

**EFEITOS PLEIOTRÓPICOS EM PLANTAS TRANSGÊNICAS DE
BATATA (*Solanum tuberosum* L.) Cv. BINTJE ASSOCIADOS À
EXPRESSÃO DA LEGHEMOGLOBINA DE SOJA
NO INTERIOR DOS CLOROPLASTOS.**

ALEJANDRO CHAPARRO GIRALDO

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **MÁRCIO C. SILVA-FILHO**

Teses apresentada à Escola superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz",
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Doutor em Agronomia, Área
de Concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Dezembro de 1999

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Ghapparro-Giraldo, Alejandro

Efeitos pleiotrópicos em plantas transgênicas de batata (*Solanum tuberosum* L.) Cv. Bintje associados à expressão de leghemoglobina de soja no interior dos cloroplastos / Alejandro Chaparro-Giraldo. -- Piracicaba, 1999.

103 p. : il

Tese (Doutorado) -- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1999.
Bibliografia

1. Batata 2. Cloroplasto 3. Leghemoglobina 4. Planta Transgênica 5. Pleiotropia 6. Soja I. Título

CDD 633.491

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - O Autor"

**À ALBA LUCERO E LEON FELIPE,
CÉU E LUZ DA MINHA VIDA.**

OFEREÇO

**AOS SEM-TERRA DA AMÉRICA LATINA,
POR QUE ELES A HERDARÃO ALGUM DIA.**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Márcio de Castro Silva Filho pela orientação, apoio, amizade e paciência durante a realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo do Departamento de Genética da ESALQ-USP pela participação na obtenção de resultados;

Ao Prof. Dr. Carlos Tadeu dos Santos Dias do Departamento de Estatística da ESALQ-USP pelo auxílio nas análises estatísticas;

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas pela convivência, amizade e incentivo em todos os momentos, em especial ao técnico Rafael Colombi pelo auxílio e amizade;

Ao Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pelo apoio financeiro;

Ao Departamento de Genética da ESALQ - USP por me acolher como um dos seus, mesmo sendo um estrangeiro;

À comunidade de estudantes estrangeiros da ESALQ-USP por compartilhar comigo as dificuldades próprias de nossa condição;

Aos funcionários do Setor de Biblioteca Central e do Departamento de Genética da ESALQ-USP, pelos auxílios prestados.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	viii
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xi
1 -INTRODUÇÃO.....	14
2 -REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 -As hemoglobinas vegetais.....	17
2.2 -O estresse oxidativo nas plantas.....	20
2.3 -Relações entre a leghemoglobina de soja e enzimas envolvidas no estresse oxidativo.....	23
2.4 -Síntese de amido e acarose.....	24
2.5 -Transformação mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	26
2.6 -Direcionamento de proteínas aos cloroplastos.....	27
3 -MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 -Cultura de tecidos e micropropagação.....	28
3.2 -Ensaio de resistência ao estresse abiótico.....	29
3.3 -Transferência para a casa de vegetação e produção de minitubérculos.....	29
3.4 –Sistema de transformação via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	29
3.4.1 -Material vegetal.....	29
3.4.2 -Construção gênica.....	30
3.4.3-Condições de crescimento da <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	30
3.4.3 -Condições do cocultivo.....	31
3.4.4 -Condições de seleção e regeneração.....	31
3.5 -Caracterização molecular das plantas transgênicas.....	32
3.5.1 -PCR.....	32
3.5.2 -RT-PCR.....	33
3.5.3 -Western Blotting.....	34
3.5.4 -Fracionamento celular.....	36

3.6 -Determinação de o teor de sacarose e amido.....	37
3.6.1 -Preparo do extrato foliar.....	37
3.6.2 -Determinação de feofitina.....	38
3.6.3Determinação do conteúdo de sacarose.....	38
3.6.4 -Determinação do conteúdo de amido.....	39
3.7 -Determinação do teor de clorofila.....	40
3.8 -Determinação das atividades das enzimas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo.....	40
3.8.1 -Material Vegetal.....	41
3.8.2 -Determinação da atividade CAT.....	41
3.8.3 -Determinação da atividade GR.....	41
3.8.4 -Géis de atividade CAT e SOD.....	42
3.8.4 -Determinação das isoformas de SOD.....	43
3.9 -Determinação de caracteres fenotípicos.....	43
3.10 -Análises estatísticas e transformação de dados.....	44
4. -RESULTADOS	46
4.1 -Obtenção das plantas transgênicas.....	46
4.2 -Caracterização molecular das plantas transgênicas de batata.....	47
4.2.1 -PCR.....	47
4.2.2 -RT-PCR.....	47
4.2.3 -Western Blotting.....	47
4.3 -Análises das plantas transgênicas em condições de casa de vegetação.....	49
4.3.1 -Atividade da CAT, GR e SOD.....	49
4.3.2 -Atividade CAT.....	50
4.3.2 -Atividade GR.....	50
4.3.4 -Atividade SOD.....	50
4.3.2 -Conteúdo de clorofila.....	53
4.3.3 -Peso fresco da parte aérea.....	55
4.3.4 -Produção de tubérculos.....	55
4.3.5 -Teor de sacarose e amido	58

4.4 -Análises das plantas transgênicas em cultivadas <i>in vitro</i>	58
4.4.1 -Número de nós.....	60
4.4.2 -Microtuberização.....	60
4.5 -Análises das plantas transgênicas em condições de estresse salino.....	62
4.5.1 - Atividade da CAT e GR	64
4.5.2 -Peso fresco das plântulas.....	64
4.5.2 -Altura das plântulas.....	64
5 -DISCUSSÃO.....	66
5.1 -Produção das plantas transgênicas de batata.....	66
5.2 -A expressão da Lb nos cloroplastos de batata não afeta as atividades da CAT, GR e SOD.....	67
5.3 -A expressão da Lb nos cloroplastos de batata afeta o desenvolvimento das plantas transgênicas em condições de casa de vegetação.....	68
5.4 A expressão da Lb nos cloroplastos de batata afeta o número de nós e induz a microtuberização espontânea em plântulas cultivadas <i>in vitro</i>	70
5.5 A expressão da Lb nos cloroplastos de batata afeta a resposta das plântulas ao estresse salino <i>in vitro</i>	72
5.6 As diversas alterações associadas à expressão da Lb nos cloroplastos de batata podem ser resultado de efeitos pleiotrópicos do transgene.....	73
6. CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
ANEXOS.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP = adenosina di-fosfato

AGPase = ADP-glucose pirofosforilase

AOS = espécies ativas de oxigênio

APx = ascorbato peroxidase

ATP = adenosina tri-fosfato

BSA = soro da albumina bovina

CaMV = vírus do mosaico do couve-flor

CAT = catalase

DTT = ditioneitol

EDTA = ácido etilenodiaminotetra acético sal dissódico

Fd = ferredoxina

G6-P = glicose 6-fosfato

G6-Pdh = glicose 6-fosfato desidrogenase

GR = glutationa redutase

HEPES = ácido N (2-hidroxi)etil piperazine N (2-etanosulfônico)

kDa = kilo Dalton

Lb⁺² = leghemoglobina no estado ferroso (reduzido)

Lb⁺³ = leghemoglobina no estado férrico (oxidado)

lb = gene da leghemoglobina de soja

Lb = leghemoglobina de soja

MÊS = ácido 2 (N-morfolino)etano-sulfônico

NADH = nicotinamida adenina binucleotídeo (forma reduzida)

NAD(P)H = nicotinamida adenina binucleotídeo (fosfato) (forma reduzida)

pb = pares de bases

PBS = tampão fosfato salino

PCR = reação em cadeia da polimerase

RT-PCR = PCR reversa

3-PGA = ácido 3-fosfoglicérico

Pi = fosfato inorgânico

ppm = partes por milhão

(p/v) = peso / volume

(v/v) = volume/volume

PVP = polivinil pirrolidona

rbcS = subunidade menor da rubisco

rpm = rotações por minuto

Rubisco = ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase

SDS = sódio dodecil sulfato

SOD = superóxido dismutase

TBS = tampão tris salino

T-DNA = DNA de transferencia

Tris = tris(hidroximetil)aminometano

Tween = polioxietilenosorbitol

UDP = uridina difosfato

**EFEITOS PLEIOTRÓPICOS EM PLANTAS TRANSGÊNICAS DE
BATATA (*Solanum tuberosum* L.) Cv. BINTJE ASSOCIADOS À EXPRESSÃO
DA LEGHEMOGLOBINA DE SOJA NO INTERIOR DOS CLOROPLASTOS.**

Autor: ALEJANDRO CHAPARRO GIRALDO

Orientador: Prof. Dr. MÁRCIO C. SILVA-FILHO

RESUMO

O oxigênio atua como substrato ou cofator em muitas reações bioquímicas tanto no metabolismo primário quanto no secundário no reino vegetal. A principal forma de acelerar os processos bioquímicos dependentes de oxigênio nas plantas é elevar a concentração externa desse gás. Porém, em termos econômicos, é praticamente inviável de ser realizado em grande escala. Uma alternativa para contornar esse problema é aumentar a disponibilidade de uma proteína cuja característica baseia-se na alta afinidade por oxigênio. As hemoglobinas vegetais (Hbs) estão amplamente distribuídas nas plantas e geralmente, apresentam uma alta afinidade pelo oxigênio. Elas podem ser divididas em dois grupos: simbiontes e não simbiontes. Dentro do tipo simbionte encontra-se a leghemoglobina de soja (Lb), que apresenta uma das maiores afinidades pelo oxigênio. Um local interessante para alterar a disponibilidade do O₂ é o interior do cloroplasto, devido a sua participação nos processos metabólicos básicos.

Com o objetivo de alterar a disponibilidade de oxigênio no interior dos cloroplastos, foi introduzido no genoma da batata (*Solanum tuberosum* L.) via *Agrobacterium tumefaciens*, uma construção quimérica constituída pelo gene (*lb*) que codifica a leghemoglobina de soja, ligado à seqüência de direcionamento aos cloroplastos da subunidade pequena da Rubisco de ervilha (*Pisum sativum* L.), sob o controle do promotor 35S do CaMV.

A partir de discos de minitubérculos cocultivados com *Agrobacterium* obtiveram-se plântulas regeneradas em meios seletivos, que foram analisadas por PCR, RT-PCR e Western Blotting, demonstrando-se o caracter transgênico dos regenerantes. Análises de imunodeteção em frações enriquecidas de cloroplastos revelaram que a Lb foi eficientemente importada e corretamente processada no interior dos cloroplastos da batata transgênica.

Não foram detectadas modificações nas atividades das enzimas CAT, SOD e GR nas plantas transformadas em condições da casa de vegetação e em condições de estresse salino *in vitro*. Porém, foram verificadas alterações negativas no desenvolvimento e produção de tubérculos, assim como alterações na síntese de amido, em condições de casa de vegetação. Aumento no número de nós e indução de microtuberização espontânea foram características detectadas nas plantas transgênicas cultivadas *in vitro*. Plântulas transgênicas submetidas à uma concentração de 100 mM de NaCl em condições *in vitro* demonstraram uma maior susceptibilidade ao estresse salino do que plantas controle. Os resultados sugerem que a Lb de soja no interior dos cloroplastos promove efeitos pleiotrópicos nas plantas transgênicas de batata, provavelmente criando condições estressantes ao seu desenvolvimento e metabolismo.

**PLEIOTROPIC EFFECTS IN TRANSGENIC POTATO PLANTS ASSOCIATED
WITH THE EXPRESSION OF THE SOYBEAN LEGHEMOGLOBIN INSIDE
THE CHLOROPLASTS**

Author: ALEJANDRO CHAPARRO GIRALDO

Adviser: MARCIO C. SILVA-FILHO

SUMMARY

Oxygen acts as a cofactor or substrate in many biochemical processes in both primary and secondary plant metabolism. One possible way to increase oxygen availability inside the cell in order to stimulate oxygen-dependent reactions, is through oxygen binding proteins which increase the intracellular oxygen concentration. Plant hemoglobins (Hbs) are largely widespread in the plant kingdom, and generally display a high affinity to oxygen. Hbs may be classified into two broad groups: symbiotic and nonsymbiotic types. Symbiotic Hbs have been extensively characterized in legume plants and are involved with the facilitation of oxygen diffusion within infected tissues. One of the best studied and characterized class of symbiotic Hbs is the soybean leghemoglobin (Lb), which represent a small family of closely related genes. Soybean Lb accumulates in high levels in infected tissue and has a high avidity for oxygen and a relatively fast oxygen-dissociation rate which permits low cellular concentration of free oxygen.

In order to verify whether the presence of the symbiotic soybean Lb inside the potato chloroplasts would interfere on aerobic metabolism in the transgenic plants, a chimeric gene made by the fusion of the soybean leghemoglobin with the chloroplastic targeting sequence from the small subunit precursor of Rubisco (*rbcS*) from pea, was introduced into potato genome via *Agrobacterium tumefaciens ti*-derived vector. Transgenic plants were analysed by PCR, and Lb expression was further monitored by RT-PCR. Western Blotting in a chloroplastic-enriched fraction from transgenic potato plants showed that Lb was imported and correctly processed inside the

organelle. Analysis of CAT, SOD and GR enzyme activities involved in the protection against oxidative stress damage were not affected by the presence of soybean Lb. Besides, carbohydrate levels from transgenic and control plants were not altered. On the other hand, plant growth, development and tuberization, were significantly reduced as well as plant growth in saline conditions, suggesting that Lb expression inside the chloroplasts promotes pleiotropic effects on transgenic potato plants.

1 - INTRODUÇÃO

O oxigênio, que é um substrato essencial para o metabolismo respiratório, passa através da membrana plasmática para todos os compartimentos da célula e atua como substrato ou cofator em muitas reações bioquímicas do metabolismo primário e secundário das plantas. Uma forma de acelerar os processos dependentes de oxigênio nas plantas é aumentar o fluxo de O₂ para as plantas. Porém, este processo é inviável de ser realizado em grande escala devido ao fator econômico. Uma alternativa para contornar esse problema é introduzir no interior das células uma proteína que apresente alta afinidade pelo oxigênio. Evidências experimentais têm mostrado que as proteínas conhecidas genericamente como hemoglobinas (Hbs) estão presentes em praticamente todas as espécies vegetais e são divididas em dois grupos. Primeiro, encontra-se o tipo simbiote de Hb que é encontrado predominantemente nas células infectadas dos nódulos fixadores de nitrogênio de leguminosas, facilitando o transporte de oxigênio. Segundo, tem-se o tipo não simbiote que é o mais amplamente distribuído no reino vegetal e parece ser o ancestral do tipo simbiote (Arrendondo-Peter et al., 1998). Uma das Hbs simbiotes mais estudadas é a Leghemoglobina de Soja (Lb) (Appleby, 1984), que mostra uma das mais altas afinidades pelo oxigênio dentro das Hbs (Gibson et al., 1989). No caso de desejar alterar a disponibilidade do oxigênio na célula vegetal um dos locais para se fazê-lo é o interior dos cloroplastos, devido à existência de diversas reações metabólicas dependentes de oxigênio.

Com o uso das técnicas de biologia molecular para transferência de genes entre organismos de diversas origens e as novas descobertas na área de direcionamento de proteínas à organelas sub-celulares, introduziu-se dentro do genoma da batata (*Solanum tuberosum*) cultivar Bintje um gene quimérico composto pelo gene

lb (que codifica para a leghemoglobina *a* de soja), fusionado à seqüência de direcionamento ao cloroplasto da subunidade menor da Rubisco (*rbcS*) de ervilha, com o objetivo de alterar o metabolismo do oxigênio nas células da batata (Barata, 1999). A batata foi escolhida por ser uma espécie que tem nos tubérculos uma maneira fácil de medir efeitos da transformação na produção, além disso, apresenta uma mudança fisiológica aos 40 dias pelo início da tuberização. O metabolismo da batata possui um mecanismo de drenagem forte dos fotossintatos das folhas para os tubérculos, efeito que faz essa espécie um ótimo modelo para testar genes com potenciais efeitos na produção.

Os mecanismos de oxido-redução da Lb nos nódulos de soja têm sido extensivamente estudados, encontrando-se que eles podem produzir espécies de oxigênio reativo (superóxido, peróxido e radical hidróxido) e interferir com algumas das enzimas envolvidas no estresse oxidativo, como a: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione redutase (GR) (Puppo et al., 1982; Puppo & Halliwell, 1988; Becana e Klucas, 1990 e 1992; Dalton et al., 1991). Recentemente foi proposto para a Lb, além da oxigenação, uma atividade semelhante à apresentada pela CAT, no caso de interagir com doadores de elétrons (Becana & Klucas, 1992). O estudo das atividades das enzimas CAT, SOD e GR nas plantas transgênicas de batata, foi então uma parte necessária neste trabalho, tanto em condições normais de cultivo quanto em condições de estresse. Por outro lado, Holmberg e colaboradores (1997) relataram efeitos positivos em plantas de tabaco transformadas com o gene bacteriano da hemoglobina de *Vitreoscilla* (VHb). No entanto, resultados contrastantes foram recentemente obtidos com a expressão da Lb de soja nos cloroplastos de fumo, os quais mostraram que não ocorreram diferenças significativas no metabolismo das plantas (Barata et al., 2000). Portanto, o estudo da Lb em uma outra espécie vegetal como a batata pode fornecer subsídios para o entendimento do(s) efeito(s) da proteína sobre a fisiologia da planta a partir da expressão heteróloga.

O sucesso da transformação da batata foi conseguida após algumas pequenas modificações no protocolo que utiliza discos de tubérculo (Dale & Hampson, 1995). Por meio de técnicas de PCR e RT-PCR foi demonstrado que o gene *lb* foi inserido no genoma da batata e transcrito corretamente. Usando metodologias de

imunodeteccão junto com protocolos de fracionamento subcelular, demonstrou-se que a Lb foi corretamente importada e processada no interior dos cloroplastos.

A atividade das enzimas CAT , SOD e GR não foram alteradas nas plantas transgênicas quando comparadas com plantas controle não transformadas, tanto em condições da casa de vegetação como em condições de estresse salino *in vitro*. Já a expressão da Lb nos cloroplastos de batata, esteve associada com alterações negativas no desenvolvimento e produção de tubérculos, assim como com alterações na síntese de amido, em condições de casa de vegetação. O aumento no número de nós e a indução de microtuberização espontânea foram características detectadas nas plantas transgênicas cultivadas *in vitro*. Testes de resistência ao estresse salino, também *in vitro*, demonstraram uma maior susceptibilidade das plântulas das linhagens transformadas. Detectadas alterações diversas e em diferentes condições, é possível propor que elas sejam causadas por efeitos pleiotrópicos do transgene agindo em diversos níveis no metabolismo do oxigênio.

2.-.REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Hemoglobinas vegetais

As hemoglobinas (Hbs) vegetais são proteínas que estão amplamente distribuídas em plantas superiores. Por comparação de seqüência, padrões de expressão e propriedades cinéticas de associação/dissociação, as Hbs podem ser divididas em dois grandes grupos. O tipo simbiótico de Hbs encontra-se predominantemente nas células infectadas de nódulos fixadores de nitrogênio de leguminosas e não leguminosas, onde sua função é facilitar o transporte de oxigênio. O segundo grupo de hemoglobinas vegetais é representado pelas Hbs não simbióticas que parece ser o ancestral das Hbs simbióticas (Arredondo-Peter et al., 1998). As Hbs não simbióticas estão mais extensivamente distribuídas no reino vegetal e, geralmente, mostram uma alta afinidade pelo oxigênio (Arredondo-Peter et al., 1998).

A principal função das Hbs simbióticas está relacionada à difusão de oxigênio dentro dos tecidos infectados (Appleby, 1988). Esta característica é evidenciada pelo acúmulo de Hb funcional nos tecidos alvo com uma alta afinidade pelo oxigênio e uma relativamente lenta taxa de dissociação de oxigênio, o que permite baixas concentrações celulares de oxigênio livre e um fluxo razoável do mesmo dentro dos tecidos fixadores de nitrogênio (Arredondo-Peter et al., 1998). Esse rápido bombeamento do oxigênio pela Lb favorece a hipoxia no interior do bacterióide, fazendo com que esta molécula não interfira na atividade da enzima nitrogenase, responsável pela fixação do N₂ atmosférico. Caso a nitrogenase associe-se ao oxigênio, ela é inativada irreversivelmente (Appleby, 1988).

Dentre as Hbs simbióticas de leguminosas, as leghemoglobinas (Lbs) são as mais estudadas. As Lbs pertencem a uma pequena família multigênica (Brisson & Verma, 1982) e são codificadas por genes que apresentam três íntrons. O primeiro e terceiro íntrons estão em posições similares às dos íntrons de genes de Hb de vertebrados, sugerindo que as Hbs vegetais e animais são derivadas de um ancestral comum (Appleby, 1988). Foram encontradas quatro variantes de Lb (Lba, LbC1, LbC2, LbC3) que se diferenciam nas seqüências de aminoácidos (Grierson & Covey, 1991). Além disso, foram descritas três hemoproteínas modificadas derivadas de Lba (Lbam1, Lbam2, Lbam3) (Jun et al., 1994).

A Lb é uma proteína do grupo da mioglobina, encontrada em grandes quantidades (20-30%) nos nódulos das raízes, resultado da associação simbiótica *Rhizobium*-leguminosa. A função mais provável da Lb é a regulação da tensão intranodular do oxigênio e a sua presença está relacionada à atividade da nitrogenase rizobial. O grupo prostético heme da Lb é de origem bacteriana e a planta contém todos os determinantes genéticos para a apoproteína (Verma et al, 1974).

A Lb apresenta um processo reversível de cinética de oxidação/redução do ferro do grupo heme. Para unir-se reversivelmente ao O₂, a Lb deve encontrar-se em sua forma ferrosa (Fe⁺²) (Jun et al., 1994). As reações gerais que afetam a função da Lb foram revisadas por Becana e Klucas (1992). Estes autores mostraram que dependendo das condições internas do nódulo, tais como: pH ácido, presença de íons metálicos, agentes quelantes e metabólitos tóxicos (nitrito, superóxido e peroxidases), ocorre a mudança da Lb⁺² reduzida (capaz de ligar-se ao O₂) para a forma férrica não funcional Lb⁺³. No entanto, existe um sistema enzimático capaz de operar a conversão da forma férrica Lb⁺³ na forma funcional ferrosa. Trata-se da leghemoglobina férrica redutase (Ji et al., 1994).

Nos últimos anos foram sugeridas funções adicionais, diferentes do transporte de oxigênio para as Hbs de diversas origens. Hbs animais são conhecidas por possuírem um amplo leque de funções: (a) transdução de calor através do ciclo oxigenação/desoxigenação, (b) modulação do metabolismo de eritrócitos, (c) união aos canais iônicos proteicos, (d) fonte de catabólitos fisiologicamente ativos (e) como

proteína multifuncional (Giardina et al., 1995; Goldberg, 1995). Além disso, existe evidência indireta de que a Hb de *Vitreoscilla* pode funcionar como sensor de oxigênio (Joshi & Dikshit, 1994) ou como uma oxidase terminal (Dikshit et al., 1992). A comparação de seqüência indica que Hb de *Vitreoscilla* é mais homóloga às Hbs vegetais que às Hbs animais (Arredondo-Peter & Escamilla, 1991), sugerindo que Hbs ancestrais de plantas poderiam ter funções similares à Hb de *Vitreoscilla*. Holmberg et al. (1997) produziram plantas transgênicas de tabaco expressando a Hb de *Vitreoscilla*. A análise das plantas transgênicas mostrou um aumento de peso seco e no teor da clorofila, além de tempos de germinação e florescimento menor que as das plantas controle. A presença de Hb também foi capaz de afetar o metabolismo secundário das plantas transgênicas, via aumento dos níveis de nicotina e anabasina.

É muito provável que as Hbs vegetais não simbióticas estejam envolvidas em várias vias metabólicas, como é proposto por Arredondo-Peter et al. (1998). A via 1 (Figura 1), mostra possíveis interações quando Hbs não simbióticas unem-se a pequenas moléculas conhecidas como ligantes (O_2 , CO e NO). Estas uniões poderiam ser influenciadas por interações com outras moléculas celulares, modificando as constantes de associação e dissociação para unir-se a ligantes e alterando suas funções como transportador ou sensor do O_2 . Inversamente, cada interação poderia produzir moléculas com diferentes atividades, como por exemplo, complexos inibidor/ativador de enzimas. A via 2 (Figura 1) mostra que Hbs poderiam unir-se a pequenas moléculas orgânicas e então funcionar como transportadoras de ácidos graxos ou, quando em condições anaeróbicas, participar na síntese de compostos orgânicos. A via 3 (Figura 1) indica que Hb não simbiótica poderia funcionar como processador de espécies reativas de O_2 , proposta baseada na extremamente forte ligação ao O_2 . Estas funções poderiam ter permitido ao microorganismo anaeróbio primitivo adaptar-se a níveis crescentes de oxigênio resultado do processo fotossintético.

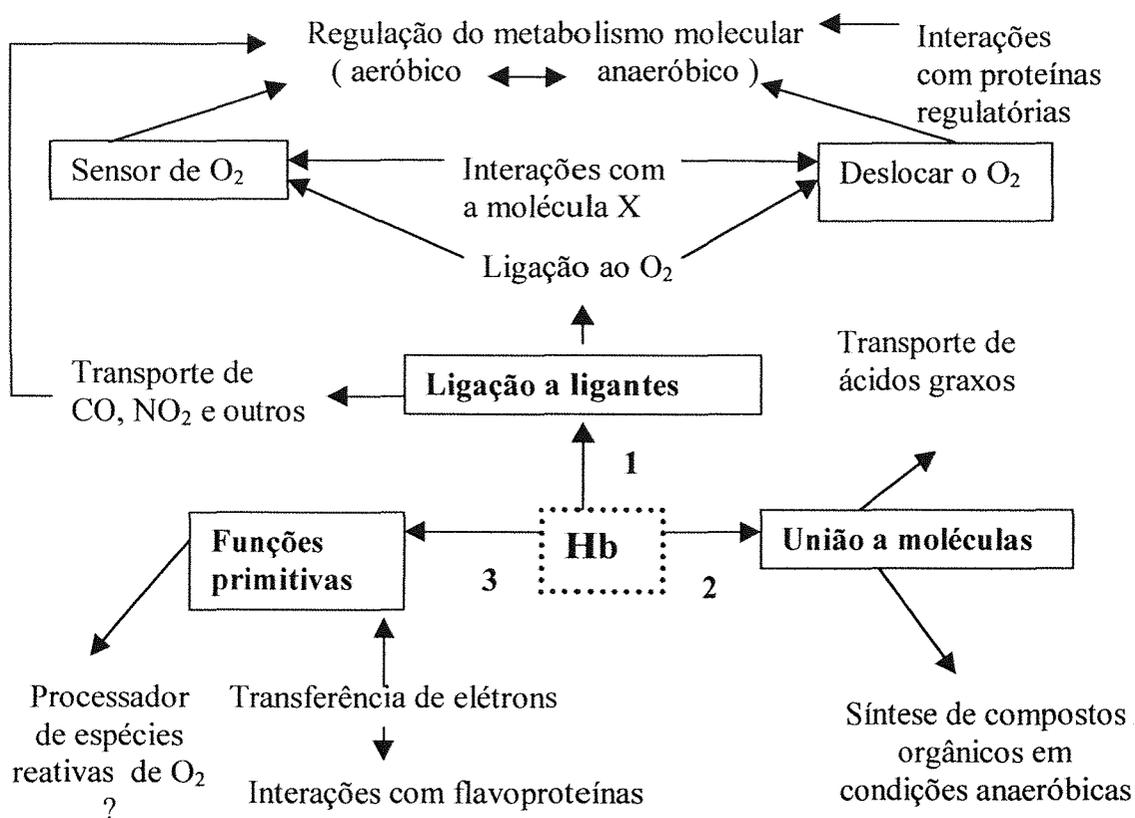


Figura 1. Possíveis vias de interação de Hb não simbióticas em células vegetais. (Adaptado de Arredondo-Peter et al., 1998)

2.2 - Estresse oxidativo em plantas

Um dos mais importantes mecanismos pelos quais as plantas sofrem danos em condições ambientais adversas é o excesso de produção de espécies ativas de oxigênio (AOS), tais como superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (OH^{\cdot}). O estresse oxidativo ocorre quando as plantas estão expostas a condições adversas de luz e água, ou expostas a poluentes do ar, luz ultravioleta e herbicidas como o Paraquat. Superóxido e H_2O_2 podem inativar diretamente várias macromoléculas, mas é o OH^{\cdot} gerado pelo encontro destes dois radicais, catalisado por metais de transição, que contribui para a principal toxicidade. O radical hidroxila (OH^{\cdot}) interage

instantaneamente com proteínas, lipídios e DNA, causando rápido dano às células (Inzé & Van Montagu, 1995).

Vários processos metabólicos fazem uso das AOS. Por exemplo, H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ estão envolvidos na formação da parede em células vegetais. Um grande aumento de AOS é observado em infecção de plantas por patógenos, ou tratamento com elicitores. Este processo oxidativo parece ser responsável pela morte celular por hipersensibilidade e pela rápida conexão cruzada de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina na parede celular, associada à defesa ativa contra patógenos. AOS poderiam também servir como mensageiros secundários, responsáveis pela ativação de genes relacionados com a patogenicidade e genes envolvidos na biossíntese de fitoalexinas. As plantas desenvolveram mecanismos enzimáticos e não enzimáticos, que buscam e eliminam eficientemente AOS. Antioxidantes, como ácido ascórbico, glutathiona, α -tocoferol e carotenóides, ocorrem em altas concentrações em plantas. O radical OH^{\cdot} é muito reativo para ser eliminado enzimaticamente, mas sua formação está limitada pela eliminação de seus precursores, $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 . Superóxido dismutases (SOD) são enzimas que contém grupos metálicos e eliminam o Superóxido (Inzé & Van Montagu, 1995). As SODs apresentam-se como diferentes isoformas de acordo com o seu cofator metálico. Em geral, as plantas contém uma MnSOD mitocondrial, assim como uma MnSOD citossólica e Cu/ZnSOD nas formas citossólica e cloroplástica (Bowler et al., 1994). Recentemente, foi demonstrado que muitas plantas apresentam também, uma FeSOD cloroplástica ao lado da Cu/ZnSOD (Van Camp et al., 1990; Bowler et al., 1994).

O H_2O_2 é eliminado por catalases (CAT) e peroxidases. Catalases são enzimas peroxisômicas que não requerem um substrato reduzido para sua atividade, enquanto que as ascorbato peroxidases (APxs) parecem ser as principais enzimas que eliminam o H_2O_2 , além de localizarem-se nos cloroplastos. APxs usam o ácido ascórbico como substrato redutor e fazem parte do ciclo ascorbato–glutathiona. Outras enzimas envolvidas neste ciclo de oxidação–redução são monohidroascorbato reductase (MDAR), dehidroascorbato reductase (DHARS) e glutathiona reductase (GR) (Inzé & Van Montagu, 1995). As GRs nas folhas de ervilha estão presentes nos cloroplastos, nas mitocôndrias e no citossol (Edwards et al., 1990). A reação de Mehler, onde o oxigênio

molecular reage com o fotossistema I (PSI), produz O_2^- nos cloroplastos, o qual é dismutado pela FeSOD ou Cu/Zn SOD nos tilacóides. O H_2O_2 é então eliminado pela APx associada ao tilacóide. O O_2^- que eventualmente escape dessas enzimas, é dismutado pela FeSOD e APx localizadas no estroma dos cloroplastos. Radicais monohidroascorbato (MDA \cdot) produzidos pela APx são convertidos a ascorbato via a reação da Ferredoxina (Fd) no tilacóide ou da MDHAR no estroma. Redução de radicais dehidroascorbato (DHA \cdot) para ascorbato é catalisado pela DHAR via o ciclo estromal ascorbato-gutationa (Salin, 1987; Alscher et al., 1997).

Na batata foram estudadas as atividades de algumas das enzimas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo. Em plantas de batata com baixa fertilização de cálcio, foram reportados incrementos de 50% na atividade GR e 80% na atividade SOD (Monk & Davies, 1989). Plantas de batata transformadas com genes *sod* de tomate, apresentaram resistência ao herbicida methyl viologen (Perl et al., 1993). Outros trabalhos mostram que tubérculos velhos apresentam mais unidades de GR por proteína solúvel (Mohan Kumar & Knowles, 1996), enquanto que a atividade CAT foi aumentada independentemente da temperatura em tubérculos armazenados por 40 semanas (Dipierro & Leonardis, 1997). Em tubérculos armazenados a baixa temperatura (1 °C), a atividade SOD aumentou nas primeiras três semanas, enquanto que a atividade CAT foi reduzida nas primeiras 6 semanas e incrementada nas duas últimas semanas (Mizuno et al., 1998). Em plantas submetidas a estresse hídrico, a atividade GR foi consistentemente menor e encontrou-se uma correlação entre redução da produtividade e atividade SOD (Van der Mescht et al., 1998). As isoformas de SOD de batata descritos na literatura são: Mn SOD mitocondrial, duas Cu/Zn SOD citoplasmáticas e uma Cu/Zn SOD cloroplástica (Perl et al., 1993; Fester & Schuster, 1995). Também foi recentemente caracterizada uma isoforma de CAT induzida sistemicamente pela infecção de nematóides e bactérias em plantas de batata (Niebel et al., 1995).

2.3 - Relação entre Lb e estresse oxidativo

Puppo et al. (1982) (Figura 2), propuseram um esquema que resume os processos envolvidos na proteção da Lb contra a oxidação.

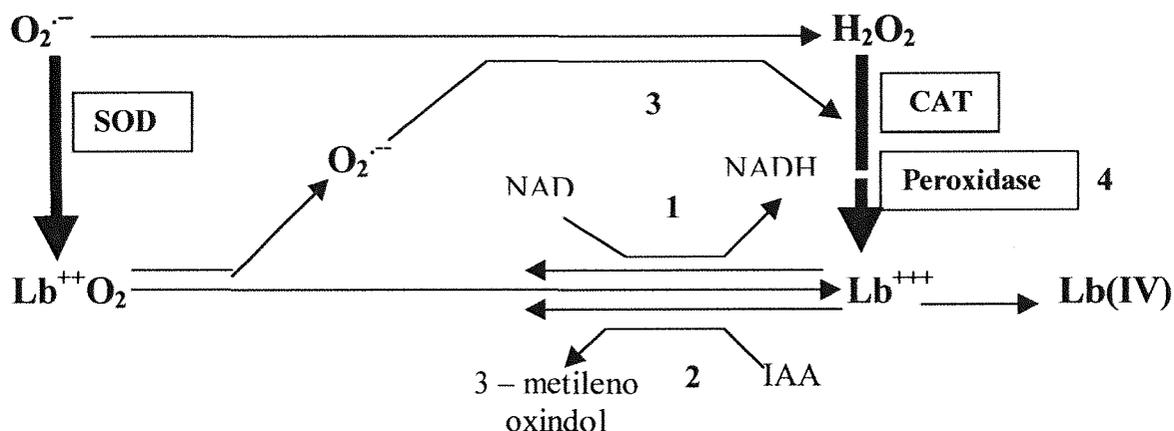


Figura 2. Diferentes mecanismos envolvidos na proteção da Lb. (Adaptado de Puppo et al., 1982).

Os números na Figura 2 se referem a: 1) redução da Lb^{+3} por uma nódulo reductase; 2) redução da Lb^{+3} simultaneamente à oxidação de IAA; 3) dismutação do superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e 4) eliminação do H_2O_2 por uma peroxidase. Os autores propuseram duas vias diferentes: a primeira, envolve a ação de uma redutase isolada do citossol nodular e a segunda é constituída pela oxidação do IAA por Lb^{+3} . O papel da CAT, associado a uma peroxidase, parece essencial dado que a oxidação da Lb^{+3} é completamente irreversível. Além disso, os autores demonstraram que o superóxido foi capaz de reagir com a LbO_2 , gerando a forma férrica da Lb, que é incapaz de carregar oxigênio em nódulos funcionais de legumes. Algumas reações podem gerar o radical superóxido tóxico, sendo uma delas a auto-oxidação da Lb, favorecida pelo pH dos nódulos. A SOD, presente nas células hospedeiras dos nódulos da soja, parece ser capaz de eliminar o superóxido, eliminando a oxidação da Lb. Desta forma, esta enzima poderia desempenhar a função geral de proteção celular contra oxidações não controladas. As propriedades gerais da SOD nodular são similares àquelas de outras Cu/ZnSOD purificadas de plantas superiores. A forma FerriLb é também oxidada por

H₂O₂ para produzir Lb (IV), forma estável da Lb. O H₂O₂ poderia inativar completamente a Lb; a CAT isolada das células hospedeiras, poderia prevenir a limitação do suplemento de oxigênio para os bacteróides, eliminando rapidamente H₂O₂ quando ele é formado.

Becana e Klucas (1992) propuseram o papel das enzimas envolvida no estresse oxidativo nas reações de oxido-redução necessárias para manter ativa a Lb. Segundo os autores, a oxidação da forma oxigenada (LbO₂) à forma não funcional Lb⁺³ é mediada por uma SOD; a oxidação de LbO₂ mediada por peroxidases provoca a ruptura do grupo heme, liberação do ferro e geração de radicais hidroxílicos (OH) (Puppo & Halliwell, 1988). Ji et al. (1994) encontraram e estudaram o gene da leghemoglobina redutase férrica, ajudando a completar o quadro da ativação da Lb.

Uma outra relação entre a atividade da Lb e as enzimas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo foi proposta por Becana e Klucas (1992), que mostraram que o grupo heme da Lb ativa, na presença de doadores de elétrons, poderia funcionar de maneira semelhante à CAT, apresentando uma atividade pseudo-peroxidativa.

2.4 - Síntese de amido e sacarose

Quando a produção de fotossintatos excede o consumo na folha, o excesso é exportado na forma de sacarose. Várias razões tem sido propostas para explicar o papel funcional deste dissacarídeo ser utilizado como uma molécula de transporte. Estas incluem: sua alta solubilidade na água, sua neutralidade elétrica, sua aparentemente falta de efeitos inibitórios sobre a maioria dos processos bioquímicos, e seu caráter não redutor que a torna menos interativa com outros grupos funcionais presentes nas plantas. Há dois sistemas enzimáticos capazes de catalisar a produção de sacarose. No primeiro, a sacarose fosfato sintetase catalisa a reação entre a UDP-glucose com a frutose-6-fosfato produzindo UDP + sacarose-6-fosfato. Em seguida, a sacarose fosfatase converte o produto da reação anterior em sacarose + fosfato inorgânico (Pi). No segundo sistema, a sacarose sintase catalisa a reação entre a UDP-glucose com a frutose produzindo UDP + sacarose. Estas duas rotas são teoricamente possíveis, porém

as evidências disponíveis indicam que a maior parte da síntese de sacarose ocorre via sacarose fosfato sintase (SPI) / sacarose fosfatase (SPP). A atividade da sacarose sintase (SPI) parece estar restrita à clivagem da sacarose em certas situações onde a concentração desse metabólito encontra-se excessivamente elevada (Smith, 1995).

Existe uma comunicação entre a síntese de sacarose no citossol, a fixação de carbono e a síntese de amido no cloroplasto que é mediada pelo sistema transportador de Pi - triose fosfato (Sharkey et al., 1986). A síntese de sacarose têm que estar ajustada de maneira que quantidade suficiente de Pi seja liberada para manter sua concentração no estroma e permitir que as reações ocorram eficientemente no estroma e tilacóide, ou a fotossíntese pode ser inibida. O equilíbrio entre estes processos é regulado rigidamente e ambos precisam ser coordenados com a velocidade de fixação de carbono (Flügge & Heldt, 1991).

O amido é a principal forma de armazenamento de polissacarídeos em plantas e está presente em todos os órgãos principais. Em tubérculos de batata ele pode representar até o 80% do peso seco e é um importante produto da fotossíntese. A folha tem uma capacidade finita de armazenamento, entretanto, se a taxa de fotossíntese excede a taxa de exportação de sacarose, os fotossintatos são retidos dentro do cloroplasto na forma de amido. Consequentemente, é normal acumular amido no cloroplasto na fase dependente da luz e degradar amido na fase independente da luz, exportando os seus produtos do cloroplasto. Nestas circunstâncias, o armazenamento de fotossintatos na forma de amido no cloroplasto é temporal e a síntese deste polissacarídeo atua tamponando a capacidade fotossintética do cloroplasto (Smith, 1995).

A via da ADP-Glucose pirofosforilase (AGPase) é a rota principal na síntese de amido nos cloroplastos. Esta enzima é ativada por 3-PGA e inibida por Pi, sendo esta regulação baseada nas mudanças das propriedades cinéticas da enzima (Preiss, 1991). Outros intermediários glicolíticos como: fosfoenolpiruvato (PEP), frutose-1,6-bifosfato e frutose-6-fosfato em altas concentrações, também ativam a AGPase. A regulação desta enzima *in vivo* tem duas funções, a primeira ocorre pela ativação devido ao aumento da relação 3-PGA/Pi que estimula a síntese de amido em

resposta ao aumento de metabólitos. A segunda, ocorre a inibição pela queda da relação 3-PGA/Pi que protege contra o dreno excessivo de triose-P para amido no interior dos cloroplastos (Stitt & Sonnewald, 1995).

2.5 - Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Agrobacterium tumefaciens é uma bactéria de solo da família *Rhizobiaceae* causadora da doença Galha da Coroa “crown gall disease” em plantas. A patogenicidade é mediada por um plásmidio indutor de tumores Ti “tumor induction”, que apresenta um fragmento de DNA, T-DNA, que é transferido ao genoma nuclear das plantas que coloniza, transformando as células vegetais. O T-DNA contém genes *onc* que codificam enzimas para a biossíntese de hormônios vegetais e genes *ops* que codificam para a síntese de proteínas específicas do tecido tumoral, as opinas (conjugados de açúcares e amino ácidos). Estes genes estão flanqueados por bordas de 25 pb, repetidas à direita e à esquerda. O T-DNA, por si mesmo, não tem funções de transferência e para tanto, precisa de outros genes presentes em outra região do plasmídeo Ti, conhecida como Região de Virulência (VIR) (Zupan & Zambrysky, 1997).

Com o objetivo de construir genes quiméricos para engenharia genética de plantas, removeram-se os genes *onc*, que foram substituídos por genes de resistência a antibióticos, seqüências promotoras de expressão gênica em plantas e o gene de interesse. Assim, a construção quimérica é inserida em vetores plasmidiais, introduzidos em cepas de *A. tumefaciens* e utilizadas na transformação genética de plantas (Mcbride & Summerfelt, 1990).

Os sistemas de transformação mediados por *Agrobacterium* implicam em cocultivo entre explantes vegetais e cepas da bactéria contendo a construção quimérica de interesse. Em seguida, o material é transferido para meios que favoreçam a formação de brotos contendo agentes seletivos, normalmente antibióticos, para selecionar os transformantes e eliminar as bactérias. Os brotos sobreviventes são colocados em meios que induzem regeneração múltipla de plântulas completas com uma

característica nova, caráter que será muito provavelmente transmitido de forma estável à progênie (Chilton, 1993).

2.6 Direcionamento de proteínas ao cloroplastos

O funcionamento do cloroplasto depende da importação de muitas proteínas codificadas por genes nucleares, dado que o genoma desta organela codifica para um limitado número de proteínas. Muitas das proteínas importadas ao cloroplasto, carregam consigo uma seqüência de direcionamento conhecida como "peptídeo de trânsito" (PT). Os PTs usualmente encontrados nas proteínas direcionadas aos cloroplastos são ricos em aminoácidos básicos e hidroxilados e carecem de resíduos ácidos e polares (De Boer & Weisbeek, 1991). O processo de importação de proteínas ao cloroplasto é altamente específico (Boutry et al., 1987; Silva-Filho et al., 1996), embora em alguns casos esta especificidade não tem sido observada (Hurt et al., 1986; Pfaller et al., 1989; Huang et al., 1990; Silva-Filho et al., 1999). Em alguns casos, o PT não é capaz de introduzir uma proteína repórter no interior dos cloroplastos, sendo, necessária a presença de resíduos adicionais da proteína madura para obter-se uma importação eficiente (Kavanagh et al., 1988; Silva-Filho et al., 1997).

O uso de seqüências de direcionamento tem permitido a importação de proteínas no interior dos cloroplastos a fim de modificar a respostas das plantas ao estresse oxidativo. Bowler e colaboradores (1991) transformaram plantas de tabaco com o gene que codifica para a MnSOD de *Nicotiana plumbaginifolia*. Com a mesma construção foram transformadas plantas de alfalfa (*Medicago sativa*) (Mckersie et al., 1993) e algodão (*Gossypium hirsutum*) (Trolinder & Allen, 1994). Pitcher e colaboradores (1994) produziram plantas de fumo expressando a APx de ervilha, enquanto que Van Camp et al. (1994) obtiveram plantas transgênicas de fumo com o gene que codifica para a FeSOD. Já Creissen et al. (1999), expressaram a glutamina sintetase bacteriana nos cloroplastos.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Cultura de tecidos e micropropagação

Para iniciar o trabalho, o Instituto Agronômico de Campinas (IAC) gentilmente forneceu tubérculos de batata (*S. tuberosum*) certificados da variedade Bintje, que foram semeados em vasos contendo uma mistura 1:1 de substrato orgânico e areia. Na casa de vegetação, os vasos foram irrigados diariamente por nebulização e adubados duas vezes na semana. Após três semanas, a parte terminal dos caules foi coletada e tratada com uma solução de detergente líquido 10% (Limpol) por 10 minutos; transferida para uma solução de água sanitária (Candura) 2,5% por 20 minutos e lavadas três vezes em água destilada estéril por 30 minutos. O tratamento foi efetuado em câmara de fluxo laminar. Posteriormente, as partes do caule afetadas pelo processo de desinfestação foram eliminadas e transferidos para meio MS suplementado com o meio (Murashige & Skoog, 1964), sacarose 30%, phytagar 8%, pH 5,8. O material vegetal foi transferido para sala de crescimento com condições controladas de temperatura (24 ± 2 °C) e fotoperíodo (16/8 hs). Logo após quatro semanas, 60 % dos terminais regeneraram plântulas completas e foram micropropagados por nós (microestacas) da mesma forma como foi descrito anteriormente. Nos casos em que foram usados tubos de ensaio o volume de meio MS foi de 15 mL, um só explante incubado e a parte superior do tubo fechada com algodão. Quando frascos maiores de vidro foram utilizados, o volume de meio MS foi de 40 mL com até quatro explantes. Sobre o frasco foi colocada uma tampa com uma perfuração onde foi inserido algodão. O uso de tampas de algodão, facilitou o intercâmbio gasoso e melhorou a qualidade do material.

3.2 - Ensaio de resistência ao estresse salino

Com o propósito de testar a resistência/susceptibilidade do material transgênico, realizou-se um ensaio com meio MS acrescido de 100 mM de NaCl. Foram usados frascos de vidro com tampa plástica (SIGMA), contendo 40 mL de meio MS e 4 nós derivados de plântulas micropropagadas por 4 semanas. Os dados foram coletados, após três semanas de desenvolvimento.

3.3 - Transferência para a casa de vegetação e produção de minitubérculos

Com o propósito de conhecer o comportamento do material sem transformação e obter minitubérculos para os ensaios de transformação, foram testadas condições e metodologias de transferência de plântulas cultivadas em condições *in vitro* para condições de casa de vegetação. Os melhores resultados com 90% de sobrevivência das plântulas e 100% de produção de minitubérculos foram obtidos com a seguinte metodologia: plântulas cultivadas *in vitro* por quatro semanas foram transferidas para vasos contendo uma mistura 1:1 de substrato orgânico e areia, mantidas cobertas com copos descartáveis por cinco dias e regadas diariamente com adubo líquido por uma semana. Ao término desta primeira semana, o adubo líquido começou a ser aplicado duas vezes por semana até o final da cultura. Os minitubérculos foram produzidos 80 dias após a transferência.

3.4 - Sistema de transformação via *Agrobacterium tumefaciens*

3.4.1 - Material vegetal

O sistema de transformação utilizado foi desenvolvido por Dale & Hampson (1995). Os minitubérculos de batata (*S. tuberosum* L.) cv. Bintje, foram produzidos a partir de plântulas cultivadas *in vitro* e transferidas para a casa de vegetação como descrito anteriormente.

3.4.2 - Construção gênica

A construção quimérica utilizada na transformação foi desenvolvida por Barata (1999) baseada no plasmídeo binário Bin2-35ScatE9' (Chaumont et al., 1994), ao qual foram ligados o gene *lba*, que codifica para a leghemoglobina *a* de soja e a seqüência de direcionamento para o cloroplasto da Rubisco de ervilha (*Pisum sativum* L.), originando o plasmídeo Bin2-35SrbcslbaE9' (Figura 3).

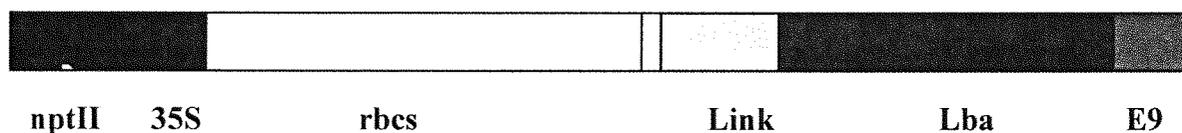


Figura 3: Representação esquemática da construção gênica. nptII: codifica para neomicina fosfotransferase e confere resistência a kanamicina; 35S: promotor do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV); rbcsl: codifica para o peptídeo de trânsito da subunidade pequena da Rubisco de ervilha; Link: região de ligação entre *rbcsl* e o gene *lba*; lba: codifica para a leghemoglobina de soja; E9, seqüência 3' não traduzida da Rubisco contendo os sinais de poliadenilação. Adaptado de Barata et al. (1999). O esquema não está em escala

3.4.3 - Condições de crescimento da *Agrobacterium tumefaciens*

A cepa bacteriana LBA4404 contendo o plasmídeo com a construção quimérica Bin2-35SrbcslbaE9', foi cultivada em meio LB, composto de 1% (p/v) de bacto triptona (DIFCO), 0,5% (p/v) de extrato de levedo (DIFCO), 1% (p/v) de NaCl acrescido de Kanamicina e Rifampicina 0,01% (p/v), pH 7,5.

3.4.4 - Condições do cocultivo

Minitubérculos de batata foram lavados em água com detergente líquido (Limpol), enxaguados com água destilada estéril, transferidos para uma solução de álcool 98% (v/v) por 1 minuto, depois para uma solução de água sanitária 2,5% por 15 minutos e finalmente lavados três vezes em água destilada estéril. A manipulação do material foi feita na câmara de fluxo laminar. Eliminaram-se as partes danificadas pelo processo de esterilização e transferiu-se o bloco central do minitubérculo para uma placa de petri plástica. O bloco foi cortado em discos de aproximadamente 0,5 cm e 2 mm de espessura, que foram transferidos para 20 mL de meio MS líquido acrescido de 200 µL de inóculo de *Agrobacterium* e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, foram transferidos para o meio de cocultivo e transportados para a sala de crescimento e mantidos nessas condições por 48 horas. O meio de cocultivo foi composto pelo meio MS, 30 g/L de sacarose, 1 mg/L de tiamina-HCL, 0,5mg/L de ácido nicotínico e 0,5 mg/L de piridoxina, o pH foi ajustado a 5,8 e logo foi adicionado 8g/L de Phytoagar. Após esterilização em autoclave, foram adicionados 1.8 mg/L de Zeatina ribosídeo, 0,87 mg/L de AIA e 20 mg/L de acetoseringona.

3.4.5 - Condições de seleção e regeneração

Após a fase de cocultivo, os discos foram transferidos para meios de cultura com os mesmos componentes do meio anterior, exceto acetoseringona, e acrescidos de 250 mg/L de cefotaxime (para eliminar a bactéria) e 50 mg/L de kanamicina (para selecionar os regenerantes transformados). A cada 15 dias os explantes foram transferidos para meio fresco. Depois de quatro semanas, foram observados calos organogênicos nos explantes, os quais se diferenciaram em plântulas após outras quatro semanas. As plântulas diferenciadas foram transferidas para o mesmo meio de cultura, sem o cefotaxime, porém com maior concentração de Kanamicina (150 mg/L). As plântulas regeneradas e que enraizaram em meios com Kanamicina foram consideradas

potencialmente transgênicas e clonadas usando as técnicas de micropropagação já descritas.

3.5 - Caracterização molecular das plantas transgênicas.

A caracterização molecular referente à presença e expressão do gene quimérico nas plantas potencialmente transgênicas foi feita analisando-se o DNA, RNA e a proteína Lb. Para detecção do gene utilizou-se a técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR), enquanto que para a detecção de transcritos, utilizou-se a técnica do RT-PCR (Slightom et al., 1994). A presença da proteína Lb foi verificada por imunodetecção usando-se anticorpos policlonais (Memelink et al., 1994).

3.5.1 - PCR

Para analisar por PCR as plantas regeneradas em meios de seleção, extraiu-se o DNA usando o protocolo descrito por Edwards et al. (1991), conforme descrição a seguir: discos foliares foram coletados utilizando-se a tampa estéril do tubo Eppendorf e, em seguida, foram macerados a temperatura ambiente e misturados à 400 µL de tampão de extração [200mM de Tris HCL pH7.5, 200mM de NaCl, 25mM de EDTA e 0,5% (p/v) de SDS]. Posteriormente, os tubos Eppendorfs foram agitados por cinco segundos e centrifugados a 13000 rpm por 2 minutos. Cerca de 300 µL do sobrenadante foram transferidos para novos Eppendorfs e adicionados 300 µL de isopropanol. Os tubos foram deixados em repouso por 2 minutos a temperatura ambiente e novamente centrifugados a 13000 rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, após 30 minutos de secagem, dissolvido em 100 µL de 1X Tris-EDTA composto de 10mM de Tris HCL pH 7.6 e 1mM de EDTA, pH 8.0. O DNA obtido foi utilizado nas reações de PCR, usando os seguintes primers:

Primer leg1: 5'-CCCGAATTCAGAAATATGGTTGC-3'

Primer leg2: 5'-CCCGGATCCTACTAATGCC-3'

As condições utilizadas na reação, após otimização, foram: 5,0 μ L de DNA extraído, 0,6 μ L de dNTP 2,5mM, 1 unidade de Taq DNA polimerase (GIBCO), 5,0 μ L de tampão de reação 10X e 40 pmoles de cada primer. A reação de amplificação foi composta de 35 ciclos, cada um constituído de desnaturação (95⁰C por 45 segundos), anelamento (55⁰C por 45 segundos) e alongamento (73⁰C por segundos) efetuada em um termociclador (MJ PTC 100). Os produtos da PCR foram examinado em géis de 1.0% de agarose, e coloridos com 0,5 μ g de brometo de etídeo em tampão TBE, e submetidos a 80 volts por 30 minutos, na minicâmara de electroforese (Gibco BRL Horizon ®).

3.5.2 - RT-PCR

Nesta técnica, à partir de RNAm isolado de plantas, sintetiza-se o DNA complementar, cDNA, e logo se procura a amplificação específica do gene alvo, no caso o *lba*. Desta maneira se o transcrito do gene de interesse está presente na mistura de RNA mensageiros, ele é sintetizado em cDNA via Transcriptase Reversa, a partir do qual é amplificado por primers específicos (Slightom et al., 1994).

A extração de RNA foi realizada com Trizol[®] (Gibco BRL) conforme protocolo recomendado pelo fabricante: 100 mg de tecido foliar são homogenizados em 1 mL de Trizol em tubo Eppendorf e incubados por cinco minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se 200 μ L de clorofórmio e agitou-se vigorosamente por 15 segundos, incubando-se novamente por 3 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, centrifugou-se a 11500 rpm a 4⁰C (centrífuga Beckman, rotor Sorvall[®] ST-Micro) por 15 minutos e transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo Eppendorf, aos quais foram adicionados 0,5 mL de isopropanol. O tubo foi incubado à temperatura ambiente por 30 minutos e centrifugado a 11500 rpm a 4⁰C (centrífuga Beckman, rotor Sorvall[®] ST-Micro) por 10 minutos (o RNA forma um precipitado gelatinoso no fundo do tubo). Depois de removido cuidadosamente o sobrenadante, adicionou-se 1 mL de etanol 75% preparado com água tratada com 0,01% de DEPC e o tubo foi agitado no Vortex. Posteriormente, centrifugou-se a amostra a 9000 rpm 4⁰C na (centrífuga Beckman, rotor Sorvall[®] ST-Micro) por cinco minutos e descartou-se o

sobrenadante. O precipitado de RNA foi colocado para secar por 15 minutos à temperatura ambiente, dissolvido em 20µL de água tratada com DEPC e incubado por 10 minutos à 55 °C.

A síntese do cDNA foi realizada com o kit Superscript III[®] (GibcoBRL) conforme o protocolo recomendado pelo fabricante: em um tubo Eppendorf estéril foram misturados 1µL de oligodT, 2 µL de RNA total e água tratada com DEPC até volume final de 12 µL. O tubo contendo a solução de reação foi colocado no termociclador (MJ PTC 100) à 74°C por 10 minutos, e em seguida, à 4 °C por 1 minuto. Preparou-se uma mistura contendo 2 µL de tampão de reação 10X, 2 µL de MgCl₂ 25 mM, 1 µL de dNTP mix 10 mM, 2 µL de DTT 0,1 M que foram adicionados ao tubo presente no termociclador, programado para 42 °C por cinco minutos. Posteriormente, adicionaram-se 200 unidades (1 µL) de Transcriptase Reversa (Superscript III) e incubou-se a reação por 50 minutos a 42 °C. Para finalizar a reação, o tubo foi incubado a 70 °C por 15 minutos, onde finalmente foi adicionado 1 µL de RNase H e incubado a 37 °C por 15 minutos.

A amplificação do *lba* à partir do cDNA, foi realizada da mesma forma em que foi descrita anteriormente a amplificação por PCR (item 3.5.1).

3.5.3 – Western Blotting

Para detectar a expressão da leghemoglobina de soja nas plantas de batata transformada, primeiramente realizou-se a extração e a quantificação de proteínas totais.

Para a extração de proteínas totais, 0,5 gramas de folha foram maceradas em nitrogênio líquido e misturadas com 1,25 mL de tampão de extração composto de 0,1 M de Tris pH 7,6 e 0,1% (p/v) de ácido ascórbico. O extrato obtido foi recolhido em tubos Eppendorfs e centrifugado por 2 minutos a 14000 rpm em microcentrífuga. O sobrenadante foi então coletado em novos tubos e armazenado à -80 °C para as análises posteriores.

O teor de proteína no extrato foi determinada com base no método descrito por Bradford (1976), modificado para ensaio em placas de ELISA. Dois μL de extrato foram adicionados a 200 μL do reagente de Bradford (50 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 dissolvido em 25 mL de etanol, misturados com 50mL de ácido fosfórico e completando-se o volume com água) para reagir por 5 minutos. Em seguida, determinou-se a concentração protéica das amostras num espectrofotômetro (Expectra Max Plus - Molecular Devices) com base na densidade ótica a 595nm, tomando-se como base a regressão linear de uma curva padrão construída com BSA, em concentrações de proteínas variando de 2,0 a 12,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Depois da quantificação das proteínas, as amostras foram solubilizadas em 80 mM de Tris-Cl, 2% (p/v) de SDS, 10% (p/v) de glicerol, 0,005% (p/v) de azul de bromofenol e 1% (p/v) de dithiothreitol, pH 6,8 por 15 minutos à 56 °C. Em seguida, foram separadas eletroforéticamente por SDS em gel de poliacrilamida (Laemmli, 1970), à voltagem constante de 100 V. Posteriormente, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (BioRad), conforme descrito por Towbin et al. (1979), utilizando amperagens de 75 mA por 12 minutos, 175 mA por 15 minutos, 400 mA por 25 minutos e 450 mA por 10 minutos.

Logo após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi lavada, sob agitação, com cerca de 50 mL de tampão fosfato salino (PBS) composto de 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 30,2 mM de NaH_2PO_4 , 1,8 mM de KH_2PO_4 , pH 7,4 durante 5 minutos. Em seguida, a membrana foi saturada com uma solução de 5 % (p/v) de leite em pó desnatado e 0,2 % (v/v) de Tween 20. A membrana foi lavada 3 vezes com uma solução de TBS + 0,3% (v/v) de Tween 20 e incubada por 1 hora com anticorpo anti-leg (cedido pelo Dr. Gautam Sarath, University of Nebraska, USA) em TBS (diluição 1/1000). Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes por 10 minutos em TBS contendo 0,1% de Tween 20 (v/v) e incubada por 1 hora com o anticorpo anti-goat IgG conjugado com a fosfatase alcalina (SIGMA). A membrana foi lavada novamente 3 vezes por 10 minutos em TBS contendo 0,1% de Tween 20 (v/v) e revelada com o produto FAST BCIP/NBT (SIGMA), conforme as recomendações do fornecedor.

3.5.4 – Fracionamento celular

O protocolo de fracionamento celular é baseado no método descrito por Bartlet et al. (1982), e posteriormente modificado por Pilon et al. (1992) e Silva-Filho et al. (1996). Todo o procedimento foi realizado à 4 °C. Aproximadamente 10 g de folhas foram processadas em liquidificador junto com 100 mL de tampão de homogeneização [sacarose 0.33 M, Tris-Cl 50 mM, pH 8.0, PVPP 0.2% (p/v), BSA 0.2% (p/v) e β -mercaptoetanol 0.04% (v/v)]. O homogeneizado foi filtrado utilizando-se 2 camadas de papel Miracloth e duas frações de 1 mL foram recolhidos em tubos Eppendorfs. Um dos tubos foi mantido no gelo [homogeneizado (H)] e o outro foi centrifugado a 13000 rpm por 5 minutos. Deste último, separou-se o precipitado (P) e o sobrenadante citossólico (S) em outros tubos Eppendorfs. O restante do homogeneizado filtrado foi centrifugado em tubos de 50mL a 3500 rpm, a 4 °C por 3 min no rotor Sorvall JS13. Em seguida, foi eliminado o sobrenadante e o precipitado ressuspendido em 1 mL de tampão de suspensão [Manitol 0.4 M, K_2PO_4 10 mM pH 7.2, 0.2% BSA (v/v)]. Esta amostra foi colocada sobre um gradiente de percoll contido em um tubo Corex [4mL de Percoll 80% (v/v), sacarose 0.25 M e 4.8 mL de Percoll 40% (v/v), 0.25M de sacarose] e centrifugado 10 minutos a 10000 rpm, no rotor JS13. Após a centrifugação, a fração enriquecida de cloroplastos foi coletada na interface das camadas de Percoll e diluídos em tampão de suspensão sem BSA. Centrifugou-se novamente a solução por 3 minutos a 3500 rpm no rotor JS13. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 1 mL de tampão de suspensão sem BSA. Essa etapa é foi repetida duas vezes para eliminação do Percoll e da BSA. O precipitado final foi ressuspendido em 100 μ L de tampão de suspensão sem BSA. As amostras são formadas por cloroplastos intactos (C), homogeneizado (H), precipitado (P) e sobrenadante (S) do homogeneizado, representando frações subcelulares. Estas frações foram então, analisadas por “Western Blotting” para estudar a importação e processamento da proteína quimérica no interior do cloroplasto.

3.6 - Determinação do teor de sacarose e amido

Para analisar o efeito potencial da Lb nos cloroplastos da batata, determinou-se o conteúdo de amido e sacarose em folhas das plantas transgênicas e plantas controle. As amostras (folhas completas) foram coletadas às 6 e 13 horas, com o propósito de obter medições que refletem a atividade fisiológica ao longo do dia. As folhas completas foram coletadas 40 dias após a transferência para casa de vegetação, período em que a planta encontra-se no início do processo de tuberização. A extração de metabólitos foi feita conforme metodologia descrita por Lowry & Passonneau (1972) utilizando-se um espectrofotômetro (Expectra Max Plus - Molecular Devices). As determinações baseiam-se na mudança da absorvância, no comprimento de onda de 340 nm, que ocorre quando o NADH ou NADPH passam do estado reduzido para oxidado ou vice-versa. Foram usados 17,5 µL de extrato em um volume total de ensaio de 350 µL e a absorvância foi lida no final de cada reação. As enzimas utilizadas foram da Boehringer Mannheim. Os ensaios foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, com um número mínimo de 6 unidades experimentais por genótipo, e analisados no programa SAS aplicando a técnica de Análise de Variância (ANAVA) e teste de Duncan.

3.6.1 - Preparo do extrato foliar

A terceira folha a partir do ápice caulinar foi utilizada como amostra. A extração foi realizada conforme protocolo descrito por Labate & Leegood (1989), onde a folha congelada foi colocada em um almofariz pré-resfriado e macerado até completa pulverização em nitrogênio líquido com 1 mL de HClO₄ 10% (v/v). Posteriormente, o almofariz foi lavado com 0,5 mL de HClO₄ 1% (v/v) e a amostra recolhida em tubos de vidro. A amostra foi então centrifugada a 14000 rpm por 2 minutos. Após marcar o volume do tubo, tomado como volume de extrato, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e o precipitado verde foi usado para a determinação da feofitina. O sobrenadante foi neutralizado a pH 6,5 a 7,0 com K₂CO₃ 5

M e em seguida, acrescido de 200 μ L de uma suspensão de carvão ativado (200 mg/mL). Centrifugou-se por mais 2 minutos a 14000 rpm e o sobrenadante foi utilizado para análise de metabólitos.

3.6.2 - Determinação do teor de feofitina

A clorofila é convertida em feofitina em condições de extração ácida e foi quantificada de acordo com o método de Vernon (1960). O precipitado verde resultante da extração com HClO_4 , foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL junto com 10 mL de acetona 80 % (v/v), agitado e deixado durante uma noite a temperatura ambiente, para a completa extração dos pigmentos. No dia seguinte, a amostra foi centrifugada a 3500 rpm no rotor Sorval ST-micro por 5 minutos e a absorbância foi medida contra uma prova em branco de acetona 80% (v/v) a 666 e 655 nm e aplicada a seguinte fórmula:

$$\text{Feofitina (mg / mL)} = \{(26,03 \times A_{655}) + (6,75 \times A_{666})\} \times (V/1000)$$

Onde:

A_{655} = absorbância a 655 nm

A_{666} = absorbância a 666 nm

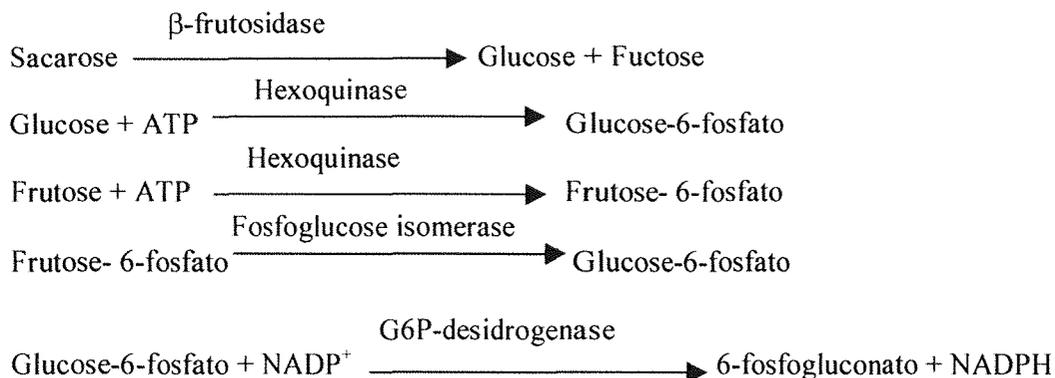
V = volume de acetona a 80%

26,03 e 6,75 = coeficientes específicos de absorção óptica

3.6.3 - Determinação do conteúdo de sacarose

O conteúdo de sacarose foi determinado adicionando-se 0,5 unidades da enzima glucose-6-fosfato desidrogenase (G6P-DH), 0,5 unidades de fosfoglucose isomerase (PI), 3 unidades de hexoquinase e 100 unidades de β -frutosidase em tampão contendo 100 mM de Hepes (N-2-hidroxietilpiperazine-N ácido 2-etanosulfônico) pH 7,0, 5 mM de MgCl_2 , 0,5 mM de DTT, 0,02% de BSA, 0,4 mM de NADP^+ e 1mM de ATP. A quantificação da sacarose foi feita monitorando-se a alteração da densidade

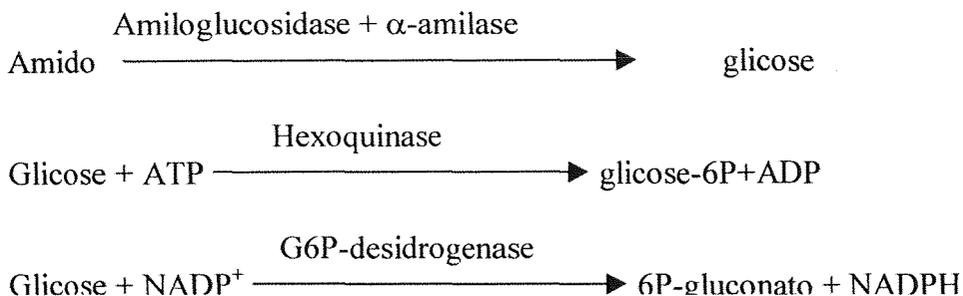
óptica a 340 nm. Os produtos de hidrólises da sacarose pela β -frutosidase (glucose e frutose) foram convertidos a glicose-6-fosfato conforme as seguintes reações:



Frutose-6-fosfato é oxidada a 6-fosfogluconato com redução de NADP^+ a NADPH .

3.6.4 - Determinação do conteúdo de amido

O método utilizado na extração de amido foi baseado em metodologia descrita por Jones et al. (1977). O precipitado resultante da extração de feofitina foi lavado três vezes com 0,5 mL de tampão MES (ácido 2[N-morfolino]etano-sulfônico) 0,5 M pH4,5. Em seguida, o precipitado foi ressuspendido em 0,5 mL de tampão MES 0,5 M pH4,5, ao qual foram acrescentados 14 unidades da enzima amiloglucosidase e 0,4 unidades de α -amilase, deixando-se à temperatura ambiente por uma noite. Posteriormente, a suspensão foi centrifugada a 14000 rpm no rotor Sorvall ST-micro, o precipitado descartado e o sobrenadante utilizado para determinação de glicose. A mistura de reação para esta determinação continha 100 mM de tampão Hepes pH 7,0, 5mM de MgCl_2 , 0,5 mM de DTT, 0,02% (p/v) de BSA, 40 mM de NADP^+ e 0,1mM de ATP. Foram acrescentados 3 unidades de hexoquinase e 0,5 unidades de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6P-DH). A quantificação de glucose foi feita monitorando-se a variação na densidade óptica a 340 nm durante a conversão de glicose-6-fosfato à 6-fosfogluconato. O seguinte esquema mostra as reações envolvidas na quantificação de amido com base na quantidade de glicose resultante da hidrólises do amido:



3.7 - Determinação do teor de clorofila

Com o objetivo de detectar algum efeito na biossíntese de clorofila, foi determinado o teor de clorofila total em plantas de batata transformadas e controle mantidas sob condições de casa de vegetação. As leituras foram feitas em unidades arbitrárias com o leitor Minolta Chlorophyll meter SPAD 502 (Chapman and Barreto, 1997), após 40 dias de transferência para casa de vegetação. Foram feitas 3 leituras na terceira folha antes do meristema apical da planta. Os ensaios foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, com um número mínimo de 12 unidades experimentais por genótipo e analisados no programa SAS aplicando ANAVA e teste de DUNCAN.

3.8 - Determinação das atividades das enzimas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo

Para estudar o efeito da Lb nos cloroplastos de batata, foram analisadas algumas das enzimas envolvidas no estresse oxidativo: Catalase (CAT), Superóxido dismutase (SOD) e glutathione reductase (GR). A CAT e a GR foram quantificadas em termos de atividade total. A SOD juntamente com a CAT, foram analisadas mediante géis de atividade para estudar os padrões das isoformas.

3.8.1 - Material vegetal

Em todos os casos, os materiais analisados foram obtidos a partir de plântulas cultivadas *in vitro* de clones transgênicos e selvagens transferidos para a casa de vegetação e cultivados em condições controladas. As amostras foram tomadas aos 40 dias quando a batata inicia a formação de tubérculos. Folhas foram usadas para a extração das enzimas. Os tecidos vegetais (5 a 10 g em peso fresco) foram homogeneizados em 10ml de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7.5 contendo 1 mM de EDTA, 3 mM DDT e 4% PVP (p/v) e processados à 4 °C. Centrifugou-se o homogeneizado à 17000 g por 30 minutos e coletou-se o sobrenadante em alíquotas que foram armazenadas a -80 °C. O teor de proteína no extrato foi determinada com base no método descrito por Bradford (1976), modificado para ensaio em placas de ELISA.

3.8.2 - Determinação da atividade CAT

A determinação da atividade CAT total foi realizada como descrito por Krauss et al. (1995) com algumas modificações. O ensaio baseou-se na leitura espectrofotométrica à 25 °C de uma mistura de reação que contém 1mL de tampão fosfato de sódio (100 mM pH 7.5) com 2,5 µL de solução H₂O₂ 30 % preparada no momento do ensaio. A reação foi iniciada com a adição de 15 µL do extrato vegetal e a atividade determinada pela decomposição do H₂O₂ medida em termos de mudanças da absorbância a 240 nm por 1 minuto. Estes dados foram coletados após 40 dias de transferência para a casa de vegetação, em ensaios com delineamento inteiramente casualizado, um número mínimo de 7 unidades experimentais por genótipo e analisados no programa SAS aplicando ANAVA e teste de Duncan.

3.8.3 - Determinação da atividade GR

A atividade GR foi determinada como descrito por Smith et al. (1988) com algumas modificações. O ensaio baseou-se na leitura espectrofotométrica à 30 °C de uma mistura que continha 3mL de tampão fosfato de sódio, pH 7.5, com 1 mM de

5,5'- Dithio-bis(2-Acido Nitrobenzóico), 1 mM de glutatona oxidada e 0.1 mM de NADPH. A reação foi, então, iniciada com a adição de 25 a 50 μ L de extrato vegetal. A taxa de redução da glutatona oxidada foi acompanhada pelo monitoramento das mudanças na absorbância a 412 nm por 1 minuto. Esses dados foram coletados após 40 dias de transferência para a casa de vegetação, em ensaios com delineamento inteiramente casualizado, um número mínimo de 7 unidades experimentais por genótipo e analisados no programa SAS aplicando ANAVA e teste de Duncan.

3.8.4 - Géis de atividade CAT e SOD

Os extratos vegetais foram analisados electroforeticamente em condições não denaturantes em géis de 8% de poliacrilamida e 4% no gel de empacotamento. Uma corrente constante de 1.5 mA/gel foi aplicada por 6 horas a 4 °C. Os tampões de eletroforese e os géis foram preparados como descrito por Laemmli (1970). Logo após a separação electroforética, as atividades SOD e CAT foram determinadas como descrito por Beauchamp & Fridovich (1971) e Woodbury y colaboradores (1971) , respectivamente. No caso da SOD, o gel não desnaturante foi lavado com água deionizada e destilada e incubado numa mistura de reação contendo tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, EDTA 1 mM, riboflavina 0,05 mM, NBT 0,1 mM, e 0,3 % "N,N,N', N'-tetramethylethylenediamide". Ao final deste período, a mistura de reação foi eliminada. O gel foi lavado com água destilada e deionizada e então, iluminado até o desenvolvimento de bandas da atividade SOD. A reação foi parada com uma solução de ácido acético 7 %. A SOD bovina foi aplicada como padrão da atividade. No caso da atividade CAT o gel foi lavado com água deionizada e destilada, e logo incubado com solução de H₂O₂ 0.003% em agitação. O gel foi lavado novamente com água deionizada e destilada e colocado na mistura de reação contendo FeCl₃ 1% e K₃Fe (CN)₆ 1% sob agitação, até o desenvolvimento de bandas de atividade CAT. A reação foi parada com uma solução de ácido acético 7 %.

3.8.5 - Determinação das isoformas de SOD

Para diferenciar as isoformas de SOD, partiu-se das mesmas condições do gel de atividade, mas utilizou-se uma concentração maior e um minigel por amostra analisada. Após obter o gel de atividade, este foi dividido em três partes: a primeira parte foi incubada por 20 minutos em tampão fosfato pH 8,0, a segunda incubou-se por 20 minutos em uma solução de KCN (29 mg de EDTA, 13 mg de KCN dissolvidos em 100 mL de tampão fosfato pH 8,0), e a terceira parte incubou-se por 20 minutos em solução de H₂O₂ (29 mg de EDTA, 70 µL de H₂O₂ 30%, dissolvidos em 100 mL de tampão fosfato pH 8,0). Finalmente, as três partes foram incubadas na solução corante por 30 minutos, lavadas rapidamente e deixadas na luz até o aparecimento de bandas das isoformas. Em seguida, paralisou-se a reação com uma solução de ácido acético 6 % (v/v). As isoformas Cu/Zn SOD citosólicas são inativadas por KCN e H₂O₂, a isoforma Mn-SOD mitocondrial é resistente a KCN e H₂O₂, enquanto que a Fe-SOD cloroplástica é inativada por H₂O₂ e resistente a KCN.

3.9 - Avaliação de características fenotípicas

Os caracteres fenotípicos determinados em plantas de batata transgênica e tipo selvagem (o mesmo cultivar sem transformação) derivadas de material micropropagado e mantidas em condições de casa de vegetação, foram: peso fresco da parte aérea e peso e número de tubérculos. Estes dados foram coletados após 80 dias de transferência para a casa de vegetação, em ensaios com delineamento inteiramente casualizado, um número mínimo de 10 unidades experimentais por genótipo, sendo analisados pelo programa SAS aplicando ANAVA e teste de DUNCAN.

Para as plântulas cultivadas *in vitro*, os caracteres fenotípicos avaliados foram: presença / ausência de microtubérculos, número de nós e altura das plântulas. A presença de microtubérculos foi verificada em plântulas após seis semanas de crescimento. Já os demais caracteres foram determinados em plântulas de quatro semanas de desenvolvimento. Os ensaios foram em delineamento inteiramente

casualizado, e um número mínimo de 10 unidades experimentais por genótipo, sendo analisados pelo programa SAS aplicando ANAVA e teste de Duncan.

Em condições de estresse salino *in vitro*, os caracteres fenotípicos analisados foram: peso fresco da plântula e altura da plântula. Em todos os casos, as leituras foram feitas em plântulas em estresse por 3 semanas em ensaios com delineamento inteiramente casualizado, um número mínimo de 10 unidades experimentais por genótipo, e analisados pelo programa SAS aplicando ANAVA e teste de Duncan.

3.10 - Análises estatísticas e transformação de dados

A interpretação e análise dos dados neste trabalho foram feitas usando a técnica da ANAVA, a qual é baseada em um modelo matemático, que pressupõe um modelo linear e a aceitação de algumas pressuposições básicas: os diversos efeitos são aditivos, os erros são independentes (tem a mesma variância), e são normalmente distribuídos. Quando estas essas premissas não são satisfeitas, pode-se afetar a precisão estatística e aumentar os erros tipo I (rejeitar uma hipótese verdadeira) e tipo II (aceitar uma hipótese falsa). Assim, podem apresentar característica de heterogeneidade de variância, não aditividade e não normalidade ou autocorrelações, como por exemplo, entre a variância e a média (Compton, 1994). Para testar se o conjunto de dados cumpre as premissas do modelo matemático, é preciso analisar os desvios da média nos tratamentos, por meio de ferramentas tais como o Teste de Bartlett's ou o teste de F para homogeneidade de variância. Caso os dados não tenham a distribuição normal, recomenda-se fazer transformação de dados para restaurar a homogeneidade da variância, melhorar a aditividade e distribuir os desvios ao acaso. No caso de decidir trabalhar com os dados sem transformar, é absolutamente necessário aplicar outras técnicas onde não exista a necessidade de premissas, tal como as técnicas de Estatística Não-Paramétrica (Fernandez, 1992). Uma escala comum é usada quando se aplica a transformação de dados e os intervalos das médias dos tratamentos não são mudadas, mantendo-se as comparações entre elas válidas (Compton, 1994). O programa SAS têm ferramentas que

testam a normalidade dos dados, sugerem o tipo de transformação requerida e ainda testam a transformação para assegurar-se que o problema foi resolvido. Sempre que necessário, transformações de dados foram feitas e nos resultados indica-se o tipo de transformação utilizada.

4 - RESULTADOS

4.1 - Obtenção das plantas transgênicas

Discos de minitubérculos de batata foram transformados via *Agrobacterium tumefaciens* sendo que várias plântulas foram regeneradas após 10 semanas, e cultivadas em meio contendo um agente seletivo, o antibiótico kanamicina, sugerindo a origem transgênica destas plântulas.

A eficiência da transformação foi de 40 % medida como uma porcentagem dos discos de tubérculos cocultivados com *A. tumefaciens* que regeneraram plântulas em meios de seleção. Cada plântula regenerada é considerada um transformante primário potencial.

É interessante notar que depois de vários ensaios de transformação com resultados negativos, o sucesso foi alcançado com a modificação da tampa dos frascos de vidro os quais eram mantidos os discos de minitubérculos, logo e durante o cocultivo. A simples modificação consistiu em perfurar o meio da tampa (5 cm de diâmetro) e preenchê-lo com tampões de algodão. Desta maneira, aumentou-se a troca gasosa entre o interior e o exterior do frasco, diminuindo o teor de potenciais inibidores da regeneração, como o etileno. Essas plântulas foram micropropagadas em meios contendo 150 mg/L de kanamicina e praticamente 100 % produziram raízes normais. Após 4 semanas da micropropagação, as plântulas foram transferidas para casa de vegetação, onde se mantiveram até produzirem minitubérculos.

4.2 - Caracterização molecular das plantas transgênicas de batata.

4.2.1 - PCR.

Para fazer a detecção da presença do transgene no genoma da batata, procedeu-se a análise por PCR em plântulas micropropagadas, derivadas de transformantes primários que enraizaram-se em meios seletivos. A partir do DNA isolado de 6 transformantes independentes, regenerados de minitubérculos diferentes, foi verificada a amplificação do gene *lba*, enquanto não foi observada a amplificação do gene nas plantas controle (Figura 4).

4.2.2 - RT-PCR

A confirmação da presença física do transgene por PCR, não assegura que ele seja sendo transcrito, uma vez que o gene pode inserir-se em regiões de heterocromatina. Com o objetivo de detectar a presença de transcritos do gene *lb* nas plantas transgênicas, o RNA total foi isolado e utilizado para a obtenção do cDNA específico. Os resultados mostraram que o gene *lb* foi transcrito em diferentes transformantes independentes, enquanto que sua presença não foi observada nas plantas controle (Figura 5).

4.2.3 - Western Blotting

A partir da identificação do transgene via PCR e seus transcritos via RT-PCR, é necessário estudar a expressão via presença da proteína no compartimento ao qual ela foi direcionada, além do seu processamento no interior da organela. Desta forma, o Western Blotting foi realizado em frações enriquecidas de cloroplastos após um fracionamento celular. A imunodeteção revelou a presença de uma banda de peso molecular ligeiramente superior no peso molecular de 16 kDa correspondente ao peso molecular da Lb isolada de nódulos de soja (Figura 6). Esta diferença pode ser explicada pela presença de 5 resíduos de aminoácidos na região de ligação entre a seqüência de direcionamento cloroplástica e a seqüência que codifica para a Lb.

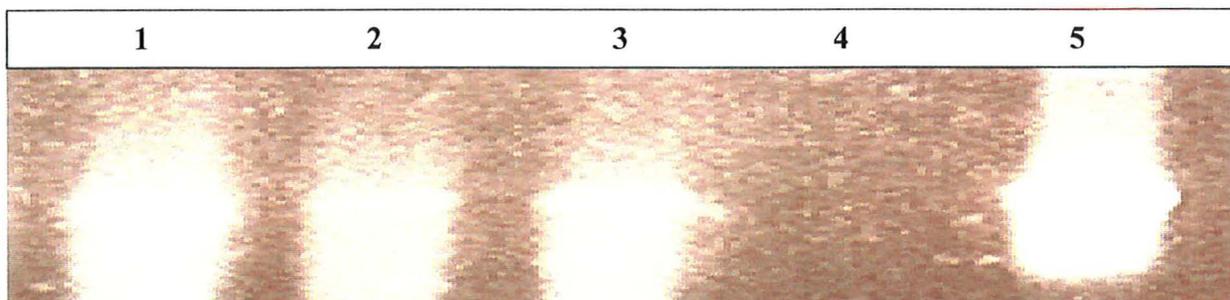


Figura 4 : Análise por PCR em plantas de batata. 1-3 = Fragmento amplificado de transformantes primários (B1,B2,B3), 4 = controle negativo batata não transformada (WT), 5 = controle positivo amplificação do Bin2-35SrbcslbaE9 (*Lba*)

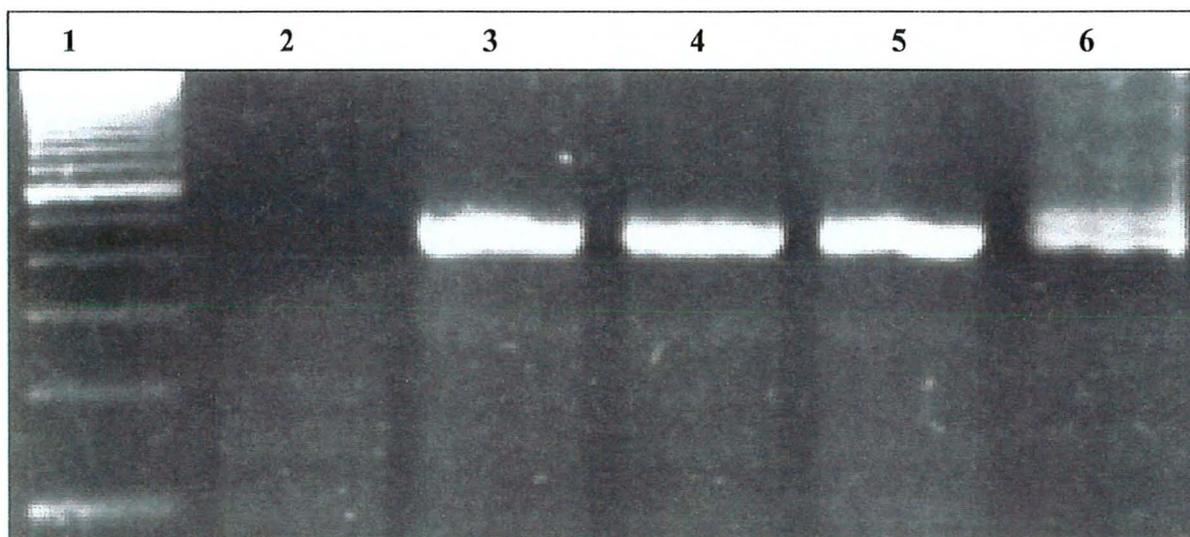


Figura 5: RT-PCR em plantas transgênicas de batata. 1 = Marcador de peso molecular (1Kb DNA ladder), 2 = controle negativo batata não transformada (WT), 3-5 = linhagens transgênicas (B1, B2, B3), 6 = controle positivo Bin2-35SrbcslbaE9 (*Lba*).

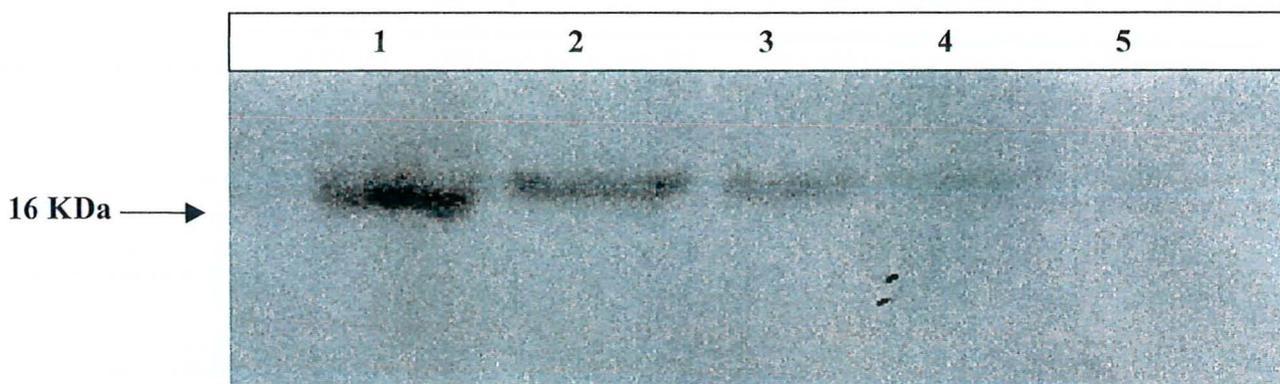


Figura 4 : Imunodeteção da leghemoglobina nas frações enriquecidas de cloroplastos nas plantas de batata, 20 ug por amostra. 1 = controle positivo Lba (0,1 ug) 2-4 = Plantas transgênicas 5 = controle negativo, planta não transformada.

4.3 - Análises das plantas transgênicas em condições de casa de vegetação.

4.3.1 - Atividade da CAT, GR e SOD

A leghemoglobina é uma importante fonte geradora de espécies de oxigênio reativo nos nódulos. Além disso, está presente em altas concentrações e sujeita a auto-oxidação, produzindo O_2^- e H_2O_2 , além de ser capaz de gerar OH^- (Puppo et al., 1982; Puppo & Halliwell, 1988; Becana & Klucas, 1990; Dalton et al., 1991). A atividade das enzimas envolvidas na proteção do estresse oxidativo pode ser alterada a partir da expressão heteróloga da Lb em função de sua alta afinidade por oxigênio. Devido a presença de atividade pseudo-peroxidativa da Lb pela interação do grupo heme com doadores de elétrons presentes no cloroplasto, que teoricamente competiriam com a atividade CAT. Visando obter evidência do efeito da atividade Lb sobre enzimas do estresse oxidativo nas plantas transgênicas de batata, foi determinada a atividade total da CAT e GR, como também a observação de isoformas de CAT e SOD utilizando géis de atividade.

4.3.1.1 - Atividade CAT

Foram conduzidos dois diferentes experimentos para analisar a atividade CAT nas plantas transgênicas e plantas controle (não transformadas) em condições de casa de vegetação. Os resultados mostram que não houve diferença significativa na atividade da CAT entre os genótipo transgênicos e o controle (Figura 7), quando efetuado a análise de variância e o teste de Duncan nos dados com transformação logarítmica no SAS (Anexo 1). Entretanto, a atividade de diferentes isoformas da enzima foi alterada em função da inoculação de patógenos em plantas de batata (Niebel et al., 1995). Estas observações sugerem que a presença de um estresse biótico foi capaz de afetar a expressão de isoformas da enzima. A fim de verificar se a Lb poderia induzir ou reprimir a síntese de isoformas da enzima, foi realizado um estudo a partir de géis de atividade da CAT Contrastando com os dados de Niebel et al (1995) não foi observada uma alteração no padrão das isoformas (Figura 8).

4.3.1.2 Atividade GR

O Superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é degradado à H_2O_2 pela SOD, que por sua vez é degradado à H_2O pelo ciclo ascorbato-peroxidase, no qual a GR tem um papel importante. Como efeito colateral da atividade da Lb nos cloroplastos de batata, podia-se esperar um incremento da quantidade de espécies de oxigênio reativo e aumento na atividade de GR. Leituras na atividade desta enzima entretanto, não detectaram diferenças significativas entre as plantas transgênicos e controle (Figura 9). Essa conclusão foi verificada pela análise de variância e o teste de Duncan aplicado nos dados transformados [$1/RC(Y)$], (Anexo 2).

4.3.1.3-Atividade da SOD

O efeito da Lb sobre a SOD foi monitorado por géis de atividade (Figura 10). Os resultados mostraram que não foi afetada a atividade das isoformas deSOD pela expressão de Lb nos cloroplastos da batata.

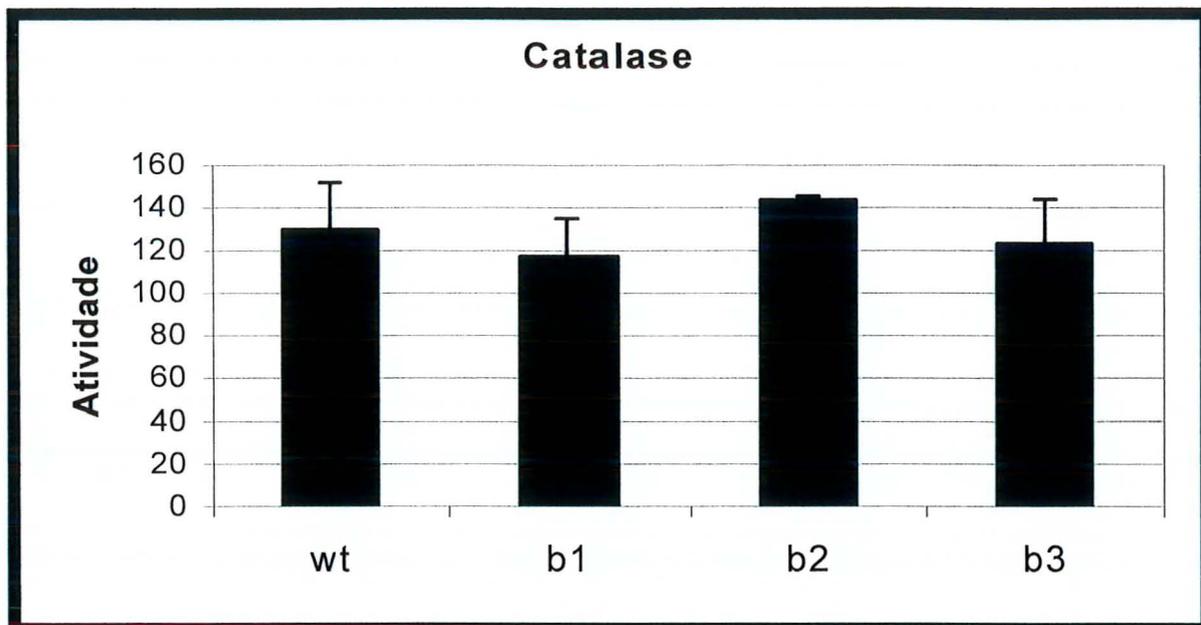


Figura 7: Atividade CAT ($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{proteína} \cdot \text{min}^{-1}$) nas folhas de plantas transgênicas (b1, b2, b3) e controle (wt). As análises foram efetuadas em plantas 40 dias após da transferência para casa de vegetação. Os dados representam a média de 6 plantas \pm desvio padrão.

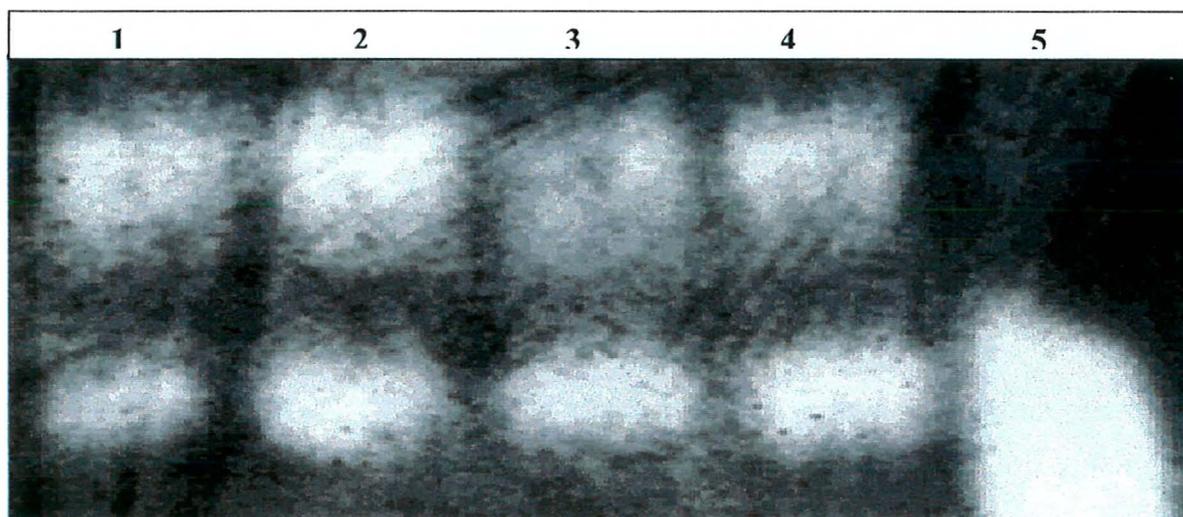


Figura 9: Gel de Atividade CAT nas folhas de plantas transgênicas (b1, b2, b3) e controle (wt). As análises foram efetuadas em plantas 40 dias após da transferência para a casa de vegetação. Os dados representam a média de 6 plantas \pm desvio padrão.

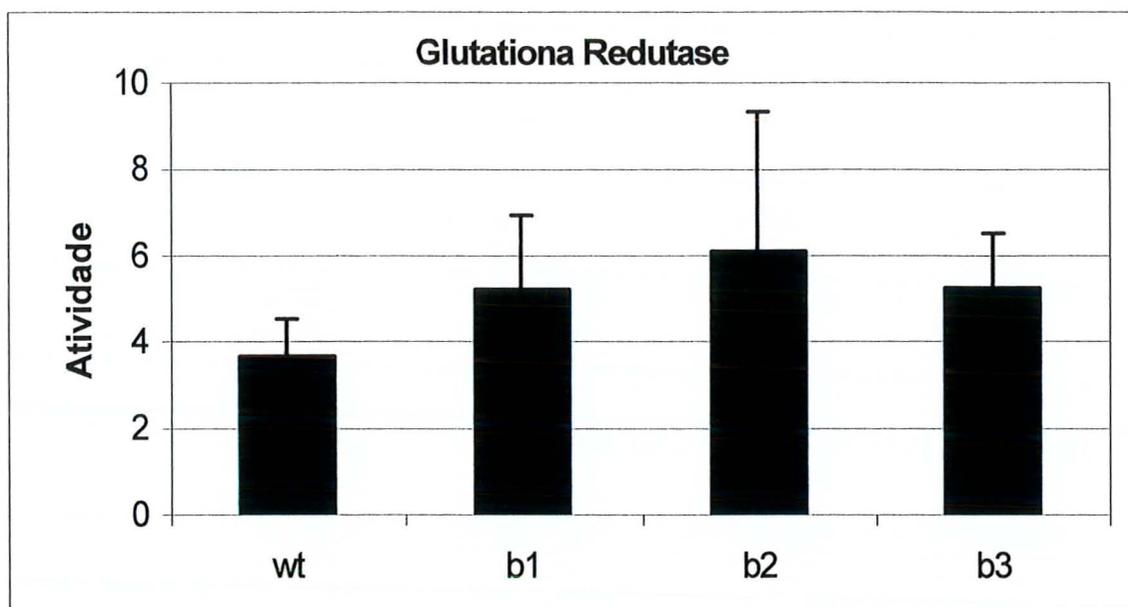


Figura 9: Atividade GR ($\mu \text{ mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{proteína} \cdot \text{min}^{-1}$) nas folhas de plantas transgênicas (b1, b2, b3) e controle (wt). As análises foram efetuadas em plantas após 40 dias de transferência a casa de vegetação. Os dados representam a média de 6 plantas \pm desvio padrão.

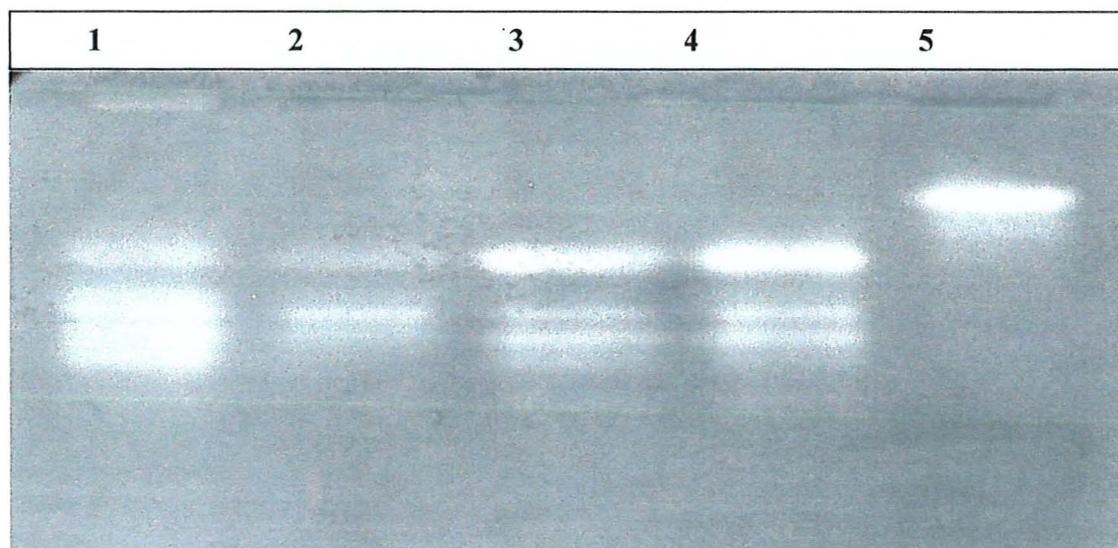


Figura 10 : Gel de atividade SOD. 1 = controle negativo (extrato foliar das plantas controle).. 2 - 4 = extrato foliar das plantas transgênicas b1,b2 e b3, respectivamente. 5 = controle positivo (1 unidade de SOD bovina).

Usando a técnica para discriminar isoformas (Figura 11), foram encontrados os tipos descritos na literatura: uma Mn-SOD mitocondrial, duas Cu/Zn-SOD citoplasmáticas e uma Cu/Zn SOD cloroplástica (Perl et al., 1993; Fester & Schuster, 1995).

Portanto, a análise da atividade total ou da presença de diferentes isoformas de enzimas relacionadas à proteção contra o estresse oxidativo mostram que a presença da Lb não interferiu na geração de espécies reativas de oxigênio. Resultados semelhantes também foram obtidos com plantas de fumo expressando a Lb no interior dos cloroplastos (Barata et al., 2000).

4.3.2 - Conteúdo de clorofila

Recentemente foram relatados efeitos de um hemoglobina bacteriana, quando expressa no citossol de plantas de fumo, sobre a síntese de clorofila (Holmberg et al., 1997). Neste trabalho, os autores sugeriram que a Hb bacteriana serviria como um transportador de O₂ para enzimas que necessitam de oxigênio durante a biossíntese de clorofila. Leituras feitas com o Minolta Chlorophyll Meter SPAD 502, em unidades arbitrárias (Figura 12), mostraram que existem diferenças significativas ($n = 12$, $P < 0,05$) entre as linhagens transgênicas e o controle (Anexo 3). Entretanto, contrariamente aos resultados obtidos por Holmberg et al. (1997) que observaram um aumento médio de 30 a 40 % no teor de clorofila total, os resultados mostraram uma redução da ordem de 8 %. Vale ressaltar que no primeiro caso, a proteína foi expressa no citossol, enquanto que no presente estudo a Lb foi direcionada aos cloroplastos. Além disso, a afinidade da proteína entre a Hb bacteriana e a Lb de soja são muito diferentes (Bulow et al., 1999). No entanto, este dado chega a ser surpreendente quando comparado com plantas de fumo expressando a Lb nos cloroplastos (Barata et al., 2000). Neste trabalho, não foram observadas diferenças significativas seja no teor de clorofila total, seja nos níveis de clorofilas A e B. As razões para tais diferenças não são compreendidas, a menos que a resposta seja diferenciada entre as plantas de batata e fumo à presença da Lb.

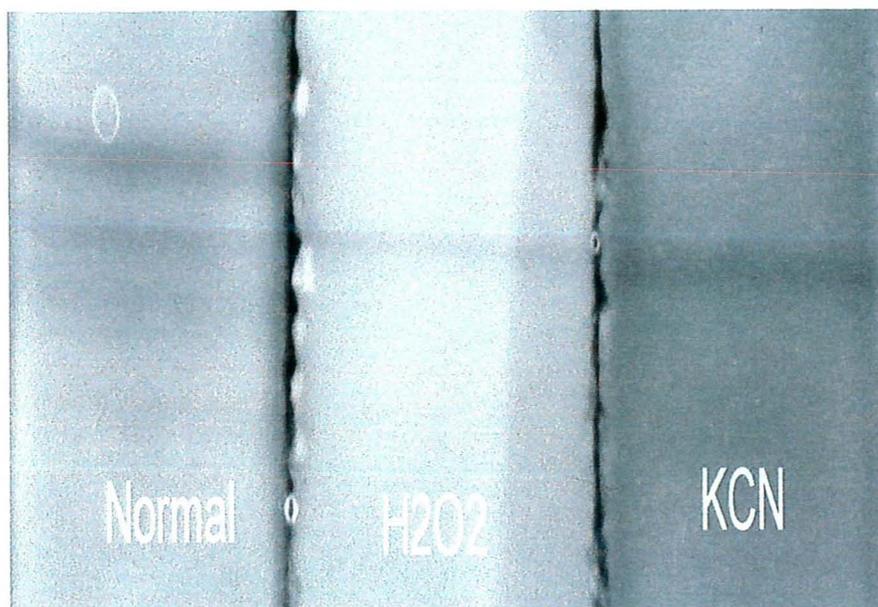


Figura 11 : Identificação de isoformas da SOD. Normal: incubado em tampão fosfato (Cu/znSOD citoplasmica e cloroplastica; MnSOD mitocondrial); MnSOD mitocondrial resistente a incubação em H_2O_2 e KCN; Cu/Zn citoplasmatica inativada por incubação em H_2O_2 e KCN; FeSOD cloroplastica é inativada por H_2O_2 e resistente a KCN.

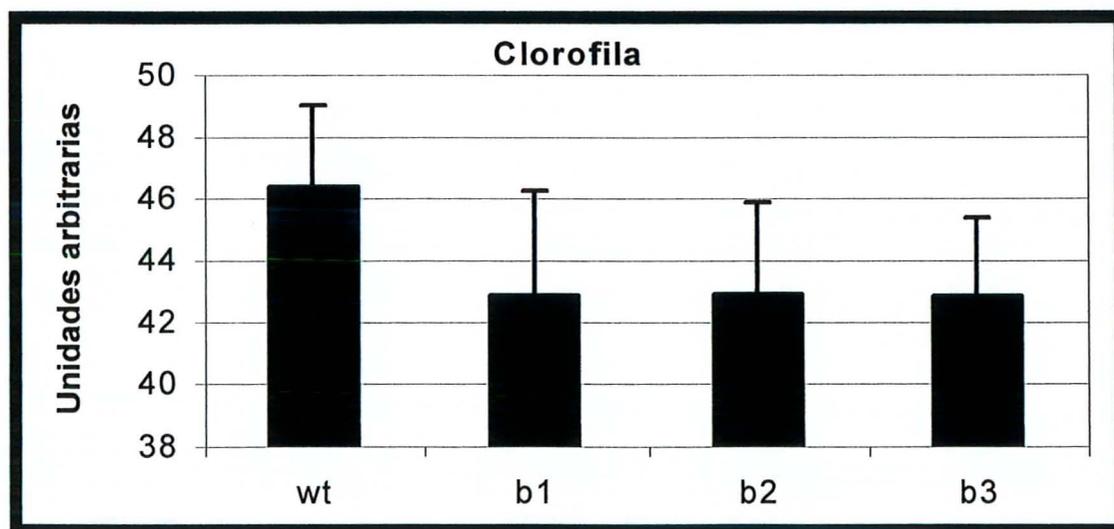


Figura 12: Teor de clorofila total em folhas de plantas transgênicas (b1, b2, b3) e controle (wt). Leituras feitas com o Minolta Chlorophyll Meter SPAD 502 em unidades arbitrárias. As análises foram efetuadas em plantas 40 dias após a transferência para a casa de vegetação. Os dados representam a média de 12 plantas \pm desvio padrão.

4.3.3 - Peso fresco da parte aérea

O oxigênio atua como substrato ou cofator em muitas reações bioquímicas no metabolismo primário e secundário das espécies vegetais. Uma forma de monitorar o efeito da Lb no metabolismo da batata é observar o desenvolvimento das plantas transformadas. A análise do peso fresco da parte aérea (folhas e caules) após 80 dias da transferência para a casa de vegetação mostrou que as plantas controle produziram 3,37 vezes mais matéria fresca do que as plantas transgênicas (Figura 13). Análises estatísticas (ANAVA e teste de Duncan) comprovaram essas observações (Anexo 4). Estes resultados podem ser melhor visualizados na Figura 14 que mostra o desenvolvimento das plantas (transgênicas e controle) na casa de vegetação. Os resultados demonstram um efeito detrimental da Lb expressa nos cloroplastos da batata sobre a produção de biomassa.

4.3.4 - Produção de tubérculos

A produção e número de tubérculos por planta foi monitorada aos 80 dias após a transferência para a casa de vegetação. Análise do número de tubérculos por planta (Figura 15) não mostraram diferenças significativas (ANAVA e teste de Duncan, Anexo 5) entre linhagens transgênicas e a linhagem controle não transformada. Porém, a análise do peso de tubérculos por planta mostrou que as plantas controle não transformadas eram quase 5 vezes superiores que a média das plantas transgênicas (Figura 16). ANAVA e teste de Duncan mostraram diferenças significativas entre os tratamentos (Anexo 6).

Os resultados demonstram um efeito negativo da Lb expressa nos cloroplastos da batata sobre a produção de tubérculos, via alteração no peso. Entretanto com relação ao número de tubérculos, nenhuma variação significativa foi observada entre as linhagens

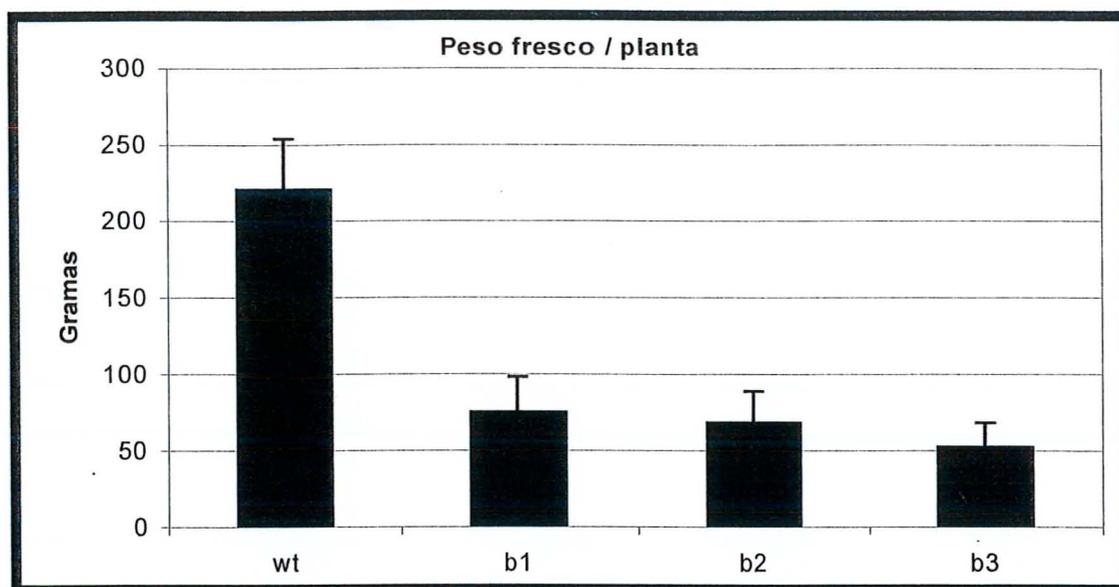


Figura 13: Peso fresco da parte aérea (gramas) das linhagens transgênicas (b1, b2 ,b3) e controle (wt). As análises foram efetuadas em plantas 80 dias após a transferência para a casa de vegetação. Os dados representam a média de 11 plantas \pm desvio padrão.



Figura 14 : Desenvolvimento das plantas na casa de vegetação. b1, b2, b3 representam linhagens transgênicas e WT linhagem controle, 40 após da transferência para as condições de casa de vegetação

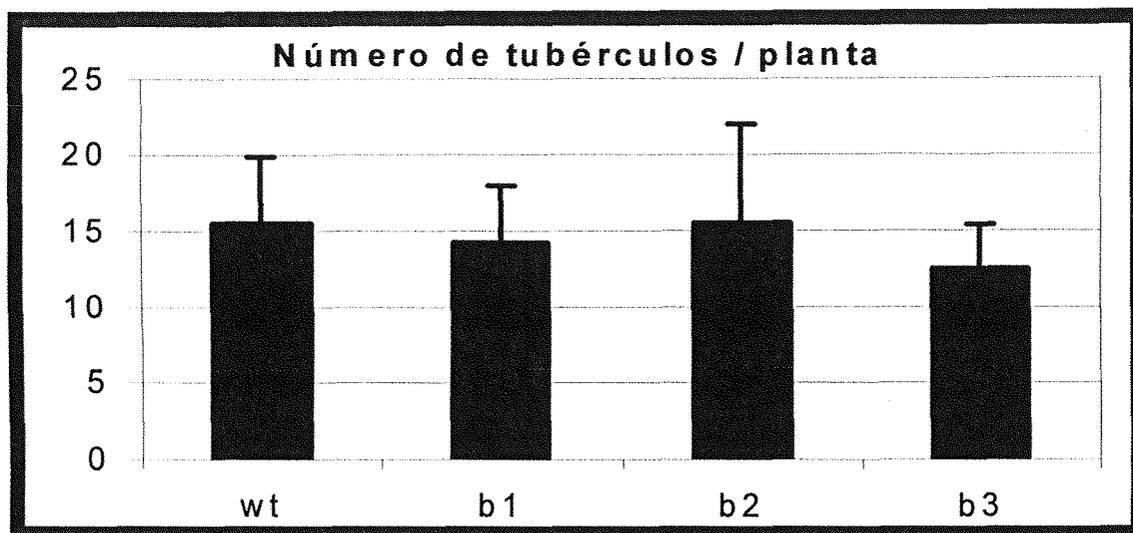


Figura 15: Número de tubérculos por planta em linhagens transgênicas (b1, b2, b3) e controle (wt).. As análises foram efetuadas em plantas 80 dias após da transferência para a casa de vegetação. Os dados representam a média de 10 plantas \pm desvio padrão.

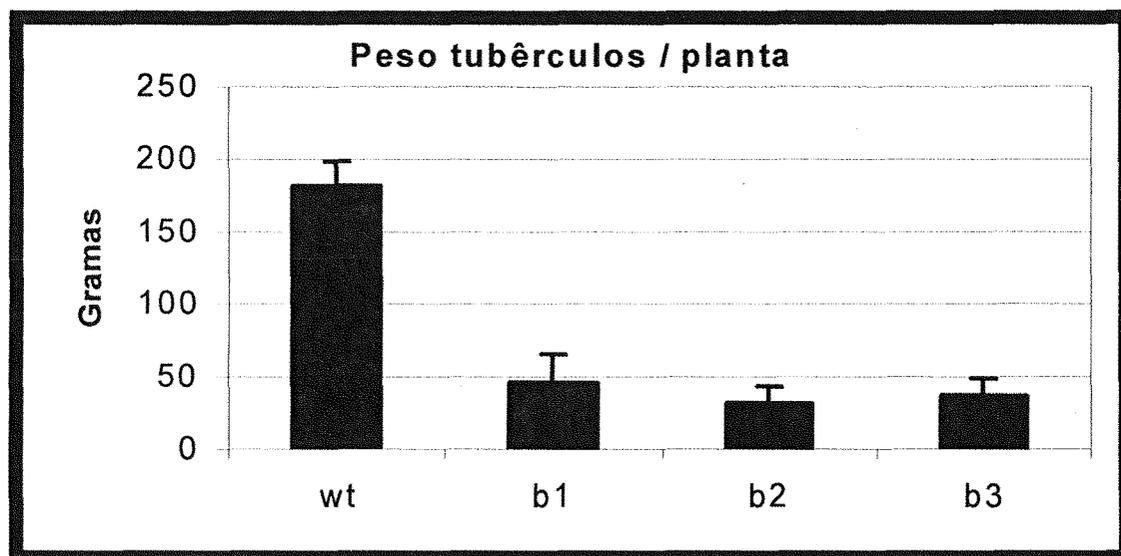


Figura 16: Peso de tubérculos (gramas) por planta em linhagens transgênicas (b1, b2, b3) e controle (wt).. As análises foram efetuadas em plantas 80 dias após da transferência para a casa de vegetação. Os dados representam a média de 10 plantas \pm desvio padrão.

4.3.5 - Teor de sacarose e amido

Um parâmetro importante na avaliação de um efeito potencial da Lb no metabolismo da batata foi monitorar o teor de sacarose e amido no período da manhã e tarde nas plantas, 40 dias após a transferência para as condições de casa de vegetação.

No período da manhã ocorreram diferenças tanto no teor de sacarose como no teor de amido (Figura 17; Figura 18), mas a discriminação de médias pelo teste de Duncan (Anexo 7; Anexo 9) indicou que as diferenças não foram significativas entre as plantas transgênicas e o controle. No caso da sacarose existem diferenças entre um grupo de genótipos (b1 e controle) quando comparado com outro (b2 e b3). No caso do amido também existem diferenças entre um grupo de genótipos (b1 e controle) quando comparado com outro (b2 e b3). Entretanto estas observações devem ser interpretadas com precaução uma vez que não foram verificadas diferenças na expressão da proteína entre os transformantes analisados.

No período da tarde, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos após análise estatística [ANAVA e o teste de Duncan (Anexo 8; Anexo 10)], tanto com relação aos teores de sacarose (Figura 17), quanto com os de amido (Figura 18).

4.4- Análises das plantas transgênicas cultivadas *in vitro*

Plantas transgênicas e não transformadas, micropropagadas a partir de nós, foram observadas durante cinco ciclos de cultura “*in vitro*”. Cada ciclo se considera de 4 semanas, tempo no qual as plantúlas estão prontas para ser micropropagadas novamente. O propósito das observações foi detectar alterações fenotípicas que poderiam ser o resultado da variação somaclonal induzida pelo sistema de regeneração utilizado na transformação.

Nenhuma mudança fenotípica significativa foi observada, mantendo-se as características gerais do fenótipo original (altura, cor das folhas, cor do caule, forma das folhas, dados que não são mostrados), exceto nos caracteres que são apresentados a seguir.

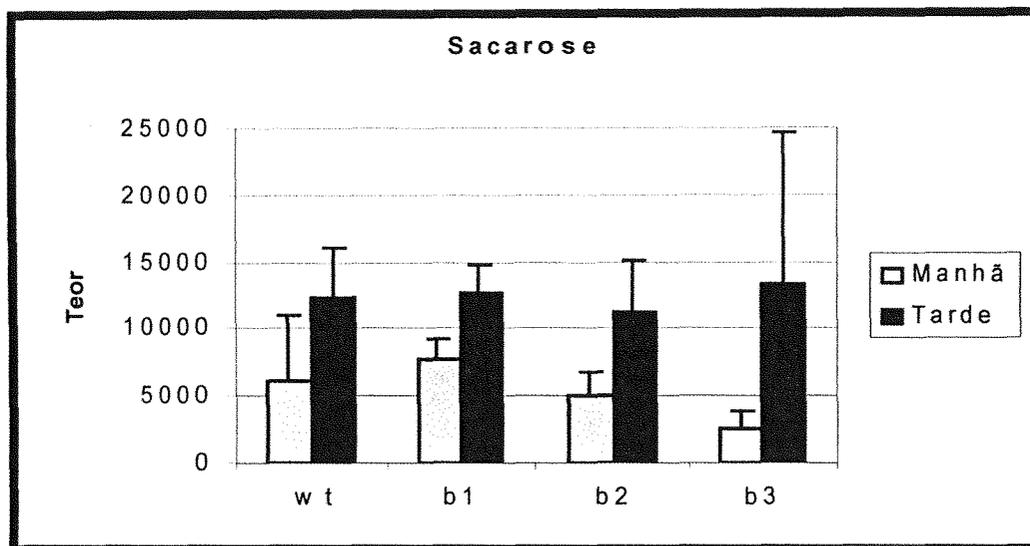


Figura 17: Teor de sacarose ($\mu\text{mol hexose equiv. mg}^{-1}\text{chl}$) em folhas de batata transgênica (b1, b2, b3) e controle (wt) cultivadas em casa de vegetação. As análises foram realizadas em dois períodos distintos: manhã (6-7 h) e tarde (13-14 h). Os valores representam médias de 6 plantas \pm desvio padrão.

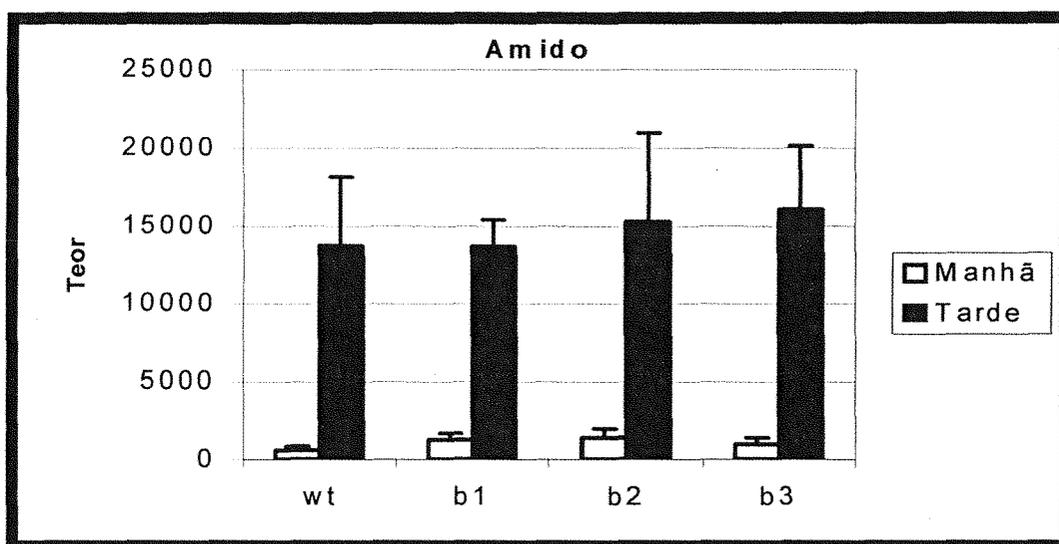


Figura 18: Teor de Amido ($\mu\text{mol hexose equiv. mg}^{-1}\text{chl}$) em folhas de batata transgênica (b1, b2, b3) e controle (wt) cultivadas em casa de vegetação. As análises foram realizadas em dois períodos distintos: manhã (6-7 h) e tarde (13-14 h). Os valores representam médias de 6 plantas \pm desvio padrão.

4.4.1 - Número de nós

O número de nós foi determinado em plantas transgênicas e controle, três semanas após a inoculação dos nós nos meios de cultura *in vitro* (Figura 19). A análise dos dados mostraram diferenças significativas nos dados transformados [Raiz(Y)], tanto na ANAVA quanto no teste de Duncan (Anexo 11). As médias das plantas controle estiveram em $8,77 \pm 0,44$ nós/planta enquanto que as linhagens transgênicas variaram entre $12,7 \pm 0,66$ e $13,2 \pm 0,83$ nós/planta. Os resultados sugerem que a Lb influencia o carácter número de nós na batata em cultura *in vitro*.

4.4.2-Microtuberização

Uma observação interessante feita nos ciclos de micropropagação analisados, foi a ocorrência de microtuberização espontânea nas linhas transgênicas (Figura 20). O processo iniciava-se após 4 semanas do cultivo e, com 6 semanas, 95% das plantas transgênicas apresentavam de 1 a 3 microtubérculos. Os resultados sugerem que a expressão de Lba nos cloroplastos induz a microtuberização espontânea em batata.

4.5- Análises das plantas transgênicas em condições de estresse salino

Com o propósito de avaliar a resistência ou susceptibilidade ao estresse, foram testadas concentrações de 0, 50, 100 e 200 mM de NaCl em plantas transgênicas e em plantas controle cultivadas *in vitro*. Sabe-se que o estresse salino induz a produção de espécies de oxigênio reativo nos cloroplastos e mitocôndrias (Alscher et al., 1997), sendo um modelo interessante para testar os efeitos da Lb em plantas de batata. Os resultados iniciais mostraram que na concentração de 200mM, todas as plantas (transgênicas e não transformadas) foram atingidos gravemente pelo estresse não permitindo diferenciar os genótipos. Na concentração de 50 mM, entretanto, as plantas foram pouco sensíveis ao estresse; já a concentração de 100 mM forneceu uma resposta diferenciada entre os tratamentos (Figura 21).

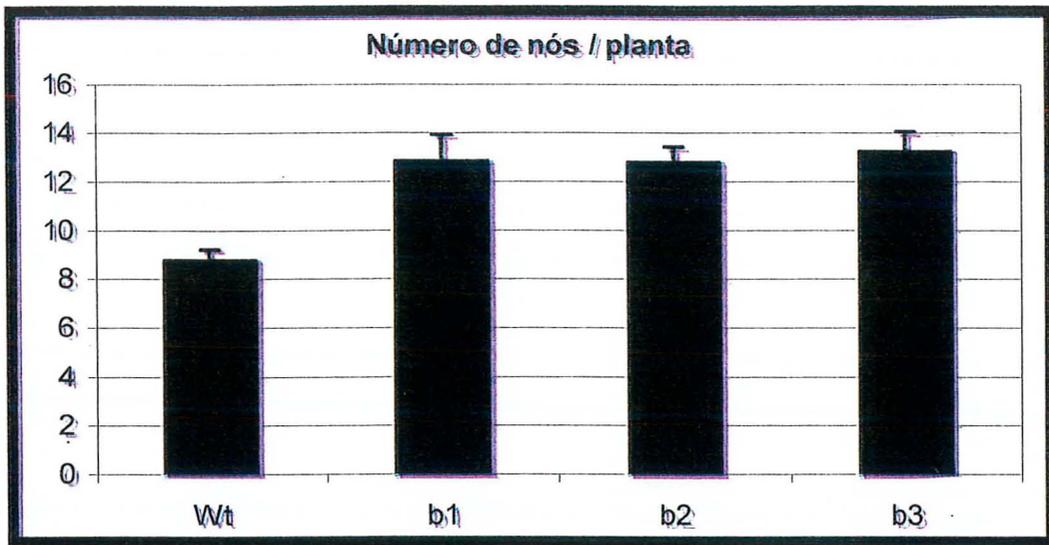


Figura 19: Número de nós por planta em linhagens de batata transgênica (b1, b2, b3) e controle (wt) cultivada *in vitro* por três semanas. Os valores representam médias de 10 plantas \pm desvio padrão.

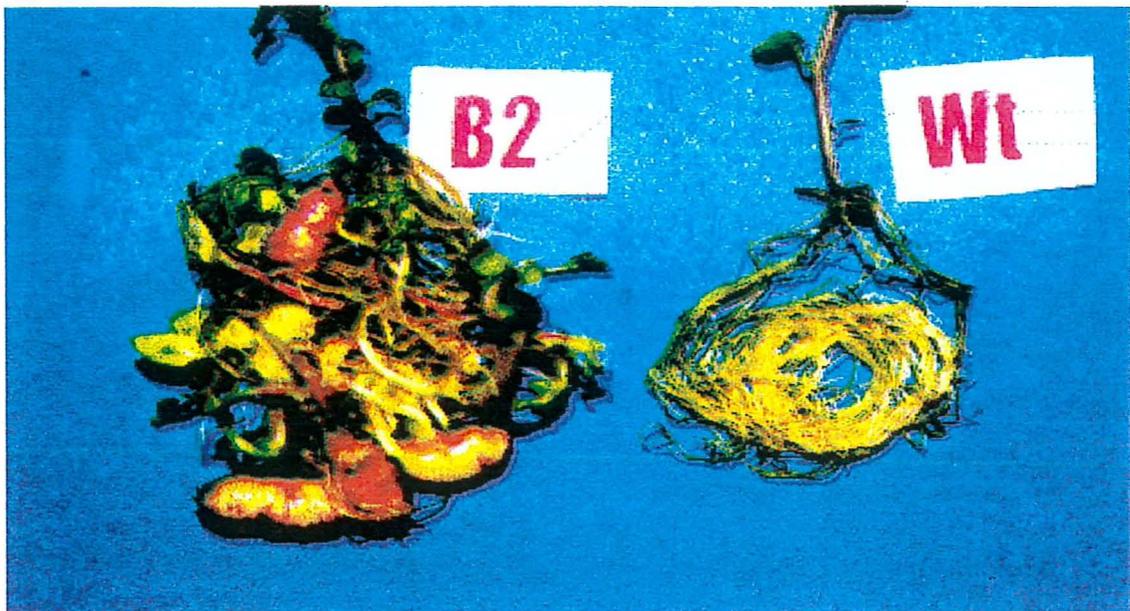


Figura 20: Indução de microtuberização, espontânea em plantas transgênicas (b2) após seis semanas de cultura *in vitro* em meio MS, as plantas controle (WT) não apresentaram desenvolvimento de microtubérculos.

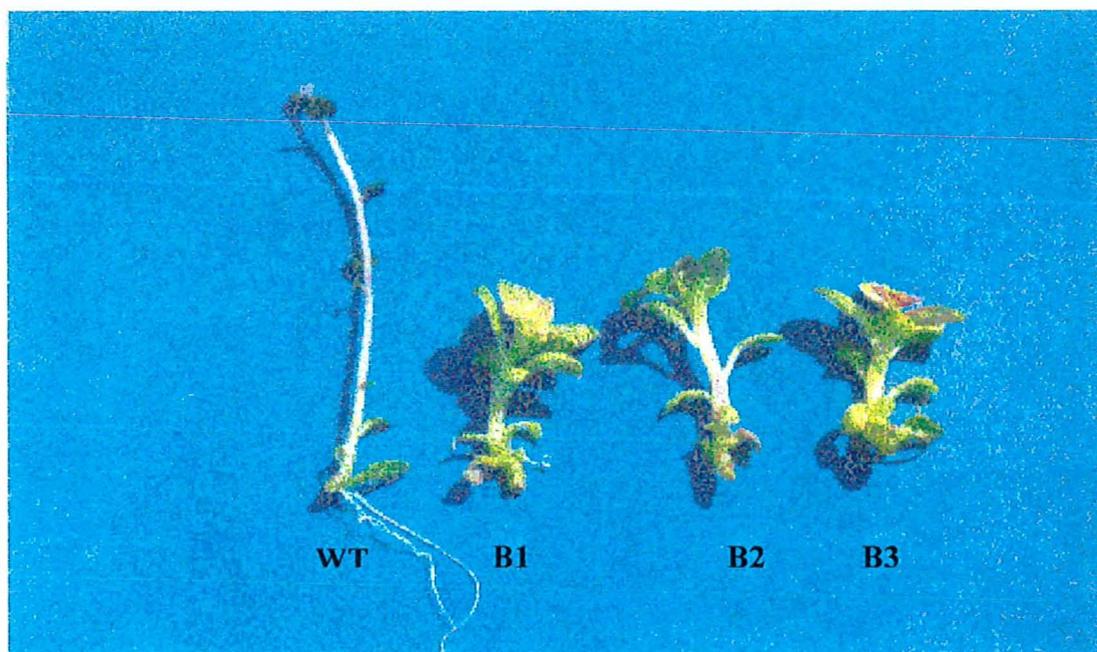


Figura 21: Estresse salino em plantas de batata cultivada em meio MS adicionado com 100 mM de NaCl. após de três semanas de cultura. Wt = plantas controle não transformadas; B1, B2 e B3 linhagens transgênicas

As concentrações utilizadas no experimento foram baseadas em estudos com plantas transgênicas de tabaco com baixos níveis de catalase visando acompanhar a resposta das plantas ao estresse salino (Willekens et al.,1997).

4.5.1 - Atividades da CAT e GR

Análise da atividade CAT e GR foram feitas em plantas transgênicas e plantas controle, mantidas em meios de cultura com 100 mM de NaCl por um período de três semanas. Os resultados mostram que não houve diferenças significativas na atividade CAT e GR (Figura 22; Figura 23) na ANAVA e no teste de Duncan (Anexo 12; Anexo 13), evidenciando mais uma vez, que não há uma relação funcional entre a expressão da Lba nos cloroplastos e as atividades CAT e GR em plantas de batata.

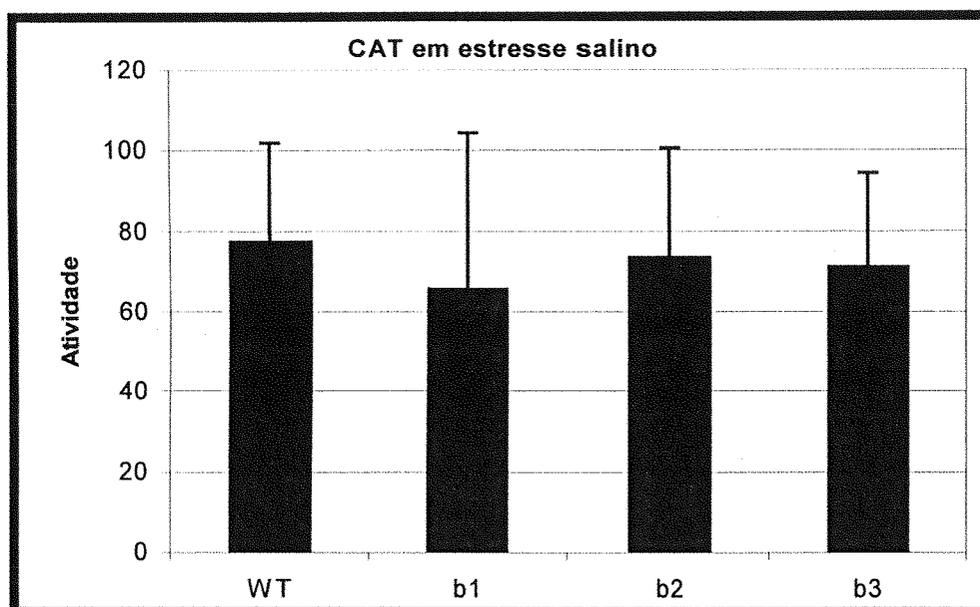


Figura 22: Atividade CAT ($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{proteína} \cdot \text{min}^{-1}$) em plantas transgênicas (b1, b2, b3) e controle (wt). As análises foram efetuadas em plântulas completas após três semanas de cultura *in vitro*. Os dados representam a média de 6 plantas \pm desvio padrão.

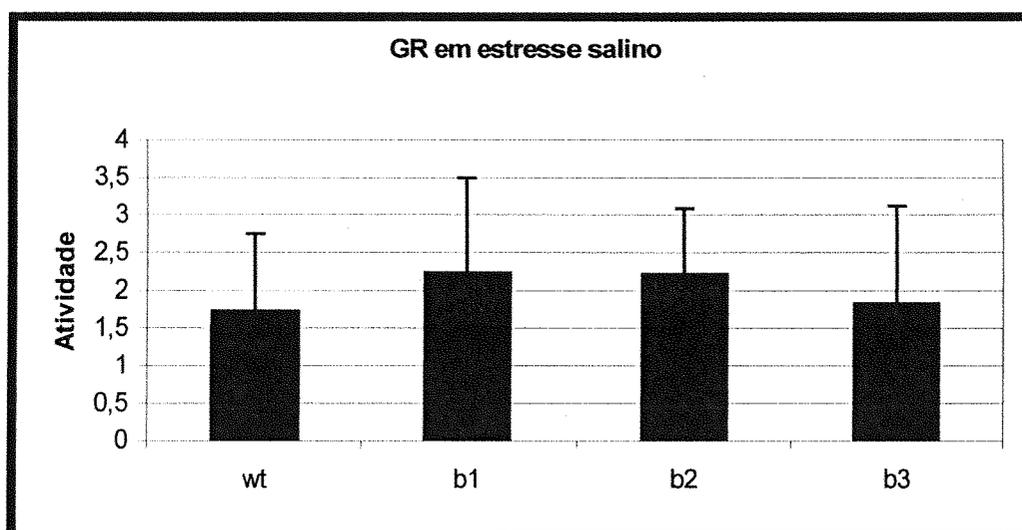


Figura 23: Atividade GR ($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{proteína} \cdot \text{min}^{-1}$) em plantas transgênicas (b1, b2, b3) e controle (wt). As análises foram efetuadas em plântulas completas após três semanas de cultura *in vitro*. Os dados representam a média de 6 plantas \pm desvio padrão.

4.5.2 - Peso fresco das plântulas

Foi determinado o peso fresco das plântulas após três semanas de cultivo em meio contendo 100mM de NaCl. Os resultados mostraram que as plantas transgênicas apresentaram um peso significativamente superior ao observado nas plantas controle (Anexo 14). Os pesos médios das plantas transgênicas variaram entre $85,23 \pm 25,28$ e $106,47 \pm 38,35$ gramas, enquanto que as plantas não transformadas apresentaram um peso médio de $67,09 \pm 14,95$ gramas. Os resultados mostram que as plantas transgênicas são afetadas pelo estresse salino diferentemente das plantas controle (Figura 24).

4.5.3-Altura das plântulas

A altura das plântulas foi medida após três semanas de cultivo em meios com 100mM de NaCl (Figura 25). Os análises estatísticas, ANAVA e teste de Duncan, mostraram diferenças altamente significativas (Anexo 15). As plantas controle apresentaram em uma altura média de $4,51 \pm 1,34$ cm, enquanto que a altura das plantas transgênicas variaram entre $1,77 \pm 0,36$ e $1,88 \pm 0,55$ cm. A análise dos dados referentes à altura das plantas (em meios MS + NaCl), mostrou que as linhagens transgênicas são afetadas negativamente.

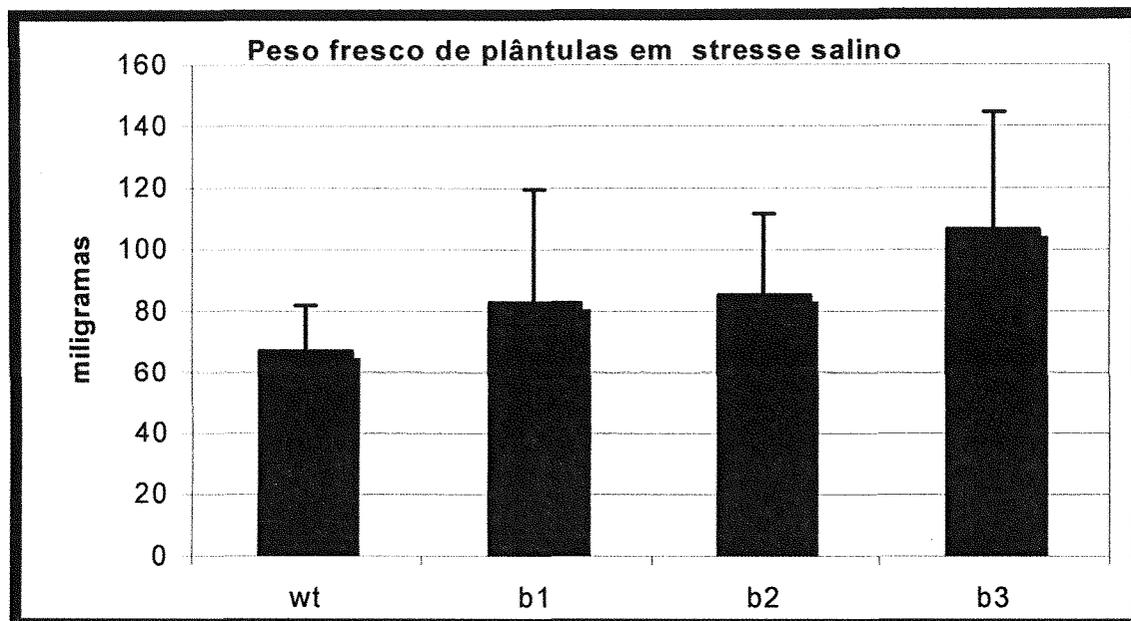


Figura 24: Peso fresco (miligramas) de plântulas submetidas ao estresse por NaCl em linhagens transgênicas (b1, b2, b3) e controle (wt). Os dados foram coletados após três semanas de cultura *in vitro* em meios MS suplementados com 100 mM de NaCl. Os dados representam a média de 10 plantas \pm desvio padrão.

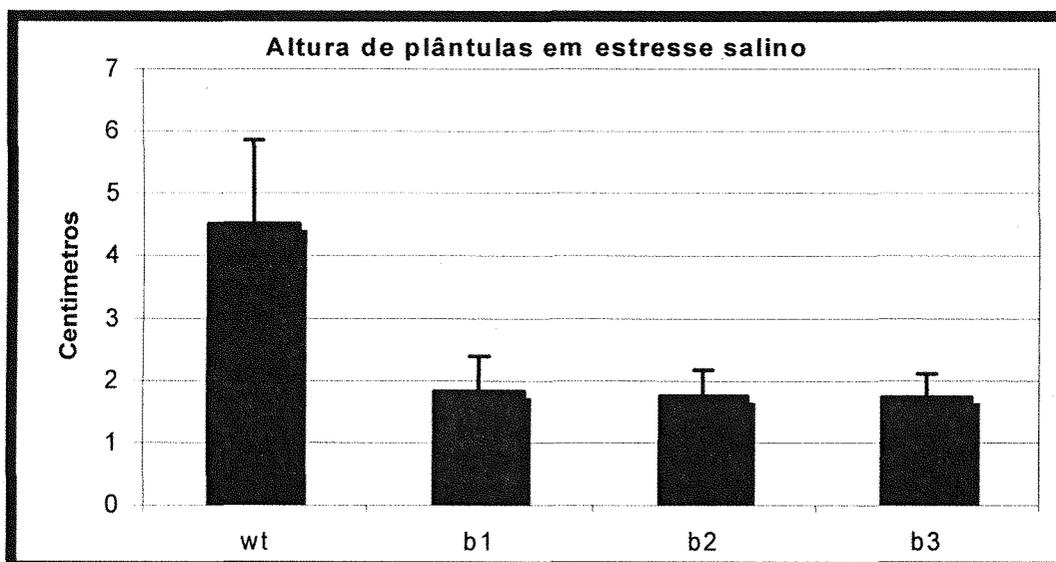


Figura 25: Altura (centímetros) de plântulas submetidas ao estresse por NaCl em linhagens transgênicas (b1, b2, b3) e controle (wt). Os dados foram coletados após três semanas de cultura *in vitro* em meios MS suplementados com 100 mM de NaCl. Os dados representam a média de 10 plantas \pm desvio padrão.

5 - DISCUSSÃO

5.1 - Produção da plantas transgênicas de batata

Apesar de bem descritos na literatura, os métodos de transformação de plantas primam por detalhes dificultam muito a sua interferem significativamente no sucesso da técnica. No presente trabalho uma pequena modificação na tampa do frasco de vidro, perfurando-a e preenchendo a perfuração com algodão, aumentou o intercâmbio gasoso com o ambiente. O aumento da troca gasosa teve como efeito a diminuição de gases que inibiam a regeneração (Suttle, 1998; Machackova et al., 1997; Perl et al., 1988). Dessa forma, os calos que até então não conseguiam diferenciar-se, deram origem à plântulas completas.

O sistema de transformação utilizado permitiu reduzir o uso das técnicas de cultura de tecidos. Embora neste trabalho tenha-se partido de minitubérculos produzidos a partir de plântulas que foram transferidas a casa de vegetação, foi possível fazer a transformação diretamente sobre discos de tubérculos, eliminando a parte inicial da cultura de tecidos. Uma outra vantagem, uma particularidade da espécie transformada, foi a fixação do transgene na população. Sendo a batata propagada assexuadamente por tubérculos, e *in vitro* micropropagada por nós, eliminou-se a necessidade de autofecundações sucessivas para obter material geneticamente estável, evitando a segregação da característica. Desta maneira, sempre trabalhou-se com clones oriundos dos transformantes primários. Além disso, a batata é um bom modelo para testar genes que tenham efeitos potenciais sobre a produção, dado que após 40 dias de desenvolvimento vegetativo, inicia-se a tuberização. Existe, então, na batata um forte

dreno de metabólitos para a produção de tubérculos, acarretando importantes mudanças fisiológicas nas plantas.

A caracterização molecular das plantas transgênicas foi conseguida nos três níveis: inserção do gene de interesse, transcrição, tradução e localização subcelular. A técnica da PCR permitiu detectar a presença do transgene no genoma da batata, enquanto que a técnica da RT-PCR demonstrou a existência de transcritos específicos. Finalmente, a técnica do Western Blotting em frações subcelulares detectou a presença da proteína no interior dos cloroplastos. Com relação à este último aspecto, convém ressaltar que a proteína foi corretamente importada e processada no interior da organela. Com estes três níveis de caracterização molecular, foi possível partir para as análises fisiológicas e bioquímicas das plantas transgênicas

5.2 - A expressão de Lb nos cloroplastos de batata não afeta a atividade da CAT, GR e SOD

Uma mudança no contexto da Lb foi o pano de fundo deste trabalho. A Lb simbiote foi transferida para um contexto não simbiote, o que pode permitir estudar alguns dos papéis propostos para hemoglobinas vegetais não simbiotes. Tem sido proposto que as Hb's primitivas poderiam ter atuado como "scavenger" celular (Arredondo-Peter et al., 1998), eliminando as espécies reativas de oxigênio, atuando de maneira semelhante às enzimas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo. Além disso, foi proposto que a mudança de estado de oxido-redução da Lb poderia produzir espécies reativas de oxigênio, e que a Lb na presença de doadores de elétrons poderia ter uma atividade pseudo-peroxidativa semelhante à atividade da CAT (Becana & Klucas, 1992). Estas observações poderiam sugerir uma alteração na atividade de CAT, SOD e/ou GR como efeito da introdução da Lb no interior dos cloroplastos. Os resultados mostraram claramente que nas plantas transgênicas as atividades das enzimas estudadas não foram alteradas quando comparadas com as plantas controle, mesmo quando colocadas em condições de estresse salino. Estes resultados poderiam indicar uma adaptação do metabolismo celular à presença da Lb nos cloroplastos da batata, mantendo

estável o ambiente na organela. As plantas mostram uma resposta molecular rápida para variações nas condições ambientais (Foyer et al, 1997). No caso da CAT, uma explicação adicional poderia estar no o equilíbrio de efeitos contrários. De um lado um aumento teórico do peróxido derivado das mudanças no estado de oxido-redução da Lb provocaria um incremento na atividade CAT. Mas, de outro lado, uma competição teórica da atividade pseudo-peroxidativa da Lb provocaria uma diminuição na atividade CAT. Uma outra explicação poderia estar no baixo nível da expressão da Lb. Embora não determinada neste trabalho, Barata (1999) reportaram níveis de expressão da Lb entre 0,1 a 0,01 % da proteína solúvel total nos cloroplastos de tabaco transgênico,. No entanto, Holmberg e colaboradores (1997) reportaram efeitos dramáticos no fenótipo de tabaco com níveis de expressão de da hemoglobina de *Vitreoscilla* em 0,1%. Finalmente, uma questão crucial é o estado funcional da proteína no interior do cloroplasto. Se a Lb não estiver funcional, a ausência de efeitos sobre as enzimas mencionadas será explicada facilmente. Mas na literatura são relatados trabalhos referentes à funcionalidade da hemoglobina humana no interior dos cloroplastos de tabaco (Dyerick et al., 1997), sendo ela muito mais complexa que a Lb de soja. Um outro resultado interessante foi observado por Couture et al. (1994) que identificaram Hb cloroplásticas na alga unicelular *Chlamydomonas eugametos*. Estas observações suportam a hipótese de que a Lb esteja na sua forma funcional nos cloroplastos da batata transformada. Adicionalmente, são as evidências de alterações fenotípicas que serão discutidas posteriormente neste trabalho.

5.3 - A expressão da Lb nos cloroplastos da batata afeta o desenvolvimento das plantas transgênicas em condições de casa de vegetação

O desenvolvimento das plantas transgênicas em condições de casa de vegetação foi afetado negativamente. Quando comparadas com as plantas controle, as plantas transgênicas tiveram uma redução média de 8% na produção de clorofila, 78,95% na produção de tubérculos e 70,34% no peso fresco da parte aérea. Entretanto, o número de tubérculos por planta não foi alterado. Uma possível explicação para estes

resultados negativos poderia estar relacionada à evolução da produção de carboidratos. Entretanto, os resultados mostraram que não houve diferenças nos teores de sacarose e amido entre as plantas transgênicas e as não transformadas

Holmberg e colaboradores (1997) expressaram em tabaco o gene que codifica para uma hemoglobina bacteriana (*Vitreoscilla*) (VHb) e detectaram que as plantas transgênicas apresentaram aumentos de 30 a 40% no conteúdo de clorofila e incrementos de 80 a 100% no peso seco, quando comparadas com as plantas controle. Contrariamente aos dados obtidos por estes autores, neste trabalho foram observados efeitos deletérios nas plantas transgênicas de batata: diminuição em 8% no conteúdo de clorofila, redução de 70,34% no peso fresco da parte aérea e 78,95% na produção de tubérculos, quando comparadas as plantas transgênicas às plantas controle. Uma possível explicação para estes resultados discrepantes pode ser devido às constantes de dissociação (K_D) em relação ao oxigênio entre a Lb de soja e a VHb bacteriana. A constante de dissociação estabelece uma relação entre a taxa de associação (K_{on}) e a taxa de dissociação (K_{off}) entre uma proteína e seu substrato (Lenhinger et al., 1993). Na tabela 1, adaptada de Bülow e colaboradores (1999), são apresentados os valores das constantes de VHb e de Lb.

Comparando os valores da tabela 1, fica claro que a VHb têm uma constante de dissociação ao oxigênio 127 vezes maior que a Lba. Estes dados mostram que a Lba captura 1,5 vezes mais rápido oxigênio que a VHb, mas a VHb libera o oxigênio 1000 vezes mais rápido. Uma hipótese válida pode ser que o efeito positivo da VHb no crescimento do tabaco transformado é um resultado de alta velocidade de liberar o oxigênio, entanto que o efeito negativo da Lb no crescimento da batata transformada pode ser o resultado de uma maior capacidade de capturar oxigênio conjugada com uma baixa velocidade para liberá-lo.

Tabela 1. Cinética e constantes de equilíbrio para reações de hemoglobinas com oxigênio			
Proteína	K_{on} ($\mu\text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$)	K_{off} (S^{-1})	K_D (nM)
VHb	78	5600	6000
Lb	120	5,6	47
$K_D = K_{off} / K_{on}$			

Entretanto, os resultados deste trabalho são distintos dos observados por Barata et al. (2000) ao expressarem a Lb de soja no interior dos cloroplastos de tabaco. Neste trabalho, não foram observadas alterações nos conteúdos de clorofila total, clorofilas A e B, e teor de matéria seca. Uma possível explicação para estas diferenças seria uma interação diferencial entre espécies de planta e Lb.

5.4 - A expressão da Lb nos cloroplastos da batata afeta o número de nós e induz microtuberização espontânea em plântulas cultivadas *in vitro*

O número de nós por planta foi aumentado pela expressão da Lb em cloroplastos de plântulas de batata cultivadas *in vitro*. Este parâmetro tem sido usado para estudar o processo de desenvolvimento das plantas de batata (Charles & Rossignol, 1992). Em média, as plantas transgênicas produziram 47,85 % mais nós do que as plantas controle. Este resultado contrastaria com as observações feitas na casa de vegetação onde estes efeitos não foram observados. Porém, trata-se de dois contextos bastante diferentes o que poderia levar a interpretações equivocadas. Na verdade, vários são os fatores que podem interferir no número de nós por planta: fontes diferentes de nitrogênio, temperatura, e etc (Avila et al., 1994; Bensalim et al., 1998).

Um efeito muito claro da atividade da Lb nos cloroplastos da batata foi a indução espontânea da microtuberização, entendida como o desenvolvimento de microtubérculos em meios e condições não indutoras de tuberização *in vitro*. Nos cinco ciclos de micropropagação observados, 95 % das plantas transgênicas foram induzidas à

tuberização em meios MS normal. Em nenhum caso, foi observado o desenvolvimento de microtubérculos em plantas não transformadas. Pode-se especular que este seja o resultado de um efeito de posição ou de interações desconhecidas entre o vetor e o genoma da planta transformada. Entretanto, as linhagens transgênicas com as quais se realizou o trabalho foram estabelecidas a partir de transformantes independentes, tomados de regenerantes primários, desenvolvidos em diferentes calos. Trabalhar com vários transformantes independentes reduz a possibilidade de que um evento relacionado ao efeito de posição possa interferir na interpretação dos dados. Além disso, pesquisadores do CIP (Centro Internacional de la Papa) relataram que a microtuberização é observada em cerca de 5% dos clones de plantas transgênicas de batata quando submetidas à seleção com o antibiótico Kanamicina na primeira micropropagação. A microtuberização não foi mais observada quando o antibiótico foi retirado do meio de cultura (Dr. Marc Ghislain, comunicação pessoal). Entretanto, no presente trabalho, a característica foi mantida mesmo quando o antibiótico foi eliminado nas sucessivas gerações micropropagadas.

Xu e colaboradores (1998) demonstraram que o ácido giberélico (AG) é um regulador dominante na formação de tubérculos *in vitro*, o ácido abscísico (ABA) estimula a tuberização neutralizando GA, e a sacarose regula a formação de tubérculos influenciando os níveis de GA. GA exógeno promove a alongação do estolão e inibe a formação de tubérculos, porém baixos níveis de GA endógeno são requisitos necessários para a iniciação da formação e desenvolvimento dos tubérculos. Desta forma, pode-se especular que a Lb estaria afetando a biossíntese de GA, reduzindo o teor do hormônio e promovendo a tuberização. Para testar esta hipótese, seria necessário determinar o teor endógeno de GA nas plantas transgênicas e controle, antes da quarta semana, período no qual é visível o desenvolvimento dos microtubérculos.

5.5 - A expressão da Lb nos cloroplastos da batata afeta a resposta das plântulas ao estresse salino *in vitro*

O efeito do estresse salino nas plantas transgênicas foi bastante claro em termos fenotípicos. As folhas tornaram-se mais grossas, com maior tamanho, coriáceas, amareladas com o verso roxo, os caules grossos e descorados, e ausência ou fraco desenvolvimento de raízes. As plantas controle se mantiveram normais quando submetidas ao mesmo nível de estresse. As medições da altura das plantas transgênicas, mostraram diminuição de cerca de 60% quando comparadas com as plantas controle. Em relação ao peso fresco das plântulas, as linhagens transgênicas apresentaram aumento de 23,5% a 58,7% quando comparadas com a linhagem controle. Características associadas ao estresse salino em plantas já foram relatadas em plantas de batata inibição do crescimento, descoloração de folhas (Taiz & Zeiger, 1991). Este tipo de estresse produz mudanças nos padrões de síntese de proteínas, sugerindo uma alteração na expressão de vários genes (Hopkins, 1995). Alguns efeitos do estresse salino nas plantas superiores foram descritos recentemente, dentre os quais convém ressaltar: alterações na parede celular, declínio da fotossíntese, alterações no teor de potássio, aumento no nível de Na^+ , aumento da concentração de solutos orgânicos, etc (Zhu et al., 1997). É sabido que o ABA é produzido em resposta ao estresses salino (Leung et al., 1994) e que tratamentos prévios de células tolerantes a salinidade com ABA também induzem a síntese de novas proteínas e melhoram a habilidade para aclimatar-se ao NaCl. Embora tem-se correlacionado dados destas atividades celulares com a tolerância a salinidade, é muito difícil assegurar quais mudanças fisiológicas e metabólicas seriam requeridas para a tolerância a salinidade (Hopkins, 1995). Para provar se a susceptibilidade ao estresse salino nas plantas transgênicas é provocado por algum efeito da Lb na biossíntese de ABA, seria necessário detectar conteúdo endógeno do hormônio em plantas submetidas ao estresse.

5.6 - Alterações associadas à expressão da Lb nos cloroplastos da batata podem ser resultado de efeitos pleiotrópicos do transgene

As várias alterações nas plantas de batata associadas com a expressão da Lb nos cloroplastos, podem ser o resultado de alterações em diferentes níveis do metabolismo primário ou secundário, ou ainda uma combinação delas. Quando se menciona o metabolismo do oxigênio, trata-se de todas as reações nas quais o oxigênio intervém como substrato o como cofactor. São reações tão numerosas que muito provavelmente, atingem um grande número de eventos metabólicos, ocasionado efeitos fenotípicos variados. Além disso, a mudança de contexto da Lb, de uma atividade simbiote na soja para um ambiente não simbiote na batata, faz com que a proteína, muito provavelmente, atue como uma hemoglobina simbiote. Se isto for verdade, a Lb participaria na regulação do metabolismo molecular, como sensor ou transportador do oxigênio, no transporte de pequenas moléculas como CO₂ ou NO₂, reunindo-se a outras moléculas para intervir no transporte de ácidos graxos e na síntese de compostos orgânicos em condições anaeróbicas. De forma que os efeitos da atividade Lb na célula poderiam ser potencialmente muito amplos. Então, é possível sugerir que as alterações encontradas nas plantas transgênicas de batata sejam reflexos de efeitos pleiotrópicos da Lb no metabolismo celular.

6 - CONCLUSÕES

- Foram obtidas plantas transgênicas de batata que expressaram a leghemoglobina de soja nos cloroplastos. Foi verificado que a proteína estrangeira foi importada e corretamente processada no interior das organelas.
- A atividade das enzimas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo tais como catalase, glutathione redutase e superóxido dismutase, não foram alteradas nas plantas transgênicas, tanto em condições de casa de vegetação quanto em condições de estresse salino *in vitro*.
- A produção de folhas e caule e a produção de tubérculos foram reduzidas 70,34 % e 78,95% respectivamente, e a síntese de clorofila foi reduzida em 8%, em plantas transgênicas cultivadas em condições de casa de vegetação.
- O aumento de 48,75% no número de nós e a indução de microtuberização espontânea foram características detectadas em plântulas transgênicas cultivadas *in vitro*.
- Uma redução de 60% na altura e um aumento de 23,5% a 58,7% no peso fresco de plântulas transgênicas foram detectados em plântulas de batata submetidas a estresse salino *in vitro*. As plantas transgênicas foram mais susceptíveis ao estresse causado pelo NaCl.

- As diversas alterações observadas nas plantas transgênicas demonstram a ocorrência de efeitos pleiotrópicos do transgene agindo em diferentes níveis no metabolismo das plantas batata.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- ALSCHER, R.G.; DONAHUE, J. L.; CRAMER, C. L. Reactive oxygen species and antioxidants: relationship in green cells. **Physiologia Plantarum**, v. 100: 224-233.
- APPLEBY, C.A. Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. **Annual Review Plant Physiology**, v. 35, p. 443 - 478. 1984.
- APPLEBY, C.A.; BOGUZS V.; DENNIS, E.S.; PEACOCK, W.J. A role for hemoglobin in all plants roots?. **Plant, Cell and Environment**, v.11, p. 359-367. 1988.
- ARREDONDO-PETER, R. & ESCAMILLA, E. A consensus sequence of plant hemoglobins. **Plant Molecular Biology Report**, v.9, p. 195-207. 1991.
- ARREDONDO-PETER, R.; HARGROVE, M.S.; MORAN, J.F.; SARATH, G.; KLUCAS, R. Plant hemoglobins. **Plant Physiology**, v. 118, p. 1121-1125. 1998.
- AVILA A.V.; PEREYRA, S.M.; COLLINO, D.J.; ARGUELLO, J.A. Effect of nitrogen source on growth and morphogenesis of 3 micropropagated potato cultivars. **Potato Research**, v 37, p. 161-168. 1994.
- BARATA, R. M. Caracterização fisiológica e molecular de plantas transgênicas de tabaco expressando a leghemoglobina de soja no interior dos cloroplastos. Piracicaba, 1999. 116 p. Dissertação (M.S.) - Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

- BARATA R.; CHAPARRO-GIRALDO A.; CHABREGAS S.M.; GONZÁLES R.;
LABATE CA, AZEVEDO R, SARATH G, LEA PJ, SILVA-FILHO MC
Targeting of the soybean leghemoglobin to tobacco chloroplasts: effects on aerobic
metabolism in transgenic plants. **Plant Science** (accepted for publication). 2000
- BARTLETT, S. G.; GROSSMAN, A.R.; CHUA, N.H. *In vitro* synthesis and uptake of
cytoplasmic-synthesized chloroplast proteins. In: LEIDEMAN, M., HALICK,
R.B., CHUA, N.H. Edit., **Methods in chloroplast molecular biology**. Amsterdam:
Elsevier North-Holland Biomedical Press., P. 1081-1091, 1982.
- BEAUCHAMP, C. O. & FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and
an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**. 44, p. 276-287,
1971.
- BECANA, M. & KLUCAS, E. Oxidation and reduction of leghemoglobin in root
nodules of leguminosus plant. **Plant Physiology**, v. 98, p. 1217-1221. 1992.
- BECANA, M. & KLUCAS, E. Enzymatic and nonenzymatic mechanisms for ferric
leghemoglobin reduction in legume root nodules. **Proceedings of the National
Academy of Sciences of the USA**, v. 87, p. 7295-7299. 1990.
- BENSAMIN, S.; NOWAK, J.; ASIEDU, S.K. A plant growth promoting rhizobacterium
and temperature effects on performance of 18 clones of potato. **American Journal
of Potato Research**, v 75, p. 142-152. 1998.
- BOWLER, C.; VAN CAMP, W.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide
dismutase in plants. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 13, p. 199-218, 1994.

- BOWLER, C.; SLOOTEN, L.; VANDENBRADEN S.; DE RYCKE, R.; BOTTERMAN, J.; SYBESMA, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Manganese superoxide sintetase can reduced cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. **The EMBO Journal**, v. 10, p. 1723-1732, 1991.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantify of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRISSON, N. & VERMA D.P., Soybean leghemoglobin gene family: normal, pseudo and truncated genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** ,V.79, p. 4055-4059, 1982.
- BOUTRY, M.; NAGY, F.; POULSEN, C.; AOYAGI, K.; CHUA, N. H. Targeting of bacterial chloramphenicol acetyltransferase to mitochondria in transgenic plants. **Nature**, v. 328, p. 340-342, 1987.
- BUIATTI, M.; BOGANI, P. Physiological complexity and plant genetic manipulation. **Euphytica**, v.85, p. 135-147, 1995.
- BÜLOW, L.; HOLMBERG, N.; LILIUS, G.; BAILEY, J.E. The metabolic effects of native and transgenic hemoglobins on plants. **Trends in Biotechnology**, v. 17, p. 21-24, 1999.
- CHAPMAN S. C.; BARRETO, H. J. Using a chloropyll meter to estimate specific leaf nitrogen of tropical maize during vegetative growth. **Agronomy Journal**, v. 89, p. 557-562, 1997.

CHARLES, G.; ROSSIGNOL, M. Environmental effects on potato plants *in vitro*. **Journal of Plant Physiology**, v. 6, p. 708-713.1992.

CHAUMONT, F.; SILVA-FILHO, M. DE C.; THOMAS, D.; LETERME, S.; BOTRY, M. Truncated presequences of mitochondrial F₁-ATPase β -subunit from *Nicotiana glumbaginifolia* transport CAT and GUS proteins into mitochondria of transgenic tobacco. **Plant Molecular Biology**, v.24, p. 631-641, 1994.

CHILTON, M.D. *Agrobacterium* gene transfer: progress on a "poor man's vector" for maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 90, p. 3119-3120, 1993.

COMPTON, M. E. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 37, p. 217-242, 1994.

COUTURE, M.; CHAMBERLAND, H.; St-PIERRE, B.; LAFONTAINE, J.; GUERTIN, M. Nuclear genes encoding chloroplast hemoglobins in the unicellular green alga *Chlamydomonas eugametos*. **Molecular na general Genetics**, v. 243, p. 185-197. 1994.

CREISSEN, G.; FIRMIN, J.; FRYER, M.; KULAR, B.; LEYLAND, N.; REYNOLDS, H.; PASTORI, G.; WELLBURN, F; BAKER, N.; WELLBURN, A.; MULLINEAUX, P. Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress. **The Plant Cell**, v.11, p. 1277-1291, 1999.

DALE, P. J.; HAMPSON, K.K. An assessment of morphogenic and transformation efficiency in a range of varieties of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Euphytica** , v. 85, p. 101-108, 1995.

- DALTON, D. A.; POST, C. J.; LANGEBERG, L. Effects of ambient oxygen and of fixed nitrogen on concentrations of glutathione, ascorbate, and associated enzymes in soybean root nodules. **Plant Physiology**, v. 96: 812-818, 1991.
- DE BOER, A. D.; WEISBEEK, P. J. chloroplast protein topogenesis, import, sorting and assembly. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1071, p.221-253, 1991.
- DIPIERRO, S.; DE LEONARDIS, S. The ascorbate system and lipid peroxidation in stored potato (*Solanum tuberosum L.*) tubers. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, p. 779-783, 1997.
- DIKSHIT, R.P.; DIKSHIT, K.L.; LIU, Y.X.; WEBSTER D.A. The bacterial hemoglobin from *Vitreoscilla* can support the aerobic growth of *Escherichia coli* lacking terminal oxidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 293, p. 241-245, 1992.
- DYERICK, W.; PAGNIER, J.; POYART, C.; MARDEN, M.C. Human hemoglobin from transgenic tobacco. **Nature**, v. 386, p.29-30, 1997.
- EDWARDS, A.; RAWSTHORE, S.; MULLINEAUS, P. M. Subcellular distribution of multiple isoforms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum L.*). **Planta**, v.180, p. 278-284, 1990.
- EDWARDS, K.; JOHNSTONE, C.; THOMPSON, C. A. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 1349, 1991.
- FERNANDEZ, G. C. J. Residual Analysis and data transformations: important tools in statistical analysis. **HortScience**, v. 27, p. 297-300, 1992.

- FESTER, T.; SCHUSTER, W. Potato mitochondrial manganese superoxide dismutase is an RNA-binding protein. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 36, p. 67-75, 1995.
- FILGUEIRA, F. Práticas agronômicas. In: REIFSCHNEIDER, F. (Ed.) **Produção de Batata**. Brasília: Linha Gráfica Editora, 1987. Cap.4, p. 29-40.
- FOYER, C. H.; LOPEZ-DELGADO, H.; DAT, J. F.; SCOTT, I. M. Hydrogen peroxide- and glutathione- associated mechanisms of acclimatory stress and signalling. **Physiologia Plantarum**, v.100, p. 241-254, 1997.
- GIARDINA, B.; MESSANA, I.; SCATENA, R.; CATAGNOLA, M. The multiple functions of hemoglobin. **Critical Reviews Biochememistry and Molecular Biology**. 30, p. 165-196, 1995.
- GIBSON, Q. H.; WITTENBERG, J. B.; WITTEMBERG, B. A.; BOGUSZ, D.; APPLEBY, C. A. The kinetic of ligand binding to plant hemoglobins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p.100-107, 1989.
- GRIERSON, L. & COVEY, A. **Biología molecular de las plantas**. Acribia. Zaragoza (España), 1991. P.143-147.
- GOLDBERG, D.E. The enigmatic oxygen-avid hemoglobin of *Ascaris*. **BioEssays**. 17, p. 177-182, 1995.
- FLÜGLE, U. I.; HELDT, H. W. Metabolite translocators of the chloroplast envelope. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 129-144, 1991.

HOLMBERG, N.; LILIUS, G.; BAILEY, J.E.; BULOW, L. Transgenic tobacco expressing *Vitreoscilla* hemoglobin exhibits enhanced growth and altered metabolite production. **Nature Biotechnology**, v. 15, 244-247, 1997.

HOPKINS, G. W. **Introduction to Plant Physiology**. Toronto: John Wiley y Sons, 1995. P.436-438.

HUANG, J.; HACK, E.; THORNBURG, W.; MYERS, A. M. A yeast mitochondrial leader peptide functions *in vivo* as a dual targeting signal for both chloroplast and mitochondria. **Plant Cell**, v. 2, p. 1249-1260, 1990.

HURT, E. C.; SOLTANIFAR, N.; GOLDSMITH-CLERMONT, M.; ROCHAIX, J. D.; SCHATZ, G. The cleavable presequence of an imported chloroplast protein directs attached polypeptides into yeast mitochondria. **The EMBO Journal**, v. 5, p.1343-1350, 1986.

PFALLER, R.; PFANNER, N.; NEUPERT, W. Mitochondrial protein import: Bypass of proteinaceous surface receptors can occur with low specificity and efficiency. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 34-39, 1989.

KAVANAGH, T. A.; JEFFERSON, R. A.; BEVAN, M. W. Targeting a foreign protein to chloroplast using fusions to the transit peptide of a chlorophyll a/b binding. **Molecular and General Genetics**, v. 215, p. 38-45, 1988.

INZÉ, D. & VAN MONTAGU, M. Oxidative stress in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, p. 153-158, 1994.

Jl, L.; BECANA, M.; SARATH, G.; KLUCAS, R. V. Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding ferric leghemoglobin reductase from soybean nodules. **Plant Physiology**, v. 104, p. 453-459, 1994.

- JONES, M. G. K.; OUTLAW, W. H.; LOWRY, O. H. Procedure for the assay of sucrose in range 10^{-7} - 10^{-14} moles. **Plant Physiology**, v. 60, p. 379-383, 1977.
- JOSHI, M. & DIKSHIT K.L. O₂ dependent regulation of *Vitreoscilla* globin genes: evidence for positive regulation by FNR. **Biochem Biophys Res Commun.** 202, p. 535-542, 1994.
- KRAUS, T.E.; McKERSIE, B.D.; FLETCHER, R.A. Paclobutrazol-induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. **J Plant Physiol.** 145, p. 570-576, 1995.
- LABATE, C. A.; LEEGOOD, R. Influence of low temperature on respiration and content of phosphorylated intermediates in darkened barley leaves. **Plant Physiology**, v. 91, p. 905-910, 1989.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature.** 227, p. 680-685, 1970.
- LEHNINGER, A.; NELSON, C.; COX, M. **Principles of Biochemistry.** New York: Worth Publisher, Inc. 1993 p. 228-229.
- LEUNG, J.; BOUVIER-DURAND, M.; MORRIS, P. C.; GUERRIER, D.; CHEFDOR, F., GIRAUDAT, J. Arabidopsis ABA response gene *ABI1*: Features of a calcium-modulated protein phosphatase. **Science**, v. 264, p. 1448-1452, 1994.
- LOWRY, O. & PASSONEAU, J.V. **A flexible system of enzymatic analysis.** Academic press. New York, 1972.
- NIEBEL, A.; HEUNGENS, K.; BARTHEL, N.; INZÉ, D.; VAN MONTAGU, M.; GHEYSEN, G. Characterization of a pathogen-induced potato catalase and its

systemic expression upon nematode and bacterial infection. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.8, p. 371-378, 1995.

MACHACKOVA, I.; SEGEEVA, L.; ONDREJ M.; ZALYSMAN, O.; KONSTANTINOVA, T.; EDER, J.; OVESNA, J.; GOLYANOSVKAYA, S.; RAKITIN, Y.; AKSENOVA, N. Growth pattern, tuber formation and hormonal balance *in vitro* potato plants carrying *ipt* gene. **Plant Growth Regulation**, v. 21, p. 27-36. 1997.

McBRIDE, K. & SUMMERFELT, D. Improved binary vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. **Plant Molecular Biology**, v. 14, p. 269-276, 1990.

McKERSIE B. D.; CHEN, Y.; DE BEUS, M.; BOWLEY, S. R.; BWLER, C. Superoxido dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Plant Physiology**, v. 103, p. 1155-1163, 1993.

MIZUNO, M.; KAMEI, M.; TSUCHIDA, H. Ascorbate peroxidase and catalase cooperate for protection against hydrogen peroxide generate in potato tubers during low-temperature storage. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 44 , p. 717-726, 1998.

MEMELINK, J.; SWORDS, K.; STAEHELIN, L.A.; HOGE, J. H. Southern, Northern and Western blot analysis. In: GELVIN, S. B. & SCHILPEROORT, R. T. Edit., **Plant Molecular Biology Manual**. Kluwer academic publishers. Londres, 1994, p. F1: 1-3.

MOHAN KUMAR, G. N.; KNOWLES, R. Oxidative stress result in increased sinks of metabolic energy during aging and sprouting of potato seed-tubers. **Plant Physiology**, v. 112, p. 1301-1313, 1996.

- MONK, L. S.; DAVIES, H. V. antioxidant status of the potato tuber and Ca^{2+} deficiency as a physiological stress. **Physiologia Plantarum**, v.75, p. 411-416, 1989.
- PERL, A.; AVIV, D.; GALUN, E. Ethylene and *in vitro* culture of potato: suppression of ethylene generation vastly improves protoplast yield, plating efficiency and transient expression of a alien gene. **Plant Cell Reports**, v. 7, p. 403-406. 1988.
- PERL, A., PERL-TREVES, R., GALILI, S., AVIV D., HALGI, E., GALUN, E. Enhanced oxidative-stress defense in transgenic potato expressing tomato Cu,Zn superoxido dismutases. **Theoretical and Applied Genetics**, V. 85, p. 568-576, 1993.
- PILON, M.; DE KRUIJFF, B.; WEISBEEK, P. New insights into the import mechanism of ferredoxin precursor into chloroplast. **The Journal Biological Chemistry**, v. 267, p. 2548-2556, 1992.
- PITCHER, R.; REPETTI, P.; ZILINSKAS, B. A. Overproduction of ascorbate peroxidase protects transgenic tobacco plants against oxidative stress (abstract no 623). **Plant Physiology**, v. 105, p. s-169, 1994.
- PREISS, J.; LEVI, C. Starch biosynthesis and degradation. In: HATCH, M. D. & BOARDMAN, N. R. (Ed.) **The Biochemistry of Plants**. London: Academic Press, v. 3, p.371-423, 1980.
- PUPPO, A.; DIMITRIJEVIC, L.; RIGAUD, J.. Possible involment of nodule superoxide dismutase and catalase in leghemoglobin protection. **Planta**. 156, p. 374-379, 1982.
- PUPPO, A.; HALLIWELL, B. Generation of hidroxyl radicals by soybean nodule leghaemoglobin. **Planta** 173: 405-410, 1988.

- SALIN, M. L.; Toxic oxygen species and protective system of the chloroplast. **Physiologia Plantarum**, v.72, p. 681-689, 1987.
- SHARKEY, T. D.; STITT, M.; HEINEKE, D.; GERHARDT, R.; RASCHKE, K.; HELDT, H. M. Limitation of photosynthesis by carbon metabolism. O₂- insensitive CO₂ uptake results from limitation of triose phosphate utilization. **Plant Physiology**, v.81, p.1123-1129, 1986.
- SILVA-FILHO, M. C.; CHAUMONT, F.; LETERME, S.; BOUTRY, M. Mitochondria and chloroplast targeting sequences in tandem modify protein import specificity in plant organelles. **Plant Molecular Biology**, v.30, p.769-780, 1996.
- SILVA-FILHO, M. C.; WIEËRS, M. C.; FLÜGGE, U. I.; CHAUMONT, F.; BOUTRY, M. Different *in vitro* and *in vivo* targeting properties of the transit peptide of a chloroplast envelope inner membrane protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 15264-15269, 1997.
- SILVA-FILHO, M. C. Translocation of a reporter protein into mitochondria is mediated by a chloroplast transit peptide and follows a normal import route. **Journal of Plant Physiology**, v. 154, p. 51-54, 1999.
- SMITH, C. J. Carbohydrate chemistry. In: LEA, P. J.; LEEGOOD, R.C. (Ed.) **Plant Biochemistry and Molecular Biology**. New York: John Wiley & Sons Ltd. Cap.4, p.74-111, 1995.
- SMITH, I. K.; VIERHELLER, T. L.; THORNE, C.A. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5' -dithiobis(2-nitrobenzoic acid). **Analytical Biochemistry**, v. 175, p.408-413, 1988.

- STITT, M.; SONNEWALD, U. Regulation of the metabolism in transgenic plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 46, p. 341-368, 1995.
- SLIGHTOM, J.L.; DRONG, R.F.; CHEE, P.P. Polimerase chain reaction: gene detection, inverse PCR and genetic engineering. In: GELVIN, S. B. & SCHILPEROORT, R. T. Edit., **Plant Molecular Biology Manual**. Kluwer academic publishers. Londres, 1994, p. F4: 1-24.
- SUTTLE, J.C. Involvement of ethylene in potato microtuber dormancy. **Plant Physiology**, v. 118, p. 843-848. 1998.
- TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. New York: The Benjamin / Cumming Publishing Company, Inc. 1991, p. 362-365.
- TROLINDER, N. L.; ALLEN, R. D. Expression of chloroplast localized MnSOD in transgenic cotton. **Journal Cell Biochemistry**, v. 18 A, p. 97, 1994.
- VAN CAMP, W.; BOWLER, C.; VILLARROEL, R.; TSANG, E.W.T.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Characterization of iron superoxide dismutase cDNAs from plants obtained by genetic complementation in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 87, p. 9903-9907, 1990.

- VAN CAMP, W.; WILLEKENS, H.; BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Elevated levels of superoxide dismutase protect transgenic plants against ozone damage. **Bio/Technology**, v. 12, p.165-168, 1994.
- VAN DER MESCHT, A.; DE RONDE, J. A.; ROSSOUW, F. T. Cu/Zn superoxido dismutase, glutathione reductase and ascorbate peroxidase levels during drought stress in potato. **South African Journal of Science**, v. 94, p. 496-499, 1998.
- VERNON, L. P. Spectrophotometric determination of chorophylls and pheophitins in plant extracts. **Analytical Chemistry**, v. 32, p. 1144-1150, 1960.
- WILLEKENS, H.; CHAMNONGPOL, S.; DAVEY, M.; SCHRAUDNER, M.; LANGEBARTELS, C. VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; VAN CAMP, W. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable, for stress defence in C₃ plants. **The EMBO Journal**, v.16, p. 4806-4816, 1997.
- WOODBURY, W.; SPENCER, A.K.; STAHMANN, M.A. Na improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isosymes. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p. 301-305. 1971.
- XU, X.; VAN LAMMEREN, A.M.; VERMEER, E.; VREUGDENHIL, D. The role of gibberellin, abscisic acid, and sucrose in the regulation of potato tuber formation in vitro. **Plant Physiology**, v.118, p. 575-584, 1998.
- ZUPAN, J.; ZAMBRISKY, P. The *Agrobacterium* DNA transfer complex. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 16, p. 279-295, 1997.
- ZHU, J.P., HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R. A. Molecular aspects of osmotic stress in plants. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 16, p.253-277, 1977.

ANEXOS

Anexo 1 . ANAVA e Teste de Duncan em dados transformados (log) . Atividade CAT em linhagens transgênicas (b1, b2, b3) e controle (wt) após 40 dias de transferência para a casa de vegetação. Delineamento inteiramente casualizado, 6 repetições por genótipo.

Fonte de variação	G. L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr > F
Modelo	3	0,08446	0,02815	2,40	0,938 ^{NS}
Erro	23	0,26969	0,01172		
Total	26	0,35416			
Coeficiente de Variação 5,09 % ^{NS} Não há diferenças significativas					

Teste de Duncan				
	<hr style="width: 80%; margin: auto;"/>			
Médias	2,2271	2,12522	2,10711	2,06523
Genótipos	b2	b3	wt	b1
		a		
Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes, medias com distintas letras são significativamente diferentes				

Anexo 2. ANAVA e Teste de Duncan em dados transformados ($1 / \text{Raiz}Y$) . Atividade GR em linhagen transgênicas (b1, b2, b3) e controle (wt) após 40 dias de transferência para a casa de vegetação. Delineamento inteiramente casualizado, 6 repetições por genótipo.

Fonte de variação	G. L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr > F
Modelo	3	0,02920	0,00973	1,55	0,2409 ^{NS}
Erro	23	0,10065	0,00529		
Total	26	0,12985			
Coeficiente de Variação 16,86 % ^{NS} Não há diferenças significativas					

Teste de Duncan				
	a			
Médias	0,53609	0,45319	0,44821	0,44324
Genótipos	wt	b1	b3	b2
Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes, médias com distintas letras são significativamente diferentes.				

Anexo 3. ANAVA e Teste de Duncan. Teor de clorofila em linhagens transgênicas (b1, b2, b3) e controle (wt) após 40 dias de transferência para a casa de vegetação. Delineamento inteiramente casualizado, 12 repetições por genótipo.

Fonte de variação	G. L.	S.C.	Q.M.	F	Pr > F
Modelo	3	111,69166	37,23055	4,43	0,0083 ***
Erro	44	369,90833	8,40700		
Total	49	481,60000			
Coeficiente de Variação 6,62 % *** Diferenças altamente significativas					

Teste de Duncan				
	a	b		
Médias	46,39167	42,90000	42,88333	42,82500
Genótipos	wt	b1	b3	b2
Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes, médias com distintas letras são significativamente diferentes				

Anexo 4. ANAVA e Teste de Duncan. Peso fresco da parte aérea (gramas) por planta em linhagens (b1,b2,b3) e controle (wt) após 80 dias de transferência para a casa de vegetação. Delineamento inteiramente casualizado, 11 repetições por genótipo.

Fonte de variação	G. L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr > F
Modelo	3	202319,524	67439,841	118,22	0,0001 ***
Erro	40	22818,330	570,458		
Total	43	225137,855			
Coeficiente de Variação 6,62 % *** Diferenças altamente significativas					

Teste de Duncan				
	<hr style="width: 100px; margin: 0 auto;"/> a		<hr style="width: 300px; margin: 0 auto;"/> b	
Médias	221,041	75,047	68,826	52,821
Genótipos	wt	b1	b3	b2
Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes, médias com distintas letras são significativamente diferentes.				

Anexo 5. ANAVA e Teste de Duncan. Número de tubérculos por planta em linhagens transgênicas (b1, b2, b3) e controle (wt) após 80 dias de transferência para a casa de vegetação. Delineamento inteiramente casualizado, 10 repetições por genótipo.

Fonte de variação	G. L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr > F
Modelo	3	60,67500	20,22500	0,960	0,4225 ^{NS}
Erro	36	759,10000	21,08610		
Total	39	819,77500			
Coeficiente de Variação 31,83 % ^{NS} Não há diferenças significativas					

Teste de Duncan				
	—————			
			a	
Médias	15,50	15,50	14,20	12,50
Genótipos	wt	b1	b3	b2
Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes, médias com distintas letras são significativamente diferentes				

Anexo 6. ANAVA e Teste de Duncan. Peso de tubérculos (gramas) por planta em linhagens transgênicas (b1,b2,b3) e controle (wt) após 80 dias de transferência para a casa de vegetação. Delineamento inteiramente casualizado, 10 repetições por genótipo.

Fonte de variação	G. L.	S.Q	Q.M.	F	Pr > F
Modelo	3	155535,070	51845,023	224,55	0,0001 ***
Erro	36	8311,901	230,886		
Total	39	163846,972			
Coeficiente de Variação 20,49 % *** Diferenças altamente significativas					

Teste de Duncan				
	a	b		
Médias	181,795	45,858	37,032	31,850
Genótipos	wt	b1	b3	b2
Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes, médias com distintas letras são significativamente diferentes				

Anexo 7. ANAVA e Teste de Duncan em dados transformados [Raiz (y)] . Teor de sacarose no período da manhã em linhagens transgênicas (b1, b2, b3) e controle (wt) após 40 dias de transferência para a casa de vegetação. Delineamento inteiramente casualizado,

Fonte de variação	G. L.	S.Q	Q.M.	F	Pr > F
Modelo	3	3106,318	1035,439	2,54	0,1060 *
Erro	12	4901,357	408,446		
Total	15	8007,676			
Coeficiente de Variação 28,98 % * Diferenças significativas					

Teste de Duncan				
		—————		
		—————		b
		a		
Médias	88,19	72,19	69,51	49,00
Genótipos	b1	wt	b2	b3
Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes, médias com distintas letras são significativamente diferentes.				

Anexo 8. ANAVA e Teste de Duncan . Teor de sacarose no período da tarde em linhagens transgênicas (b1, b2, b3) e controle (wt) após 40 dias de transferência para a casa de vegetação. Delineamento inteiramente casualizado, 6 repetições por genótipo.

Fonte de variação	G. L.	S.Q	Q.M.	F	Pr > F
Modelo	3	75559200,88	25186400,29	1,50	0,265 ^{NS}
Erro	12	202041474,96	16836789,58		
Total	15	277600575,84			
Coeficiente de Variação 40,31 % ^{NS} Não há diferenças significativas					

Teste de Duncan				
				
	a			
Médias	12407	11239	10452	5211
Genótipos	b1	wt	b2	b3
Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes, médias com distintas letras são significativamente diferentes				

Anexo 9. ANAVA e Teste de Duncan em dados transformados [1 / Raiz (y)] . Teor de amido no período da manhã em linhagens transgênicas (b1, b2, b3) e controle (wt) após 40 dias de transferência a casa de vegetação. Delineamento inteiramente casualizado, 6 repetições por genótipo

Fonte de variação	G. L.	S.Q	Q.M.	F	Pr > F
Modelo	3	0,0004609	0,0001536	3,28	0,058 *
Erro	12	0,0005613	0,0000467		
Total	15	0,0010223			
Coeficiente de Variação 20,31 % * Diferenças significativas					

Teste de Duncan				
		—————		
		—————		
		a	b	
Médias	0,042049	0,034667	0,029254	0,028713
Genótipos	b1	wt	b2	b3
Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes, médias com distintas letras são significativamente diferentes.				

Anexo 10. ANAVA e Teste de Duncan. Teor de amido no período da tarde em linhagens transgênicas (b1,b2,b3) e controle (wt) após 40 dias de transferência para a casa de vegetação. Delineamento inteiramente casualizado, 6 repetições por genótipo.

Fonte de variação	G. L.	S.Q	Q.M.	F	Pr > F
Modelo	3	51083366,86	127027788,95	1,44	0,2804 ^{NS}
Erro	12	142078381,75	11839865,14		
Total	15	193161748,62			
Coeficiente de Variação 22,39 % ^{NS} Não há diferenças significativas					

Teste de Duncan				
				
Médias	17977	16056	13723	13699
Genótipos	b1	wt	b2	b3
Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes, médias com distintas letras são significativamente diferentes.				

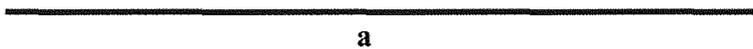
Anexo 11 . ANAVA e Teste de Duncan em dados transformados [Raiz (y)] . Número de nós em linhas transgênicas (b1,b2,b3) e controle (wt) após três semanas de cultura *in vitro*. Delineamento inteiramente casualizado, 9 repetições por genótipo.

Fonte de variação	G. L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr > F
Modelo	3	2,754178	0,918059	73,87	0,0001 ***
Erro	32	0,397712	0,012428		
Total	35	3,151891			
Coeficiente de Variação 20,31 % *** Diferenças altamente significativas					

Teste de Duncan				
	a			b
Médias	3,6346	3,58738	3,57350	2,96187
Genótipos	b3	b1	b2	wt
Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes, médias com distintas letras são significativamente diferentes.				

Anexo 12 . ANAVA e Teste de Duncan em dados transformados [1 / Raiz (y)]. Atividade CAT em plantas submetidas a estresse salino em linhagens transgênicas (b1, b2, b3) e controle (wt) após três semanas de cultura *in vitro*. Delineamento inteiramente casualizado, 7 repetições por genótipo.

Fonte de variação	G. L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr > F
Modelo	3	0,00125201	0,00041734	0,78	0,5157 ^{NS}
Erro	24	0,01281138	0,00053381		
Total	27	0,01405338			
Coeficiente de Variação 18,64 % ^{NS} Não há diferenças significativas					

Teste de Duncan				
				
Médias	0,13516	0,12217	0,12088	0,11757
Genótipos	b1	b3	b2	wt
Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes, médias com distintas letras são significativamente diferentes.				

Anexo 13 . ANAVA e Teste de Duncan. Atividade GR em plantas submetidas a estresse salino em linhagens transgênicas (b1, b2, b3) e controle (wt) após três semanas de cultura *in vitro*. Delineamento inteiramente casualizado, 6 repetições por genótipo.

Fonte de variação	G. L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr > F
Modelo	3	3,09380713	1,03125904	0,83	0,4925 ^{NS}
Erro	20	24,82522023	1,24126101		
Total	23	27,91902736			
Coeficiente de Variação 51,21 % ^{NS} Não há diferenças significativas					

Teste de Duncan				
Médias	2,6560	2,3617	1,9578	1,7253
Genótipos	b1	b2	b3	wt
Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes, médias com distintas letras são significativamente diferentes.				

Anexo 14. ANAVA e Teste de Duncan. Peso fresco de plântulas submetidas a estresse salino em linhas transgênicas (b1, b2, b3) e controle (wt) após três semanas de cultura *in vitro*. Delineamento inteiramente casualizado, 10 repetições por genótipo.

Fonte de variação	G. L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr > F
Modelo	3	10405,5010	348,5000	4,25	0,0113 **
Erro	36	29347,1180	815,1970		
Total	39	39752,6190			
Coeficiente de Variação 51,21 % ** Diferenças significativas					

Teste de Duncan				
	a			b
Médias	112,60	87,90	87,39	67,09
Genótipos	b3	b2	b1	wt
Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes, médias com distintas letras são significativamente diferentes.				

Anexo 15. ANAVA e Teste de Duncan. Altura de plântulas submetidas a estresse salino em linhagens transgênicas (b1,b2,b3) e controle (wt) após três semanas de cultura *in vitro*. Delineamento inteiramente casualizado, 10 repetições por genótipo.

Fonte de variação	G. L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr > F
Modelo	3	54,06275	18,02091	30.08	0,0001 ***
Erro	36	21,56700	0,59908		
Total	39	75,62975			
Coeficiente de Variação 30,99 % *** Diferenças altamente significativas					

Teste de Duncan				
	————— a			————— b
Médias	4,5100	1,8800	1,8300	1,7700
Genótipos	b3	b2	b1	wt
Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes, médias com distintas letras são significativamente diferentes.				