (Poaceae)-bundle-sheath and mesophyll surface-area relationships. **Annals of Botany,** London, v. 73, n. 3, p. 241-255, Mar. 1994.

EDWARDS, G.; WALKER, D. **Mechanisms, and celular and environmental regulation of photosynthesis.** Oxford: Blackwell, 1983. 542 p.

EDWARDS, G. E.; FURBANK, R. T.; HATCH, M. D.; OSMOND, C. B. What does it take to be C_4? Lessons from the evolution of C_4 photosynthesis. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 125, n. 1, p. 46–49, Jan. 2001.

EDWARDS, G. E.; FRANCESCHI, V. R.; VOZNESENSKAYA, E. V. Single-cell C_4 photosynthesis versus the dual-cell (Kranz) paradigm. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 173–196, 2004.

FAO pide apoyo para desarrollar producción de arroz C4. ONU 2006. Disponível em: <http://www.un.org/spanish/News/fullstorynews.asp?newsID=7588>. Acesso em: 20 mar. 2012.

GOWIK, U.; WESTHOFF, P. The path from C_3 to C_4 photosynthesis. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 155, n. 1, p. 56–63, Jan. 2011.

HIBBERD, J. M.; COVSHOFF, S. The regulation of gene expression required for C_4 photosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 61, p. 181–207, 2010.

HIBBERD, J. M.; QUICK, W. P. Characteristics of C_4 photosynthesis in stems and petioles of C_3 flowering plants. **Nature**, London, v. 415, n. 6870, p. 451-454, Jan. 2002.

HIBBERD, J. M.; SHEEHY, J. E.; LANGDALE, J. A. Using C_4 photosynthesis to increase the yield of rice—rationale and feasibility. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 2, p. 228–231, Apr. 2008.

INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. **C_4 rice to contribute greatly to second green revolution.** 2010. Disponível em: <http://irri.org/partnerships/networks/c4-rice/c4-rice-news/c4-rice-to-contribute-greatly-to-second-green-revolution>. Acesso em: 9 maio 2011.

KAJALA, K.; COVSHOFF, S.; KARKI, S.; WOODFIELD, H.; TOLLEY, B. J.; DIONORA, M. J. A.; MOGUL, R. T.; MABILANGAN, A. E.; DANILA, F. R.; HIBBERD, J. M.; QUICK, W. P. Strategies for engineering a two-celled C_4 photosynthetic pathway into rice. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 9, p. 3001-3010, May 2011.

KELLOGG, E. A. Classification of the grass family. In: MALLETT, K.; ORCHARD, E. A. (Ed.). **Flora of Australia:** Poaceae 1 - introduction and atlas. Melbourne: CSIRO, 2002. v. 43, p. 19-36.

KU, M. S. B.; SAKAE, A.; MIKA, N.; HIROSHI, F.; HIROKO, T.; KAZUKO, O.; SAKIKO, H.; SEIICHI, T.; MITSVE, M.; MAKOTO, M. High level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 17, n. 1, p. 76–80, Jan. 1999.

LAMBERS, H.; CHAPIN III, F. S.; PONS, T. L. **Plant physiological ecology**. 2nd ed. New York: Springer, 2008. 604 p.

LARA, M. V.; CHUONG, S. D. X.; AKHANI, H.; ANDREO, C. S.; EDWARDS, G. E. Species having C_4 single-cell-type photosynthesis in the Chenopodiaceae family evolved a photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase like that of Kranz-type C_4 species. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 142, n. 2, p. 673–684, Oct. 2006.

LEEGOOD, R. C. C_4 photosynthesis: principles of CO_2 concentration and prospects for its introduction into C_3 plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 369, p. 581-590, Apr. 2002.

LI, P.; BRUTNELL, T. P. Setaria viridis and Setaria italica, model genetic systems for the Panicoid grasses. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 9, p. 3031-3037, May 2011.

LONG, S. P. Environmental responses. In: SAGE, R. F.; MONSON, R. K. (Ed.). **C_4 plant biology**. San Diego: Academic Press, 1999. p. 215-249.

MARSHALL, D. M.; MUHAIDAT, R.; BROWN, N. J.; LIU, Z.; STANLEY, S.; GRIFFITHS, H.; SAGE, R. F.; HIBBERD, J. M. Cleome, a genus closely related to Arabidopsis, contains species spanning a developmental progression from C_3 to C_4 photosynthesis. **Plant Journal,** Oxford, v. 51, n. 5, p. 886–896, Sept. 2007.

MARTINOTTO, C.; OLIVEIRA, L. M.; PAIVA, R. O balanço de carbono nas plantas. In: PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M. (Ed.). **Fisiologia e produção vegetal.** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2006. p. 50-70.

MATSOUKA, M.; FURBANK, R. T.; FUKAYAMA, H.; MIYAO, M. Molecular engineering of C_4 photosynthesis**. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 297-314, 2001.

MATSUO, T.; HOSHIKAWA, K. **Science of the rice plant:** morphology. Tokyo: Food and Agriculture Policy Research Center, 1993. 688 p.

MITCHELL, P. L.; SHEEHY, J. E. Supercharging rice photosynthesis to increase yield. **New Phytologist**, Cambridge, v. 171, n. 4, p. 688-693, 2006.

MIYAO, M. Molecular evolution and genetic engineering of C_4 photosynthetic enzymes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 381, p. 179-189, Jan. 2003.

MIYAO, M.; MASUMOTO, C.; MIYAZAWA, S.; FUKAYAMA, H. Lessons from engineering a single-cell C_4 photosynthetic pathway into rice. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 9, p. 3021–3029, May 2011.

OFFERMANN, S.; OKITA, T. W.; EDWARDS, G. E. How do single cell C_4 species form dimorphic chloroplasts? **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 5, p. 762-765, May 2011a.

OFFERMANN, S.; OKITA, T. W.; EDWARDS, G. E. Resolving the compartmentation and function of C_4 photosynthesis in the single-cell C_4 species *Bienertia sinuspersici*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 155, n. 4, p. 1612–1628, Apr. 2011b.

PINHEIRO, F. J. A.; PORTES, T. de A.; STACCIARINI-SERAPHIN, E. Procurando um arroz C_4 mediante exame anatômico foliar. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, v. 12, n. 3, p. 246-254, set./dez. 2000.

PRICE, G. D.; BADGER, M. R.; CAEMMERER, S. The prospect of using cyanobacterial bicarbonate transporters to improve leaf photosynthesis in C_3 crop plants. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 155, n. 1, p. 20–26, Jan. 2011.

RAINES, C. A. Increasing photosynthetic carbon assimilation in C_3 plants to improve crop yield: current and future strategies. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 155, n. 1, p. 36-42, Jan. 2011.

RAINES, C. A.; PAUL, M. J. Products of leaf primary carbon metabolism modulate the developmental programme determining plant morphology. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 9, p. 1857–1862, Jun. 2006.

SAGE, R. F. Environmental and evolutionary preconditions for the origin and diversification of the C4 photosynthetic syndrome. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 3, n. 3, p. 202-213, May 2001.

SAGE, R. F. The evolution of C_4 photosynthesis. **New Phytologist**, Cambridge, v. 161, n. 2, p. 341–370, Feb. 2004.

SAGE, T. L.; SAGE, R. F. The functional anatomy of rice leaves: implications for refixation of photorespiratory CO_2 and efforts to engineer C_4 photosynthesis into rice. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 50, n. 4, p. 756–772, Apr. 2009.

SAGE, R. F., ZHU, X-G. Exploiting the engine of C_4 photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 9, p. 2989-3000, May 2011.

SHEEHY, J. E.; MITCHELL, P. L.; HARDY, B. **Charting new pathways to C_4 rice**. Los Baños: International Rice Research Institute, 2007. 422 p.

SMITH, A. M.; STITT, M. Coordination of carbon supply and plant growth. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 30, n. 9, p. 1126–1149, Sept. 2007.

STITT, M.; LUNN, J.; USADEL, B. Arabidopsis and primary photosynthetic metabolism – more than the icing on the cake. **Plant Journal**, Oxford, v. 61, n. 6, p. 1067–1091, Mar. 2010.

SUZUKI, S.; MURAI, N.; BURNELL, J. N.; ARAI, M. Changes in photosynthetic carbon flow in transgenic rice plants that express C_4-type phosphoenolpyruvate carboxykinase form *Urochloa panicoides*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 124, n. 1, p. 163-172, Sept. 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TAKEUCHI, Y.; AKAGI, H.; KAMASAWA, N.; OSUMI, M.; HONDA, H. Aberrant chloroplasts in transgenic rice plants expressing a high level of maize NADP-dependent malic enzyme. **Planta**, Berlin, v. 211, n. 2, p. 265-274, July 2000.

TSUCHIDA, H.; TAMAI, T.; FUKAYAMA, H. High level expression of C_4-specific NADP-malic enzyme in leaves and impairment of photoautotrophic growth in a C_3 plant, rice. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 42, n. 2, p. 138-145, Feb. 2001.

UENO, O.; KAWANO, Y.; WAKAYAMA, M.; TAKEDA, T. Leaf vascular systems in C_3 and C_4 grasses: a two-dimensional analysis. **Annals of Botany**, London, v. 97, n. 4, p. 611-621, Apr. 2006.

WANG, X.; GOWIK, U.; TANG, H.; BOWERS, J. E.; WESTHOFF, P.; PATERSON, A.H. Comparative genomic analysis of C_4 photosynthetic pathway evolution in grasses. **Genome Biology**, v. 10, n. 6, p. R68, 2009.

ZEIGLER, R. S. Foreword. In: SHEEHY, J. E.; MITCHELL, P. L.; HARDY, B. (Ed.). **Charting new pathways to C_4 rice**. Los Baños: International Rice Research Institute, 2007. p. v-vi.

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

ZHU, X-G.; SHAN, L.; WANG, Y.; QUICK, W. P.C_4 rice – an ideal arena for systems biology research. **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijing, v. 52, n. 8, p. 762–770, Aug. 2010b.