

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PPG EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

Rafael Fonseca Benevenuto

**ANÁLISES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS DO MILHO
TRANSGÊNICO TOLERANTE AO Roundup Ready® (EVENTO NK603)
SUBMETIDO AO DÉFICIT HÍDRICO E APLICAÇÃO DE HERBICIDA**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do
Grau de Mestre em Ciências
(Recursos Genéticos Vegetais).
Orientador: Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari

FLORIANÓPOLIS – SC

2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Benevenuto, Rafael Fonseca
ANÁLISES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS DO MILHO TRANSGÊNICO
TOLERANTE AO Roundup Ready® (EVENTO NK603) SUBMETIDO AO
DÉFICIT HÍDRICO E APLICAÇÃO DE HERBICIDA / Rafael Fonseca
Benevenuto ; orientador, Rubens Onofre Nodari -
Florianópolis, SC, 2015.
114 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. plantas
transgênicas. 3. fisiologia vegetal. 4. estresse hídrico.
5. herbicida. I. Nodari, Rubens Onofre. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço e dedico este trabalho primeiramente a Deus, pelo cuidado em todos os momentos e pelas infinitas oportunidades concedidas.

Agradeço as minhas maiores fontes de inspiração, meus pais Ricardo e Rosângela. Obrigado pelo amor incondicional, incentivo e apoio em todos os momentos. Esta conquista certamente também é de vocês!

Agradeço aos meus irmãos, Ricardo e Gabriella pelo amor puro, pela amizade e pela parceria.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Catarina, pelo ensino gratuito e de qualidade durante toda minha formação até aqui.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa de estudos concedida durante boa parte do mestrado.

Agradeço ao Center for Biosafety – GenØk pelo apoio financeiro primordial para a execução deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Rubens O. Nodari pela orientação e confiança concedida, também pela oportunidade de intercâmbio na África do Sul.

Agradeço aos amigos Vinicius Vilperte e Sarah Zanon Agapito Tenfen pela parceria e pelas ricas contribuições desde o início deste projeto.

Agradeço a North-West University Campus Potchefstroom – South Africa, ao Prof. Johnnie Van den Berg, ao Prof. Carlos Bezuidenhout, e a todos os colegas e amigos que conheci neste lugar tão especial. Baie dankie!

Agradeço aos companheiros de trabalho do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal – LFDGV/UFSC – pelo apoio nos momentos difíceis, e pelos momentos de descontração e amizade.

Por fim, não poderia deixar de agradecer a galera do “Qual vai?”, meus amigos de infância, irmãos que escolhi. Vocês sabem o quanto foram importantes desde o início de tudo, muito obrigado pela amizade fiel e torcida de sempre!

Dedico este trabalho à Deus e a minha família.

RESUMO

Uma importante questão ainda muito polêmica no mundo está relacionada com os riscos da liberação comercial de organismos geneticamente modificados (OGM), particularmente o impacto ambiental que as plantas geneticamente modificadas podem gerar. Este trabalho tem como objetivo geral investigar as possíveis alterações bioquímicas e dos produtos da expressão gênica de uma variedade comercial de milho transgênico tolerante ao Roundup Ready® (evento NK603), submetida a condições de déficit hídrico e aplicação de herbicida. O primeiro ensaio realizado, denominado Ensaio sem herbicida, foi um ensaio em blocos ao acaso com distribuição trifatorial (Transgenia x Estresse x Ambiente). Este ensaio foi realizado em casa de vegetação (cv) e câmara de crescimento (cc) (fator Ambiente), composto por híbridos transgênicos (T) e sua isolinha convencional (C) (fator Transgenia), submetidos a rega controle (CONT) ou seca (SECA) (fator Estresse). O segundo ensaio, denominado Ensaio com herbicida, foi um ensaio em blocos ao acaso unifatorial, o qual foi formado também por três blocos, sendo cada unidade experimental composta por um grupo de três vasos (uma planta por vaso), com dois tratamentos: Milho Transgênico submetido a seca com aplicação de herbicida (TSECA RR); Milho Transgênico submetido a seca sem aplicação de herbicida (TSECA). A análise proteômica comparativa DIGE demonstrou diferença na expressão de proteínas entre as plantas de milho transgênicas (NK603) e sua isolinha convencional mais próxima (31 *spots*). O fato de terem sido detectadas proteínas diferencialmente expressas entre os tratamentos CCONT x TCONT (17 *spots*) e CSECA x TSECA (14 *spots*), leva a conclusão de que estas plantas não diferem entre si apenas pela expressão da proteína alvo da transformação genética (CP4 EPSPS) conforme proposto pela empresa proponente desta tecnologia e assim levado em consideração pelas agências regulatórias. Além disso, apesar do nível de variação causada pela modificação genética não se diferir do nível da variação causada pelo ambiente (em termos de número total de proteínas diferenciais), as plantas transgênicas respondem diferencialmente com relação a sua linha isogênica quando cultivadas no mesmo ambiente, o que apoia a ideia da existência de efeitos pleiotrópicos oriundo da inserção da sequência exógena para o evento NK603. A análise comparativa do proteoma no segundo ensaio ainda revelou que a aplicação de herbicida nas plantas transgênicas em situação de estresse por desidratação resulta no aumento da expressão de algumas proteínas e até no provável silenciamento de um ou mais genes responsável pela transcrição de uma proteína. As análises de quantificação de alguns dos principais fitormônios envolvidos nos mecanismos de defesa a estresse pelas plantas, revelou que a concentração de ABA, MeJA, SA, CA e GA₃ foi diferente entre as plantas transformadas e não-transformadas, bem como as interações foram significativas entre os fatores "Estresse" e "Ambiente". Verificou-se também que a situação de estresse e o cultivo em diferentes ambientes resultaram na variação no conteúdo de todos os fitormônios analisados. Com relação a análise quantitativa de lignina, a transformação genética também provocou alterações no teor de LTGA, pois assim como encontrado por outros autores em diferentes eventos de transformação, as plantas transformadas (NK603) apresentaram teores de lignina superior aos das plantas não transformadas. Além disso, a análise de lignina nos tratamentos do segundo

ensaio revelou que a aplicação de herbicida em plantas transgênicas em situação de déficit hídrico provocou ainda mais o aumento no teor de lignina. O tratamento TSECA RR apresentou em média um aumento de 33% na concentração de LTGA em comparação ao tratamento TSECA. Portanto, os resultados encontrados neste trabalho concordam com resultados de outros estudos sobre a existência de efeitos pleiotrópicos relacionados a expressão proteica, aumento nos teores de fitormônios e lignina em plantas geneticamente modificadas (evento NK603), submetidas a diferentes condições de cultivo.

Palavras-chave: proteômica; fitormônios; lignina; plantas transgênicas; organismos geneticamente modificados; evento NK603; estresse abiótico; aplicação de herbicida; efeitos pleiotrópicos.

ABSTRACT

A worldwide important issue still very controversial is related to the risks of commercial release of genetically modified organisms (GMO), particularly the environmental impact that genetically modified (GM) plants can generate. This study aims to investigate possible biochemical changes of a commercial hybrid of GM maize (event NK603) and its counterpart, subjected to drought stress conditions and herbicide application. The first experiment, called experiment without herbicide, was a factorial experiment being the plots arranged in a three randomized block design (Transgenic x Stress x Environment). This experiment was conducted in a greenhouse (cv) and growth chamber (cc) (Environment factor), composed of transgenic hybrid (T) and its conventional isogenic line (C) (Transgenic factor), subject to water control (CONT) or drought stress conditions (SECA) (Stress factor). The second experiment, called Experiment with herbicide application, was an experiment in a randomized block design, with three repetitions. In that case each experimental unit was composed of a group of three pots (one plant per pot) with two treatments: GM maize submitted to drought stress and herbicide application (TSECA RR); GM maize subjected to drought stress without herbicide application (TSECA). The comparative proteomic DIGE showed difference in protein expression between transgenic maize (NK603) and its conventional isolate (31 spots). The fact that differentially expressed proteins detected between CCONT x TCONT treatments (17 spots) and CSECA x TSECA (14 spots), leads to the conclusion that these plants do not differ only by the expression of the target gene transformation (CP4 EPSPS) as proposed by the proponent of the technology. Furthermore, although the level of variation caused by genetic modification does not differ from the level of variation caused by the environment (in terms of total number of differential proteins), transgenic plants respond differentially in respect to their isogenic line when grown in the same environment, which supports the idea of pleiotropic effects from the genetic transformation for the NK603 event. The comparative analysis of the proteome in the second experiment also showed that herbicide application in transgenic plants under drought stress results in increased expression of some proteins and in a probable silencing of one or more genes responsible for the transcription of a protein. Quantification analyzes of some of the major plant hormones involved in defense mechanisms to stress in plants, showed that the concentration of ABA, MeJA, SA, CA and GA3 were different between the GM plants and non-GM, as well as interactions between "Stress" and "Environment" were significant. It was also verified that the stress situation and cultivation in different environments resulted in variation in the content of all plant hormones analyzed. Regarding the quantitative analysis of lignin, the genetic transformation also changed lignin content. Similarly to other studies done in different events of genetic transformation, the GM NK603 plants presented higher lignin content than the non-GM plants. In addition, the lignin analysis in the second experiment revealed that the herbicide application in transgenic plants under drought stress situation causes increase in lignin content. The TSECA RR treatment showed 33% increase in the concentration of LTGA compared to TSECA treatment. Therefore, the findings of this study agree with the results found by other studies about the presence of pleiotropic effects related to protein expression, plant hormones synthesis and lignin content in plants of the event NK603, under different growing conditions.

Keywords: proteomics; plant hormones; lignin; transgenic plants; genetically modified organisms; NK603 event; abiotic stress; herbicide; pleiotropic effects.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Inseto do evento NK603 contendo os dois cassetes de expressão da proteína CP4 EPSPS e suas sequências reguladoras (Fonte: GMDD, 2012).....	30
Figura 2: Monitoramento de seca nos Estados Unidos em agosto de 2012 (U.S. Drought Monitor, 2012).....	37
Figura 3: Médias semanais de temperaturas máxima, média e mínima, no período de condução do experimento, no ano de 2012 – Florianópolis (SC).....	44
Figura 4: Ambiente casa de vegetação (cv) do Ensaio sem herbicida conduzido nas dependências do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis, SC.....	45
Figura 5: Ambiente câmara de crescimento (cc) do Ensaio sem herbicida conduzido nas dependências do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis, SC.....	47
Figura 6: Ensaio com aplicação de herbicida conduzido em casa de vegetação (cv) nas dependências do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis, SC.....	49
Figura 7: Fitas com o resultado do teste de imunodeteção para a proteína transgênica CP4 EPSPS evento NK603.....	58

Figura 8: Imagem ampliada do *spot* ID 258 (abaixo), de expressão diferencial decrescente entre os tratamentos T, TS e TSRR, e sua visualização 3D.....70

Figura 9: Conteúdo de ABA em pg/gr de Massa Seca (pg/gr de MS) para os tratamentos que compõem o primeiro ensaio (Ensaio sem herbicida).....74

Figura 10: Conteúdo de MeJA em pg/gr de Massa Seca (pg/gr de MS) para a interação entre os fatores Transgenia e Ambiente do primeiro ensaio (Ensaio sem herbicida).....80

Figura 11: Conteúdo de MeJA em pg/gr de Massa Seca (pg/gr de MS) para a interação entre os fatores Estresse e Ambiente do primeiro ensaio (Ensaio sem herbicida).....80

Figura 12: Conteúdo de SA em pg/gr de Massa Seca (pg/gr de MS) para a interação entre os fatores Transgenia e Ambiente do primeiro ensaio (Ensaio sem herbicida).....83

Figura 13: Conteúdo de SA em pg/gr de Massa Seca (pg/gr de MS) para a interação entre os fatores Estresse e Ambiente do primeiro ensaio (Ensaio sem herbicida).....84

Figura 14: Conteúdo de CA em pg/gr de Massa Seca (pg/gr de MS) para a interação entre os fatores Transgenia e Ambiente do primeiro ensaio (Ensaio sem herbicida).....86

Figura 15: Conteúdo de GA3 em pg/gr de Massa Seca (pg/gr de MS) para a interação entre os fatores Transgenia e Ambiente do primeiro ensaio (Ensaio sem herbicida).....89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados para otimização do monitoramento de múltiplas reações para cada composto analisado em HPLC-ESI-MS/MS.....	55
Tabela 2: Concentração média de proteínas totais em folhas do milho transgênico (DKB 245 RR) e sua isolinha convencional (DKB 245) sob diferentes condições de cultivo.....	60
Tabela 3: Número médio de <i>spots</i> detectados em géis 2D-DIGE do milho transgênico (DKB 245 RR) e sua isolinha convencional (DKB 245) sob diferentes condições de cultivo.....	61
Tabela 4: Número de <i>spots</i> detectados como diferencialmente expressos entre os tratamentos que compõem o ensaio Ensaio sem herbicida.....	66
Tabela 5: Número de <i>spots</i> detectados como diferencialmente expressos entre os tratamentos implantados nos diferentes ambientes que compõem o ensaio Ensaio sem herbicida.....	68
Tabela 6: Número de <i>spots</i> detectados como diferencialmente expressos entre os tratamentos que compõem o ensaio Ensaio com herbicida.....	69
Tabela 7: Graus de liberdade (GL), quadrado médio (QM), F teste (F) e nível de significância (p) da análise de variância para a variável ABA para os tratamentos que compõem o Ensaio sem herbicida.....	71
Tabela 8: Conteúdo médio de ABA em pg por g de massa seca (pg/g de MS) nas folhas de milho transgênico submetido ao déficit hídrico com ou sem aplicação de herbicida.....	73

Tabela 9: Graus de liberdade (GL), quadrado médio (QM), F teste (F) e nível de significância (p) da análise de variância para a variável AIA nos tratamentos que compõem o ensaio Ensaio sem herbicida.....75

Tabela 10: Conteúdo médio de AIA em pg por g de massa seca (pg/g de MS) nas folhas de milho transgênico submetido ao déficit hídrico com ou sem aplicação de herbicida.....76

Tabela 11: Graus de liberdade (GL), quadrado médio (QM), F teste (F) e nível de significância (p) da análise de variância para a variável JA nos tratamentos que compõem o ensaio Ensaio sem herbicida.....77

Tabela 12: Conteúdo médio de JA em pg por g de massa seca (pg/g de MS) nas folhas de milho transgênico submetido ao déficit hídrico com ou sem aplicação de herbicida78

Tabela 13: Graus de liberdade (GL), quadrado médio (QM), F teste (F) e nível de significância (p) da análise de variância para a variável MeJA nos tratamentos que compõem o primeiro ensaio Ensaio sem herbicida.....78

Tabela 14: Conteúdo médio de MeJA em pg por g de massa seca (pg/g de MS) nas folhas de milho transgênico submetido ao déficit hídrico com ou sem aplicação de herbicida.....81

Tabela 15: Graus de liberdade (GL), quadrado médio (QM), F teste (F) e nível de significância (p) da análise de variância para a variável SA nos tratamentos que compõem o ensaio Ensaio sem herbicida.....82

Tabela 16: Conteúdo médio de SA em pg por g de massa seca (pg/g de MS) nas folhas de milho transgênico submetido ao déficit hídrico com ou sem aplicação de herbicida.....85

Tabela 17: Graus de liberdade (GL), quadrado médio (QM), F teste (F) e nível de significância (p) da análise de variância para a variável CA nos tratamentos que compõem o ensaio Ensaio sem herbicida.....86

Tabela 18: Conteúdo médio de CA em pg por g de massa seca (pg/g de MS) nas folhas de milho transgênico submetido ao déficit hídrico com ou sem aplicação de herbicida.....87

Tabela 19: Graus de liberdade (GL), quadrado médio (QM), F teste (F) e nível de significância (p) da análise de variância para a variável GA3 nos tratamentos que compõem o ensaio Ensaio sem herbicida.....88

Tabela 20: Conteúdo médio de GA3 em pg por g de massa seca (pg/g de MS) nas folhas de milho transgênico submetido ao déficit hídrico com ou sem aplicação de herbicida.....90

Tabela 21: Concentração dos derivados da lignina ácido-tioglicólico (LTGA) em ug por g de massa fresca (ug/g MF) nas folhas de milho transgênico e convencional, submetido ou não ao déficit hídrico, cultivados em casa de vegetação e câmara de crescimento (Ensaio sem herbicida).....92

Tabela 22: Concentração dos derivados da lignina ácido-tioglicólico (LTGA) em ug por g de massa fresca (ug/g MF) nas folhas de milho transgênico submetido ao déficit hídrico com ou sem aplicação de herbicida.....96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D – bidimensional
ANOVA – análise da variância
ABA – Ácido Abscísico
AIA – Ácido Indolacético
bit – dígito binário
CA – Ácido Cinâmico
CHAPS - 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CTNBio – Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
CV – coeficiente de variação
DIGE – eletroforese em gel diferencial
DNA – ácido desoxirribonucléico
dpi – pontos por polegada
DTT - 1,4-dithio-dl-threitol dithiothreitol
EDTA - ácido etilendiamino tetra-acético
GA₃ – Ácido Giberélico
GM – geneticamente modificado
h – hora
HCl – ácido clorídrico
JA – Ácido Jasmônico
KCl – cloreto de potássio
kDa – quilo Dalton
M – molar
m/v – massa por volume
MALDI-TOF - ionização/dessorção de matriz assistida por laser
MeJA – Metil Jasmonato
MgCl – cloreto de magnésio
min – minuto
MON810 – evento transgênico MON810
NaCl – cloreto de sódio
NK603 – evento transgênico NK603
OGM – organismo geneticamente modificado
PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida

pH – potencial hidrogeniônico

PM – peso molecular

PMSF – fluoreto de fenil metil sulfonil iii

SA – Ácido Salicílico

RNA – ácido ribonucléico

RR – *Roundup Ready*

s - segundo

SDS – dodecil sulfato de sódio

Tris - tris(hidroximetil)aminometano

ug – micrograma

v/v – volume por volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. HIPÓTESES	24
3. OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo geral	25
3.2 Objetivos específicos	25
4. JUSTIFICATIVA	26
5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	30
5.1 O evento NK603 e suas implicações	30
5.2 Efeitos pleiotrópicos e adversos em OGM's	33
5.3 Impactos da seca na agricultura	36
5.4 Fitormônios e compostos derivados	40
6. MATERIAL E MÉTODOS	43
6.1 Material biológico	43
6.1.1 Ensaio sem herbicida	43
6.1.2 Ensaio com herbicida	48
6.2 Coleta das amostras vegetais	49
6.3 Análise Proteômica	50
6.3.1 Imunodeteção da proteína transgênica	50
6.3.2 Extração e quantificação de proteínas totais	50
6.3.3 Eletroforese bidimensional com marcação fluorescente (2D-DIGE)	51
6.4 Quantificação de fitormônios e compostos derivados	53
6.5 Análise da concentração de lignina em folha	55
6.6 Análises estatísticas	56
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
7.1 Análise Proteômica	58

7.1.1	Imunodeteção da proteína transgênica CP4 EPSPS	58
7.1.2	Quantificação das proteínas totais e determinação do perfil	59
7.1.3	Análise proteômica comparativa DIGE	61
7.2	Análise de fitormônios e compostos derivados	70
7.2.1.	Ácido abscísico (ABA)	71
7.2.2.	Ácido indolacético (AIA)	75
7.2.3.	Ácido Jasmônico (JA)	76
7.2.4.	Metil Jasmonato (MeJA)	78
7.2.5.	Ácido Salicílico (SA)	81
7.2.6.	Ácido Cinâmico (CA)	85
7.2.7.	Ácido Giberélico (GA ₃)	88
7.3	Quantificação de lignina em folha	91
8.	COMENTÁRIOS FINAIS	98
9.	CONCLUSÕES	101
10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

1. INTRODUÇÃO

Biotecnologia é um termo amplo que abrange a manipulação dos organismos vivos e uma grande variedade de atividades, desde as técnicas convencionais de fermentação, melhoramento de plantas e animais, até recentes inovações em cultura de tecidos, irradiação, genômica e a seleção ou melhoria genética assistida por marcadores moleculares para as mais diversas finalidades. Esta definição está baseada no Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança da Convenção sobre Diversidade Biológica. Entre as denominadas “biotecnologias modernas” estão o desenvolvimento de DNA e RNA modificados *in vitro* e a fusão de células de espécies diferentes, técnicas estas que superam as barreiras da reprodução e recombinação genética naturais. Nas últimas décadas, o que mais se questiona é a aplicação da técnica de DNA recombinante no desenvolvimento de transgenes de interesse que são inseridos no genoma de plantas, animais e microrganismos para fins comerciais.

Apesar deste ramo da ciência ter gerado tecnologias diversas e atualmente em uso na agricultura, ainda há muita controvérsia quanto ao uso dos produtos destas biotecnologias em ambiente fora de contenção. Um exemplo disto é a liberação de plantas geneticamente modificadas (GM) para plantio e comercialização, que geram preocupações técnico-científicas, sociais, legais, culturais e econômicas. Diversas incertezas ainda norteiam os pesquisadores da área, como dúvidas sobre a eficácia e a qualidade dos testes de inocuidade dos produtos desenvolvidos a partir destas tecnologias modernas; benefícios e a solução de problemas para a maioria dos agricultores; e a capacidade destas biotecnologias modernas de contribuir significativamente para a manutenção e a melhoria dos sistemas agrícolas tradicionais e de subsistência.

Segundo o artigo 3º da Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005, Organismo Geneticamente Modificado (OGM), ou organismo transgênico, é todo organismo (planta, animal ou microorganismo) cujo material genético (DNA ou RNA) tenha sido modificado por qualquer técnica de engenharia genética. Ainda segundo a mesma lei, considera-se engenharia genética a atividade de produção e manipulação de moléculas de DNA/RNA recombinante. As

técnicas desenvolvidas nas últimas duas décadas possibilitam o corte e a ligação de fragmentos de DNA de distintos organismos de uma forma altamente precisa, gerando combinações de sequências de ácidos nucleicos denominados de transgenes. Também permitiram a transferência e a introdução dos transgenes em células de organismos hospedeiros, que se tornam geneticamente modificados, entretanto ainda sem precisão.

Inicialmente, a tecnologia do DNA recombinante teve um grande impacto na indústria de fármacos, e a inserção de transgenes nos genomas de plantas também ocorreu em seguida. No entanto, surgiram, em paralelo, diversas controvérsias relacionadas ao número de cópias, tamanho e local de inserção do inserto, o controle da expressão dos transgenes e os impactos desta nova tecnologia no meio ambiente e na saúde humana e animal.

Nas últimas décadas, o desenvolvimento e utilização de plantas transgênicas têm sido sustentados basicamente por vários argumentos, dos quais três merecem destaque: a preservação do meio ambiente; o aumento da produção para combater a fome no mundo e a redução dos custos de produção. Para cada um desses argumentos há um esforço enorme de parte da comunidade científica e dos proponentes desta tecnologia para demonstrar como os transgênicos geram resultados positivos e que não há risco para o ambiente e, em particular, para o consumo animal e humano.

Por outro lado, a denominação inicial “tecnologia do DNA recombinante” foi sendo substituída pela expressão “engenharia genética”. No entanto, espera-se que toda engenharia seja minimamente segura, controlável e precisa, ao contrário do que está acontecendo com os produtos da chamada “engenharia genética”, pois nos últimos anos estudos científicos comprovam que os efeitos dos transgenes nos organismos hospedeiros não são controláveis. Esta nova denominação, por enquanto, demonstra ser inadequada considerando-se o conhecimento científico atual. São exemplos dos avanços científicos de efeitos não esperados dos OGMs: ausência de controle do local de inserção de um transgene no genoma, gerando grande número de organismos anormais ou deficientes; falta de controle no número de cópias inseridas; ausência de controle dos produtos da expressão gênica; presença de efeitos pleiotrópicos imprevisíveis; falta de controle da

disseminação dos transgenes; falta de previsão de risco; e efeitos adversos a biodiversidade, saúde animal e humana.

Segundo o Anexo III do Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança, o objetivo da avaliação de risco, é identificar e avaliar os efeitos adversos potenciais dos organismos vivos modificados na conservação e no uso sustentável da diversidade biológica no provável meio receptor, levando também em conta os riscos para a saúde humana. Para tanto, a metodologia proposta compreende algumas questões básicas como: O que poderá dar errado? Quais serão as consequências disto? Quão certo e seguro é o conhecimento sobre isto? Estas análises quando direcionadas aos organismos geneticamente modificados compreendem basicamente quatro seções: caracterização molecular do evento; riscos a saúde humana e animal; risco ao meio ambiente; e impactos sociais e econômicos (CDB, 2000).

Sendo assim, este trabalho tem por objetivo investigar e agregar conhecimento sobre possíveis alterações bioquímicas e nos produtos da expressão gênica de uma variedade comercial de milho transgênica (NK603) legalmente liberada para cultivo e consumo em vários países do mundo. Espera-se que os resultados possam contribuir para a diminuição das incertezas e identificação de possíveis riscos decorrentes desta transformação genética.

2. HIPÓTESES

- As plantas transgênicas apresentam diferença na expressão proteica, e nos teores de fitormônios e lignina, em comparação a sua isolinha não-transgênica simulando condições normais de cultivo;

- As plantas transgênicas apresentam diferença na expressão proteica, nos teores de fitormônios e lignina, em comparação a sua isolinha não-transgênica quando submetidas a condições de déficit hídrico;

- Os níveis de expressão proteica, teores de fitormônios e lignina nas plantas submetidas a condições de estresse hídrico dependem de outras variáveis ambientais (interação genótipo x ambiente);

- A aplicação do herbicida Roundup Ready interfere na expressão proteica, na concentração dos teores de fitormônios e lignina das plantas transgênicas quando submetidas a condições de estresse hídrico.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo geral investigar as possíveis alterações bioquímicas e fisiológicas de uma variedade comercial de milho transgênico tolerante ao Roundup Ready® (evento NK603), submetida a condições de déficit hídrico e aplicação de herbicida.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar de forma comparativa o proteoma do milho transgênico NK603 e sua isolinha convencional mais próxima sob diferentes condições de cultivo;
- Quantificar os teores dos principais fitormônios envolvidos na resposta ao estresse hídrico nos tratamentos dos ensaios realizados;
- Estimar quantitativamente a concentração de lignina em folha nos diferentes tratamentos.

4. JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, o grande avanço das técnicas e do conhecimento científico molecular têm resultado na intensa manipulação genética de organismos (ex: OGM). Uma importante questão ainda muito polêmica no mundo está relacionada com os riscos da liberação comercial, particularmente o impacto ambiental que estas plantas geneticamente modificadas podem gerar. O que tem motivado pesquisadores independentes a realizar estudos na área de biossegurança de OGM's é a baixa qualidade dos estudos científicos, geralmente reducionistas, publicados ou não pelas empresas como suporte para a liberação comercial de plantas geneticamente modificadas.

São diversas as técnicas moleculares e bioquímicas utilizadas para análises comparativas entre cultivos transgênicos e não transgênicos, como micro arranjos de DNA, proteômica, metabolômica, perfil de mRNA, quantificação de hormônios, carboidratos, compostos fenólicos, entre outros. O proteoma, considerado como um complemento do genoma e o resultado final da expressão gênica, está altamente relacionado com a variabilidade das variedades dentro de cada espécie e influenciado pelo ambiente (WILKINS & PASQUALI, 1996). Neste sentido, a investigação proteômica, por exemplo, surge como uma ferramenta promissora e de especial interesse para estudos na avaliação da segurança de organismos com genoma geneticamente alterado, no qual certas proteínas podem ser alergênicas (ou envolvidas na síntese de alérgenos) ou tóxicas. Além disto, a utilização de técnicas bioquímicas para a quantificação de hormônios e outros compostos que regulam a expressão gênica, mas também são regulados direta ou indiretamente pelo produto da expressão gênica, são de grande interesse, já que tais alterações podem ter consequências diretas na fisiologia do metabolismo e desenvolvimento, bem como na ecologia da planta em questão.

Estudos têm mostrado a imprecisão dessas tecnologias que geram OGM, a partir de efeitos pleiotrópicos inesperados. Por exemplo, Zolla et al. (2008) realizaram análises proteômicas comparativas entre duas gerações de milho transgênico (evento MON810) e suas respectivas isolinhas convencionais, e chegaram a identificar 43 proteínas que tiveram sua regulação alterada nas plantas GM em comparação com suas linhas isogênicas parentais. Das 43 proteínas identificadas: sete foram consideradas proteínas novas, nove

deixaram de expressar seus produtos, 14 tiveram sua expressão reduzida e 13 sua expressão aumentada. Além disso, os autores ainda verificaram que uma das sete novas proteínas expressas, corresponde a gama zeína 50 kDa (uma proteína de caráter alergênico já conhecida), e várias proteínas de reserva do embrião exibiram formas truncadas, apresentando massas moleculares significativamente menores que as proteínas nativas. Em outro estudo realizado por Saxena & Stotzky (2001), os resultados mostram que o milho transgênico Bt possui maior teor de lignina nas células da bainha do feixe vascular e do esclerênquima, quando comparado a sua isolinha não- transgênica em condições normais de cultivo.

A disponibilidade de água é um fator limitante para o desenvolvimento da planta, sendo que a falta deste leva ao crescimento reduzido de toda a planta, principalmente da parte aérea. Existem trabalhos evidenciando que o estresse hídrico altera a regulação dos produtos da expressão gênica. A exemplo disto, trabalhos comprovaram a alteração na síntese de hormônios pertencentes a classes envolvidas em vias metabólicas de resposta ao estresse hídrico (HUBICK et al., 1986; NILSEN & ORCUTTE, 1996; FAROOQ et al., 2009), bem como o aumento na concentração de lignina na parede celular em diversos órgãos da planta (VICENT et al., 2005). Outros trabalhos reportam também a maior síntese de proteínas com funções relacionadas a privação de água induzidas por situações de deficiência hídrica, como por exemplo: proteínas de sequência semelhante à proteínas de canal transmembrana (GUERRERO et al., 1990) e betaína-desidrogenase, que catalisa o último passo da síntese de betaína (ISHITANI et al., 1995). Outros autores mostraram que o déficit de água também promove a síntese de proteínas que não estão relacionadas diretamente com o estresse, mas sim em reação ao dano celular causado por este (GUERRERO et al., 1990; DOWNING et al., 1992).

Além disso, a aplicação de herbicidas em lavouras com plantas geneticamente modificadas tolerantes a estes, é crescente a cada ano. Por definição, os herbicidas são substâncias químicas que prejudicam o crescimento e desenvolvimento das plantas e, portanto, são utilizados para eliminação de diversas ervas daninhas (KOSOVÁ et al., 2011). No entanto, diversos estudos mostram que estes herbicidas também influenciam na fisiologia e expressão gênica das plantas tolerantes ou não-alvo. Segundo Devine et al. (1993), o

glifosato é o principal herbicida que afeta diretamente a síntese de compostos secundários nas plantas. Castro et. al (2005) analisaram os efeitos da aplicação do herbicida Flumioxazin sob o proteoma de videira, e descobriram que a aplicação do herbicida resulta na degradação de várias proteínas envolvidas em vias metabólicas importantes como a fotossíntese, incluindo a Rubisco, comprometendo assim a eficiência do sistema fotossintético. Taylor et al. (2005) compararam os efeitos de três diferentes estresses abióticos em plantas de ervilha: déficit hídrico, estresse por frio, e aplicação do herbicida Paraquat. Os resultados mostraram que a aplicação do herbicida induziu muito mais a expressão enzimas antioxidantes do que os tratamentos com déficit hídrico e estresse por frio, indicando assim um estresse oxidativo muito mais intenso do que os outros dois fatores de estresse fisiológico. Portanto, a questão que fica é qual a influência desses efeitos adversos na fisiologia e nos produtos da expressão gênica de plantas transformadas submetidas a tratamentos com herbicidas.

A tentativa de adaptação das plantas a uma situação de estresse é mediada através de mudanças na expressão gênica que conseqüentemente resultam em mudanças na composição de seu transcriptoma, proteoma e metaboloma. Vários estudos já provaram que estas mudanças a nível de transcritos, não necessariamente correspondem a mudanças no proteoma do mesmo organismo (GYGI et al., 1999; BOGEAT-TRIBOULOT et al., 2007). Sendo assim, estudos sobre a mudança no proteoma de plantas submetidas a situações de estresse são de grande importância, já que as proteínas, ao contrário dos transcritos, são efeitos diretos da resposta da planta ao estresse. As proteínas não incluem apenas enzimas que catalisam mudanças a nível metabólico, mas também representam importantes componentes que fazem parte do processo de transcrição e tradução, sendo capaz de regular a resposta ao estresse a nível de transcritos e proteínas. Além disso, algumas proteínas possuem a importante função de mudanças na membrana plasmática, no citoplasma celular, no citoesqueleto e também na composição intracelular como resposta de adaptação a situações de estresse. Portanto, estudos a nível proteômico sobre a resposta de plantas em condições de estresses adversos podem contribuir significativamente para o entendimento dos mecanismos fisiológicos da tolerância destas plantas a estas situações (KOSOVÁ et al., 2011).

Em geral, os testes no âmbito da avaliação de risco realizados pelas empresas proponentes da tecnologia como parte do pedido de aprovação legal aos órgãos regulatórios, não incluem a análise do comportamento destas plantas transformadas sob diferentes condições de cultivo. Como o déficit de água tem sido frequente em importantes regiões de cultivo das principais commodities, bem como a aplicação de herbicidas, é razoável verificar a resposta de plantas transgênicas nestas condições. Além disso, em tempos de mudanças climáticas é preciso levar em consideração as diversas condições ambientais que estes organismos sofrem durante seu ciclo de vida, incluindo estresses bióticos e abióticos.

5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

5.1 O evento NK603 e suas implicações

O evento NK603 foi desenvolvido para permitir o uso de herbicida à base de glifosato, como uma opção de controle de plantas daninhas na cultura do milho. O gene que codifica uma forma tolerante ao glifosato da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) foi isolado da bactéria do solo *Agrobacterium tumefaciens*, estirpe CP4, e introduzido no genoma do milho utilizando técnicas do DNA recombinante (CERA, 2009).

O glifosato especificamente se liga e inativa a proteína EPSPS, que está envolvida na biossíntese dos aminoácidos aromáticos tirosina, fenilalanina e triptofano (SIEHL, 1997). Esta enzima está presente em todas as plantas, bactérias e fungos, mas não em animais, que não sintetizam os seus próprios aminoácidos aromáticos. A proteína CP4 EPSPS, codificada pelo gene presente em *Agrobacterium tumefaciens*, possui baixa afinidade pelo glifosato se comparada com a proteína EPSPS nativa de plantas. Assim, quando o milho transgênico NK603, que expressa a proteína CP4 EPSPS, é tratado com doses comerciais de glifosato, as plantas continuam seu desenvolvimento, pois se a forma nativa da EPSPS do milho é inibida, a biossíntese dos aminoácidos aromáticos continua sendo realizada pela CP4 EPSPS. Entretanto, como efeito pleiotrópico, a inibição da proteína EPSPS pode afetar a biossíntese de outras proteínas, auxinas, compostos de defesa, fitoalexinas, ácido fólico, precursores de ligninas, flavonóides, plastoquinona, e centenas de outros compostos fenólicos e alcalóides através da inibição de ácidos aromáticos (BENTLEY, 1990).

O evento de transformação genética NK603 contém um inserto com dois cassetes de expressão (ou transgenes), contendo cada um uma cópia do gene CP4 EPSPS e suas respectivas sequências reguladoras (promotores e terminadores). O primeiro cassete de expressão contém o gene CP4 EPSPS sob controle do promotor da actina do arroz (MCELROY et al., 1990). No segundo cassete, o gene é controlado pelo promotor 35S modificado a partir da sequência nativa do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) (KAY et al., 1985).

Os produtos de ambos os cassetes de expressão são difundidos com auxílio de um peptídeo de trânsito (CTP2) para que a proteína CP4 EPSPS possa chegar ao cloroplasto, local onde ocorre a síntese dos aminoácidos aromáticos (Figura 1) (KISHORE & SHAH, 1988).

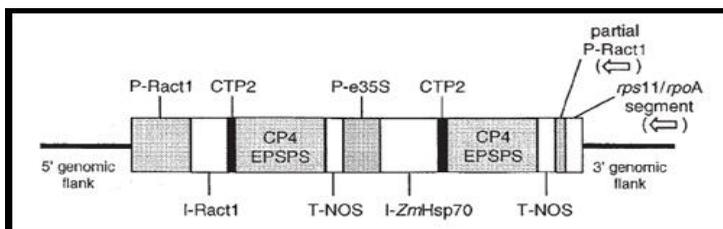


Figura 1. Inserto do evento NK603 contendo os dois cassetes de expressão da proteína CP4 EPSPS e suas sequências reguladoras. Legenda: P-Ract1 = Promotor da actina do arroz; I-Ract1 = Íntron da ractina do arroz; CTP2 = Peptídeo de trânsito; CP4 EPSPS = Sequência do gene de interesse CP4 EPSPS (*A. tumefaciens*); T-NOS = Terminador do gene nopalina sintase (*A. tumefaciens*); P-e35S = Promotor modificado do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV); I-ZmHsp70 = Íntron do gene Hsp70 do milho (*Z. mays*) (Fonte: GMDD, 2012).

Segundo o parecer técnico nº 1596/2008 da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), documento que atesta legalmente a liberação comercial do evento de transformação genética NK603, a proteína CP4 EPSPS não é tóxica, conforme demonstrado por um estudo de toxicidade oral aguda, no qual a CP4 EPSPS foi administrada oralmente em camundongos na forma de dose única elevada (CTNBIO, 2008). Ainda segundo o mesmo parecer, o milho NK603 mostrou ser equivalente ao milho convencional, com exceção da característica de tolerância ao glifosato e suas interações básicas com outros organismos no ambiente não são consideradas diferentes das interações do milho convencional. Sendo assim, a CTNBio considerou que o pedido de liberação do milho transgênico evento NK603 atende às normas e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal (CTNBIO, 2008).

Contudo, recentemente, novos avanços no conhecimento científico sobre os efeitos adversos do milho transgênico evento NK603 foram publicados por pesquisadores da Universidade de Caen, na revista científica *Food and*

Chemical Toxicology. Séralini *et al.* (2012) comprovaram alterações metabólicas em ratos, decorrentes do consumo do milho geneticamente modificado NK603, com ou sem aplicação do herbicida Roundup. O estudo é considerado inédito por ter avaliado mais de 100 parâmetros ao longo de dois anos com 200 ratos de laboratório e por ter sido o primeiro estudo de longa duração. Os resultados revelaram uma mortalidade mais alta e frequente quando foram consumidos esses dois produtos (milho NK603 e *Roundup*), com efeitos hormonais não lineares e específicos aos machos ou fêmeas. As fêmeas desenvolveram numerosos e significantes tumores mamários, além de problemas hipofisários e renais. Os machos morreram, em sua maioria, de graves deficiências crônicas hepato-renais (SÉRALINI *et al.*, 2012, retirado e, posteriormente, republicado em 2014). A partir destes e outros resultados, os autores propõem que a avaliação para liberação de plantas transgênicas no meio ambiente seja mais criteriosa, e que os estudos sejam feitos a médio e longo prazo para avaliar os potenciais efeitos tóxicos dos produtos da modificação genética e a interação destes com o meio.

Esta publicação provocou grandes discussões, principalmente nos países em que o evento NK603 está presente em variedades de milho transgênico liberadas para plantio e comercialização. Inicialmente, países como a Rússia, suspenderam a importação deste milho após a divulgação do estudo, e a França requereu estudos para aferir sua segurança. Em junho de 2013, a União Européia publicou um edital sobre o tema “Alimentação, Agricultura, Pesca e Biotecnologia”, com verba de 3 milhões de euros, destinado a financiar a realização de estudos e pesquisa sobre a alimentação de camundongos com o milho NK603, a fim de confirmar e dar maior robustez aos resultados encontrados por Séralini *et al.* (2012) (COMISSÃO EUROPÉIA, 2013). Também em julho de 2013, a *European Food Safety Authority* (EFSA) publicou um documento que estabelece protocolos para avaliar o risco de toxicidade crônica em roedores a longo prazo com alimentos geneticamente modificados (EFSA JOURNAL, 2013). Este documento, em sua grande parte, reconhece a importância das metodologias utilizadas pelo grupo de estudos de Séralini sobre o milho transgênico NK603, o qual foi bastante criticado por boa parte da comunidade científica, inclusive pela CTNBio a qual aponta algumas

“limitações técnicas” da publicação que segundo eles invalidam as conclusões apresentadas pelos autores (CTNBio, 2012).

5.2 Efeitos pleiotrópicos e adversos em OGM's

Efeito pleiotrópico, ou pleiotropia, é o fenômeno genético em que um gene afeta duas ou mais características distintas que, muitas vezes, não estão relacionadas entre si (WILLIAMS, 1957). A pleiotropia é basicamente um efeito não esperado e pode ser definido como um dos atributos comumente observados nos genes, com amplas implicações em diversas áreas relacionadas a genética e evolução (WRIGTH, 1968; BARTON, 1990; HODKING, 1998).

Nas últimas décadas, os biorriscos dos organismos geneticamente modificados liberados para plantio e comercialização têm sido objeto de estudo de diversos pesquisadores e cientistas independentes ou vinculados as principais empresas proponentes desta tecnologia. Dentre estes biorriscos, está a pleiotropia.

A exemplo disto, os testes realizados pelos pesquisadores da empresa proponente da tecnologia da Soja RR não foram suficientes para discriminar variações em 16 proteínas alergênicas desta espécie e, segundo Padgett et al. (1996), houve um aumento de cerca de 26% do inibidor de tripsina, que também é alergênico e antinutricional. Sagstad et al. (2007) constataram que salmões alimentados com o milho MON810 (que expressa a proteína CRY1Ab) obtiveram uma maior proporção de granulócitos e monócitos, menor proporção de linfócitos, além de mudanças nas atividades das proteínas de estresse e alterações nas populações de leucócitos associados à resposta imune. Estudos com o evento MON863, que produz a toxina CRY3Bb1, também já demonstraram possíveis danos em mamíferos. Dados analisados por Séralini et al. (2007) revelaram efeitos significativos no aumento de basófilos, linfócitos e células brancas do sangue, bem como a diminuição do peso dos rins e aumento da taxa glicêmica sanguínea.

Com relação aos efeitos adversos causados por estes organismos no meio ambiente, Hilbeck et al. (1998) demonstraram que 57% das larvas de *Chrysopa carnea*, um agente de controle biológico nativo dos ecossistemas,

morreram ao se alimentarem de dieta contendo toxina *Bt*, produzidas pelo milho MON810. Outro importante estudo independente foi o realizado por Rosi Marchall *et al.* (2007), que demonstraram um potencial efeito ecológico causado pelas toxinas Bt na diminuição da taxa de crescimento ou aumento da mortalidade de espécies aquáticas. Um estudo realizado com abelhas expostas a diferentes quantidades da proteína Cry1Ab demonstrou que, quando expostas a 5000 ppb de Cry1Ab, estas tiveram suas funções ecológicas perturbadas (RAMIREZ-ROMERO *et al.*, 2008)

Quanto a investigação proteômica comparativa entre milho transgênico e não-transgênico, existem dois estudos que se destacam, publicados por Zolla *et al.* (2008) e Barros *et al.* (2010). No primeiro estudo, os autores encontraram 43 *spots* diferencialmente expressos quando comparando o proteoma de grãos de milho transgênico (MON810) e sua versão não-transgênica isogênica mais próxima, cultivados em condições controladas. Dentre estes, quatorze *spots* tiveram menor expressão, treze foram mais expressos e nove foram ausentes nas plantas transgênicas. No estudo de Barros *et al.* (2010) os autores encontraram três *spots* diferencialmente expressos quando compararam um híbrido comercial não-transgênico com dois híbridos comerciais de milho transgênico de semelhante *background* genético (eventos MON810 e NK603) cultivados a campo com coletas em três safras consecutivas nos anos 2004, 2005 e 2006. Dentre estes, três tiveram maior expressão e um teve menor expressão em um dos transgênicos, eventos MON810, NK603 e NK603, respectivamente.

É importante ressaltar que os estudos investigativos que comprovaram a expressão diferencial de proteínas, quando comparado um OGM e sua versão isogênica mais próxima, contraria a afirmação das empresas proponentes desta tecnologia, que afirmam que há apenas expressão diferencial das proteínas alvo da modificação genética, entre um OGM e sua versão não modificada geneticamente.

Por último, o *European Network of Scientists for Social and Environmental Responsibility* (ENSSER) em um painel científico na Índia realizado em 2013 recomendou, por unanimidade, uma moratória aos campos experimentais de transgênicos no país, além da reavaliação dos transgênicos já liberados. O grupo de especialistas considerou que o atual sistema regulatório e o protocolo para a condução de testes experimentais é insatisfatório e inadequado,

necessitando, de forma substancial, de mudanças, reestruturação e fortalecimento. O Painel recomendou, entre outros testes, a realização de estudos de longo prazo e inter-geracionais com roedores sobre todos os produtos transgênicos, tanto os já aprovados como também aqueles em processo de aprovação. Além disso, o painel também ressaltou a necessidade da realização de avaliações socioeconômicas, mesmo antes do desenvolvimento dos produtos, e destacou a importância do monitoramento pós-liberação comercial.

Além deste, alguns outros estudos demonstraram que células expostas a doses de Roundup sofrem severas alterações na expressão gênica, como por exemplo Walsh et al. (2000) demonstraram que o Roundup inibe a esteroidogênese através da diminuição e interrupção da expressão da proteína de transporte StAR, que possui importantes funções regulatórias durante a síntese dos hormônios esteróides. É interessante ressaltar, que neste estudo o glifosato quando exposto sozinho não interrompeu a produção de esteroides, indicando que pelo menos algum outro componente presente na formulação do Roundup é necessário para que ocorra esta perturbação na esteroidogênese. O glifosato tem sido descrito também como um disruptor endócrino que afeta o sistema reprodutor masculino, e Cavali et al. (2013) propõem em seu estudo que a toxicidade do Roundup, implicando em sobrecargas de Ca^{2+} , mecanismos de sinalização interrompidos, resposta do retículo endoplasmático ao estresse, e o esgotamento das defesas antioxidantes, podem contribuir para o rompimento das células de Sertoli na espermatogênese, causando impacto direto sobre a fertilidade masculina.

Outros estudos demonstram que o glifosato, componente principal do herbicida Roundup, inibe também as importantes enzimas do grupo CYP, que possuem importantes funções na modificação química de diversos compostos endógenos e exógenos tanto em animais quanto em plantas. Como exemplo, dois estudos apontam a interrupção na atividade da aromatase, uma importante enzima do grupo CYP. No primeiro estudo, Gasnier et al. (2009) demonstraram que doses mínimas de glifosato, como 10 ppm, foram suficientes para interromper as atividades da aromatase em células do fígado humano (HepG2), uma linhagem de células já bem estabelecidas para estudos de toxicidade de xenobióticos. No segundo estudo, Richard et al. (2005)

evidenciaram também a interrupção das atividades da aromatase em células da placenta humana, a uma concentração de até 100 vezes menor do que a recomendada no uso agrícola.

5.3 Impactos da seca na agricultura

A seca pode ser definida como qualquer redução na quantidade de água disponível para a cultura - independente da irrigação – que reduz a produtividade desta abaixo do que os agricultores conseguiriam produzir com a disponibilidade de água adequada. Apesar de a seca parecer um fenômeno relativamente simples, seus efeitos são extremamente complexos (ARAUS et al., 2002; RICHARDS, 2006; WILHITE et al., 2007).

A seca é um fenômeno natural que produz uma complexa teia de impactos, que se propagam através de muitos setores da economia e esta é frequentemente tratada como o mais complexo de todos os perigos naturais, por atingir uma gama maior de pessoas do que qualquer outro perigo ambiental. Ela pode ser considerada um dos impactos mais graves em termos de perda de produtividade na agricultura em todo o mundo, se tornando uma grande preocupação para todos os agricultores.

Diversos fatores afetam o impacto deste fenômeno na produção agrícola, como por exemplo, o tempo de duração da escassez de água; a relação deste tempo com os estádios fenológicos da cultura; a capacidade de retenção de água do solo cultivado; a variação na temperatura diurna e noturna; o sistema de cultivo utilizado e a resistência ou tolerância das variedades cultivadas. As secas severas que duram meses ou até mesmo anos geralmente atraem mais preocupação da população. No entanto, as secas moderadas, que são as mais comuns, exercem um impacto substancial na produção agrícola, principalmente quando ocorrem em períodos críticos do desenvolvimento das culturas, podendo comprometer seriamente sua produção (GURIAN-SHERMAN, 2012). O aumento no número de secas severas continua sendo a principal preocupação dos agricultores. Em 2002, nos Estados Unidos, os pagamentos de seguros pelos agricultores para cobrir perdas na safra decorrentes da seca atingiu cerca de U\$ 3 bilhões (WILHITE et al., 2007). Nove anos depois, de

acordo com o *National Climatic Data Center*, uma seca severa afetou cerca de 23 % dos Estados Unidos em outubro de 2011, causando perdas na produção agrícola estimadas em \$5.2 bilhões só no estado do Texas. Em agosto de 2012, houve a maior seca da história dos Estados Unidos segundo o *U.S. Drought Monitor* (2012), onde 46% do território norte americano sofreu uma seca considerada severa (Figura 2). Vale ressaltar que os EUA é o maior produtor de plantas transgênicas do mundo e uma das culturas mais produzidas é o milho. As perdas devido a seca severa chegaram a 15 milhões de toneladas na cultura da soja, e 102 milhões de toneladas para a cultura do milho. Em 2008, na Austrália, um importante produtor de trigo a nível mundial teve perdas substanciais de produção por causa da seca severa que ocorreu naquele ano (HEADEY & FAN, 2008). Nos anos em que as secas graves ocorrem nas principais regiões produtoras de alimentos, as consequentes perdas na colheita podem afetar a oferta mundial de alimentos e seus preços.

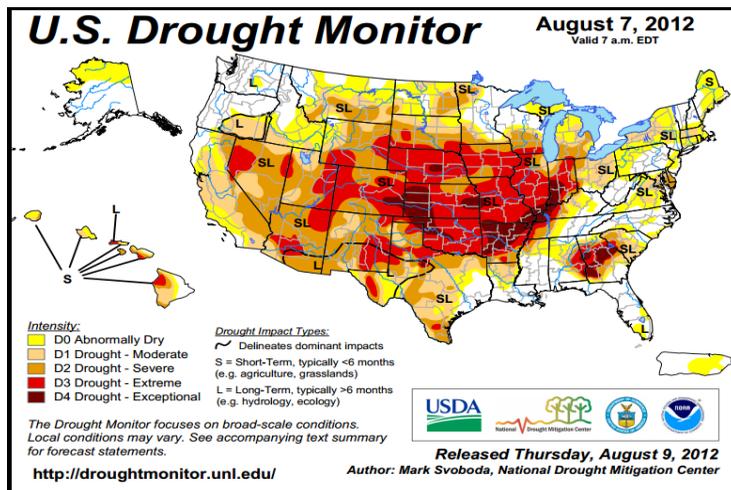


Figura 2. Monitoramento de seca nos Estados Unidos em agosto de 2012 (U.S. Drought Monitor, 2012).

Em Santa Catarina, há cerca de 1.200 registros oficiais de desastres naturais relacionados a secas e estiagens ocorridas entre 1991 e 2010, sendo

que as regiões do interior do estado foram as mais atingidas. A região do Oeste Catarinense apresentou maior frequência do desastre, seguido das regiões Serrana e do Vale do Itajaí. Dos 293 municípios do Estado, 217 foram afetados por estiagens e secas, representando 74% do total de municípios (CEPED, 2011). Segundo o Atlas Brasileiro de Desastres Naturais – Santa Catarina (2011), os desastres por estiagens e secas ocorrentes nos municípios de Santa Catarina foram registrados em quase todos os anos de 1991 a 2010, exceto no ano de 2007 para o qual não se obteve registros. É considerado, portanto, um evento recorrente no estado.

As estiagens e secas, nos anos de 2003 e 2004, foram consideradas as mais severas no Estado, afetando 184 municípios. Segundo o Centro Integrado de Meteorologia e Recursos Hídricos, a deficiência no volume de chuvas ocorreu desde agosto de 2003, caracterizadas por baixa e má distribuição das precipitações hídricas. Segundo Gonçalves, Moller e Rudorff (2004), os meses dos verões de 2004 e 2005 tiveram déficits de precipitação, não chovendo nem a metade da média climatológica desse período, em muitos municípios do estado catarinense.

Uma severa estiagem também atingiu o estado de Santa Catarina de novembro de 2011 a abril de 2012, afetando gravemente as safras de grãos produzidos no estado (milho, soja e feijão) e a produção de leite. Estima-se que o prejuízo neste período tenha sido de cerca de R\$ 700 milhões à agricultura catarinense (CIRAM/EPAGRI, 2012).

Os cientistas projetam que o aquecimento global irá criar ou agravar a escassez de água em algumas regiões do planeta, incluindo aquelas que atualmente já sofrem desafios na produção de alimentos (RIJSBERMAN, 2006). Enquanto isso, as populações em expansão e consumo crescente dos produtos de origem animal, impulsionadas pelo aumento da renda, exigem mais produção das pastagens e de grãos para alimentação animal, dependendo ainda mais da disponibilidade de água para agricultura.

A água utilizada na agricultura, tal como para irrigação, representa cerca de 70% da água utilizada pela humanidade (CALZADILLA et al., 2010). Em várias partes do mundo, os agricultores têm utilizado águas subterrâneas em aquíferos antigos, com taxas de recarga muito lenta para irrigar suas plantações. Em importantes regiões produtoras de alimentos, como as grandes planícies dos

Estados Unidos e da China, os agricultores já estão utilizando águas subterrâneas para a agricultura, pois não podem depender mais da precipitação (SOPHOCLOEUS, 2010; JIANG, 2009), o que eleva o custo de produção. Neste sentido, a produção agrícola pode diminuir ou vir a desaparecer em algumas regiões em que a água se torna indisponível ou muito cara.

Dentre as formas utilizadas para enfrentar estas adversidades causadas por secas, incluem-se práticas agroecológicas, que se mostram bastante eficazes, como por exemplo, a melhoria da retenção de água no solo por meio de plantas de cobertura que ajudam no aumento da matéria orgânica do solo e o uso de resíduos de culturas para a cobertura do solo, como a prática do plantio direto que reduzem a temperatura do solo e, conseqüentemente, a evaporação da água (BRADY & WEIL, 2008; LOTTER et al., 2003; WANDER et al., 1994). Adicionalmente, o uso de policultivos ou de sistemas agroflorestais tem se mostrado bastante resilientes em épocas de escassez de água (DRUMOND & MORGADO, 2004).

No entanto, há décadas existe a promessa por parte das empresas de biotecnologia de que a tecnologia do DNA recombinante poderia desenvolver variedades resistentes a seca. As indústrias de biotecnologia sugerem também que a engenharia genética pode reduzir a demanda de água pelas plantas, até mesmo em situações normais de cultivo. No entanto, até agora a única planta transgênica tolerante a seca aprovada comercialmente no final de 2011 pelos USA, denominado milho *DroughtGard*, apresenta somente resultados modestos e apenas sob condições moderadas de déficit hídrico. Enquanto estas variedades eficientes não chegam, os agricultores vêm adotando de forma crescente a cada ano, variedades transgênicas desenvolvidas para outras finalidades como por exemplo, resistência a herbicidas ou a alguns insetos. Como estas variedades ainda não foram especificamente testadas nas condições adversas, o presente estudo contribuirá para o avanço científico no conhecimento das respostas do Evento de transformação genética NK603 às condições de estresse hídrico.

5.4 Fitormônios e compostos derivados

Os fitormônios são compostos essenciais para a habilidade das plantas de se adaptarem a situações de estresses abióticos pelo fato de mediarem uma gama de respostas adaptativas (SANTNER & ESTELLE, 2009). Geralmente os fitormônios alteram rapidamente a expressão de genes através da indução ou prevenção da degradação de reguladores transcricionais pela via conhecida como via da ubiquitina-proteassoma (SANTNER & ESTELLE, 2010). Alguns deles são os principais mediadores dos mecanismos de defesa das plantas a situações adversas de estresse.

Além da redução no crescimento e desenvolvimento, tanto da parte aérea quanto do sistema radicular da planta, a disponibilidade de água limitada já foi descrita como responsável por outras respostas, como o fechamento estomático e a síntese de osmólitos (ex.: betaína e PRO). Estas respostas são pelo menos parcialmente controladas pela síntese de Ácido Abscísico (ABA), fitormônio bastante conhecido por aumentar sua concentração em plantas submetidas ao estresse hídrico (ZEEVAART & CREELMAN, 1998). Vários genes são expressos a partir da sinalização da presença de ABA em grandes concentrações nos tecidos estressados, que codificam as proteínas de resposta ao ABA ou deidrinhas que possuem elevada hidrofobicidade.

Além do ABA, o Ácido Indolacético (AIA) é uma importante auxina que possui grande influência no alongamento celular das plantas, e por isso, está indiretamente ligado às respostas de adaptação da planta a situação de déficit hídrico. Apesar disto, as evidências do papel do AIA na adaptação das plantas a situações de desidratação ainda é bastante contraditória. Por muito tempo assumiu-se que o estresse por seca resulta no decréscimo do conteúdo de AIA nas plantas (PUSTOVOITA & ZHOLKEVICH, 1992). Contudo, aos poucos foi se tornando mais evidente que o processo de adaptação a seca pelas plantas é acompanhado pelo aumento na síntese de AIA (ZHOLKEVICH & PUSTOVOITA, 1993). Alguns trabalhos já reportavam que o conteúdo de AIA aumentou em vários órgãos da planta quando submetida a condição de estresse por déficit hídrico (SAKURAI et al., 1985). Sendo assim, de acordo com a literatura acessada, até o momento não conseguiu-se apresentar uma forma completa do padrão de mudança na síntese de AIA durante o processo de seca.

O Ácido Jasmônico (JA), junto com o Ácido Abscísico (ABA) e o Ácido Salicílico (SA), possui um papel fundamental como sinalizadores primários no processo de defesa da planta ao estresse abiótico (BARI & JONES, 2009; PIETERSE et al., 2009). Estes fitormônios possuem a função de gerar uma rede de transdução de sinais que conduz uma cascata de eventos responsáveis pela adaptação fisiológica a condição de estresse abiótico.

Particularmente, o JA e seus derivados, como o Metil Jasmonato (MeJA), constituem uma família que regulam o desenvolvimento da planta e suas respostas aos mais diversos estímulos ambientais. Sendo assim, estas moléculas estão envolvidas em uma série de processos relacionados ao desenvolvimento e sobrevivência do vegetal, incluindo respostas de defesa direta e indireta (ex.: defesa contra o ataque de insetos e patógenos), metabolismo secundário, processos reprodutivos (ex.: maturação do pólen, deiscência das anteras e desenvolvimento do óvulo), desenvolvimento de frutos, entre outros (SEO et al., 2001; WASTERACK & HAUSE, 2002; ARIMURA et al., 2005; LIECHTI & FARMER, 2006; WASTERACK, 2007). Por estar envolvido nos mais importantes processos de resposta a estímulos ambientais é que decidiu-se quantificar o conteúdo deste fitormônio em diferentes condições de cultivo.

Assim como o Ácido Jasmônico, o Metil Jasmonato (MeJA) é um importante derivativo que está envolvido em uma gama de processos fisiológicos e bioquímicos nas plantas, como por exemplo atuando como importantes reguladores celulares envolvidos em desenvolvimento diversificado processos, tais como a germinação de sementes, o crescimento da raiz, fertilidade, o amadurecimento de frutos, e senescência (CREELMAN & RAO, 2002). Adicionalmente, o MeJA participa da ativação dos mecanismos de defesa da planta em resposta a estresses abióticos, como ataque de insetos e patógenos, estresse por seca, salinidade ou baixas temperaturas (WASTERACK & PARTHIER, 1997).

Outro fitormônio envolvido nos processos de defesa da planta a situações de estresse é o Ácido Salicílico (SA). Este é um importante fitormônio envolvido em uma ampla gama de respostas fisiológicas e metabólicas em plantas (HAYAT, 2010). Durante os últimos anos, o SA vem sendo muito estudado como um sinalizador molecular que media respostas de defesa local e sistêmica ao ataque de patógenos. Além disso, hoje em dia este fitormônio vem sendo relacionado

também como um importante fator no papel de defesa das plantas em resposta a estresses abióticos variados, como o estresse por seca, baixas e altas temperaturas, metais pesados e estresse osmótico (JANDA et al., 1999; RAO & DAVIS, 1999; MOLINA et al., 2002, NEMETH et al., 2002; MUNNE-BOSCH & PEÑUELAS, 2003; SHI et al., 2008; RIVAS-SAN VICENTE & PLASENCIA, 2011). Atualmente, existem duas principais vias esclarecidas para a biossíntese do SA (SHAH, 2003). Uma destas sugere que o SA é sintetizado a partir da fenilalanina que por sua vez é controlado pelo Ácido Cinâmico (CA). A descarboxilação da cadeia lateral do CA pode dar origem ao Ácido Benzoico, o qual pode em seguida passar por uma hidroxilação formando o SA. É importante lembrar que a fenilalanina é um aminoácido produto da via do chiquimato, a qual a síntese da enzima EPSPS nativa também está envolvida (PADGETTE et al., 1995).

Outro importante composto que vem sendo estudado é o Ácido Cinâmico (CA), um ácido graxo aromático que pertence ao grupo das auxinas, fitormônios já conhecidos pela sua atuação nos mecanismos de defesa a estresses abióticos nas plantas. Além disso, como já citado, o ácido cinâmico é um importante produto da via do chiquimato, o qual controla a síntese de fenilalanina. Nesta mesma via, a fenilalanina é um dos aminoácidos responsáveis pela biossíntese da enzima EPSPS e do ácido salicílico. Por essas relações com os componentes envolvidos nos mecanismos de defesa a estresses abióticos, bem como a relação indireta do CA com a síntese da enzima EPSPS, decidiu-se quantificar os teores deste composto nas folhas dos tratamentos nos dois ensaios realizados.

Por último, o Ácido Giberélico (GA_3) está envolvido em mecanismos de resposta aos mais diversos estímulos ambientais, como resposta a baixas temperaturas e a privação de água. Geralmente, a desidratação afeta os processos relacionados a turgidez celular e o crescimento dos meristemas. O conhecido decréscimo de citocininas e ácido giberélico, e o acréscimo de ácido abscísico sob condições de seca sugere que a redução no crescimento do vegetal é consequência da relação destes hormônios induzida pela seca (VERELST et al., 2010).

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Material biológico

As sementes de milho utilizadas neste trabalho foram adquiridas em casa comercial de sementes. As sementes são um híbrido simples transgênico DKB 245 RR2 (evento NK603) e sua isolinha mais próxima DKB 245 (convencional), ambos comercializados pela empresa Monsanto Company[®]. O híbrido transgênico utilizado neste trabalho (DKB 245 RR2) é aquele cujo processo de modificação genética consiste na inserção do gene CP4 EPSPS proveniente da bactéria *Agrobacterium tumefaciens*, o qual confere a tolerância da planta a herbicidas que possuem o glifosato como princípio ativo.

6.1.1 Ensaio sem herbicida

O delineamento experimental utilizado neste ensaio foi de blocos ao acaso, com distribuição trifatorial, composto pelos seguintes fatores: Transgenia (T), Estresse (E), e Ambiente (A). Cada fator possui dois níveis, os quais serão especificados a seguir.

O ensaio trifatorial foi realizado em dois diferentes ambientes (Fator Ambiente), casa de vegetação (cv) e câmara de crescimento (cc), nas dependências do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, em Florianópolis – SC, coordenadas geográficas 27°34' de latitude S e 48°30' de longitude W, 22m acima do nível do mar. O ensaio foi realizado ao mesmo tempo nos dois ambientes, entre os meses de setembro e outubro de 2012, e a temperatura média registrada foi de $19,8^{\circ}\text{C} \pm 1,7$ (Figura 3). O primeiro ambiente foi em casa de vegetação apresentava temperatura, fotoperíodo e umidade variáveis, com o intuito de reproduzir a situação do cultivo a campo (Figura 4). O segundo ambiente foi uma câmara de crescimento com intensidade de luz de $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante o fotoperíodo de 16 h, a uma temperatura de 25°C durante o dia e 18°C durante a noite, e 50% de umidade relativa (Figura 5).

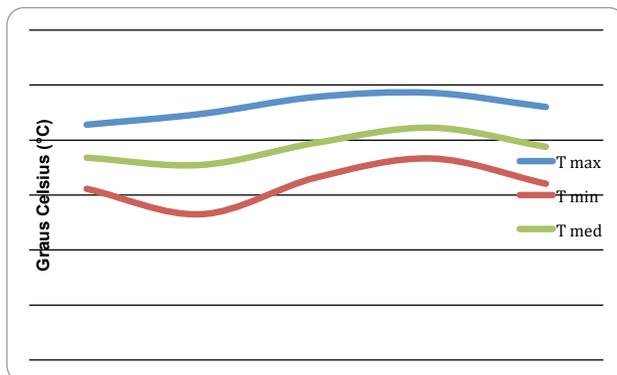


Figura 3. Médias semanais de temperaturas máxima, média e mínima, no período de condução do ensaio, no ano de 2012 – Florianópolis (SC).

O Fator Transgenia também foi composto de dois níveis: sementes de milho transgênicas híbrido DKB 245 RR2 que contém o evento NK603 (T); e sementes de sua isolinha convencional mais próxima híbrido DKB 245 (C). As sementes utilizadas em todo o ensaio foram previamente germinadas em papel filtro e mantidas em câmara BOD até o estágio de plântulas, cinco dias após a germinação. A partir daí, em ambos ambientes, as plântulas foram transplantadas para vasos plásticos contendo substrato florestal para plantas, a base de casca de *Pinus* e vermiculita expandida.

Assim como os outros, o fator Estresse foi composto por dois níveis de água, sendo que o primeiro compreendeu o fornecimento de água em quantidade de capacidade de campo (CONT) e o segundo nível a simulação de uma seca (SECA).

O arranjo das parcelas foi exatamente o mesmo para os dois ambientes. Este foi composto de três blocos completamente casualizados, sendo cada unidade experimental um grupo de quatro vasos (uma planta por vaso) que compõem os quatro tratamentos: Milho Convencional submetido rega controle (CCONT); Milho Convencional submetido a seca (CSECA); Milho Transgênico submetido rega controle (TCONT); e Milho Transgênico submetido a seca (TSECA).

Considerando que os tratamentos foram os mesmos e executados da mesma maneira nos dois ambientes, o ensaio possibilitou também avaliar o efeito da interação genótipo x ambiente, tanto para genótipos diferenciados pelos distintos produtos da expressão gênica de transgenes ou não, como também as demais interações simples e a tríplice, já que o ensaio também contemplou a presença ou não do estresse hídrico.



Figura 4. Ambiente casa de vegetação (cv) do Ensaio sem herbicida conduzido nas dependências do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis, SC.

A condução do ensaio também foi exatamente a mesma nos dois ambientes e esta se baseou na metodologia proposta por Vicent et al. (2005) com modificações. Inicialmente todos os tratamentos foram regados diariamente com a mesma quantidade de água, com o objetivo de manter a tensão de água no solo a 0 kPa, ou umidade do substrato em 125% (1,25 g de H₂O / g de solo), o qual foi mensurado por meio de um vácuo-tensiômetro de solo (WaterMeter

MOD WS-76). Todos os tratamentos foram conduzidos desta forma até que todas as plantas atingissem o estágio de emissão da quinta folha (início estágio V5). A partir deste estágio, foi retida a rega das plantas que pertencem aos tratamentos de estresse hídrico.

O período de estresse hídrico foi mantido até que o solo das plantas destes tratamentos atingissem uma tensão de água igual a 60 kPa, ou umidade do substrato em 25 % (0,25 g de H₂O / g de solo), o que ocorreu cerca de 15 dias após a retenção da rega nos dois ambientes. Neste momento, foram coletadas as amostras vegetais para a realização das análises.



Figura 5. Ambiente câmara de crescimento (cc) do Ensaio sem herbicida conduzido nas dependências do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis, SC

6.1.2 Ensaio com herbicida

Este ensaio foi conduzido apenas em casa de vegetação, com o intuito de reproduzir a situação ambiental encontrada nas lavouras de produção (Figura 6). As sementes utilizadas neste ensaio também foram previamente germinadas em caixas gerbox, mantidas em câmara BOD até o estágio de plântulas. As plântulas foram transplantadas para vasos plásticos contendo o mesmo substrato utilizado nos outros ensaios sem aplicação de herbicida. Neste ensaio, o delineamento experimental também foi de blocos ao acaso, porém desta vez unifatorial, o qual foi formado também por três blocos, sendo cada unidade experimental composta por um grupo de três vasos (uma planta por vaso), com dois tratamentos: Milho Transgênico submetido a seca com aplicação de herbicida (TSECA RR); Milho Transgênico submetido a seca sem aplicação de herbicida (TSECA).

As mesmas condições de estresse hídrico descritas para os ensaios sem aplicação de herbicida foram utilizadas também neste ensaio. Adicionalmente, foram feitas duas aplicações sequenciais do herbicida comercial *Roundup Original*, seguindo as recomendações do fabricante no tratamento TSECA RR pré-determinado. A primeira aplicação foi feita 15 dias após o início do experimento e a segunda aos 30 dias, em doses de 2,0 L/ha e concentração média de 960 g de Sal de Isopropilamina de Glifosato por ha, conforme recomendações do fabricante.



Figura 6. Ensaio com aplicação de herbicida conduzido em casa de vegetação nas dependências do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis, SC.

6.2 Coleta das amostras vegetais

A coleta de amostras vegetais foi realizada da seguinte forma: no momento em que o substrato dos tratamentos de seca atingiram 25% de umidade (0,25 g de H₂O / g de solo), foi coletado aproximadamente 1g de tecido foliar fresco e saudável da sétima folha (contagem a partir do coleóptilo) de cada uma das plantas que compõem um tratamento, em cada bloco, para que fosse possível realizar todas as análises previstas. O material foi colocado em criotubos de 3 ml, rapidamente pesado e imediatamente acondicionados em nitrogênio líquido. Após o término da coleta, as amostras foram retiradas do nitrogênio líquido e imediatamente acomodadas e mantidas em freezer a -80° C onde permaneceram até o momento das análises.

6.3 Análise Proteômica

6.3.1 Imunodeteção da proteína transgênica

A imunodeteção da proteína transgênica CP4 EPSPS foi feita por meio do uso de tiras imunocromatográficas, do *Kit QualiPlate* para RR da *Envirologix*. O princípio desta técnica está baseado no uso de dois anticorpos específicos contra a proteína transgênica: um anticorpo de captura e um anticorpo de detecção conjugado a partículas de ouro, carbono, poliestireno, lipossomos encapsulados desidratados, látex ou cristais submicrométricos de elementos raros (*upconverting phosphor* – UCP) capaz de gerar uma reação colorimétrica. A extremidade da fita, onde encontra-se o anticorpo de detecção, é então inserida na amostra em solução. Finalmente, este anticorpo, a proteína alvo e o complexo anticorpo de detecção – proteína alvo migram por capilaridade até a outra extremidade da fita, que contém duas zonas de captura, uma específica para o anticorpo de detecção e a outra específica para a proteína alvo. O resultado positivo é indicado pela presença de duas bandas coloridas, visto que a presença de uma banda colorida indica que o teste foi realizado corretamente, porém negativo (CONCEIÇÃO, 2006).

6.3.2 Extração e quantificação de proteínas totais

O protocolo de extração das proteínas totais utilizado neste trabalho foi baseado naquele de Carpentier et al. (2005) com modificações, como a utilização de tampão de fenol saturado com Tris-HCl pH 7,4 (Invitrogen) na extração das proteínas, e adaptações para compatibilidade da técnica 2D- DIGE. O material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido até sua total pulverização. Foi adicionado então 10 ml de tampão de extração contendo Tris-HCl pH 8,8 (50 mM), EDTA (50 mM), Sacarose (30% m/v), KCl (100 mM), PMSF (1 mM) e DTT (1% m/v); agitando por 30 min a temperatura de 10°C. Posteriormente, adicionou-se 10 ml do tampão fenol saturado com Tris- HCl (Invitrogen) e agitou-se por mais 30 min. Este extrato foi então centrifugado a 12000 g a 4°C por 30 min. O sobrenadante foi retirado e novamente extraído com tampão de extração repetindo-se os passos de agitação e centrifugação. Após a segunda retirada do

sobrenadante, o extrato foi precipitado com quatro volumes de acetato de amônio em metanol (0,1 M) *overnight*. O precipitado foi centrifugado a 12000g a 4°C por 30 min, o sobrenadante descartado e o pellet seco em concentrador rotativo a vácuo por 5 min. A amostra foi então solubilizada em tampão uréia/tioureia contendo uréia (7 M), tioureia (2 M), Tris-base (30 mM) e CHAPS (4% m/v).

As amostras solubilizadas foram quantificadas através do *kit* de quantificação 2D QuantKit (*GE Healthcare*) que é compatível com diversos reagentes utilizados tanto na preparação das amostras quanto na sua solubilização. O ensaio é baseado na precipitação de proteínas e na ligação específica de íons de cobre à proteína, deixando contaminantes e interferentes na solução. O que é medido então são os íons cobre não ligados às proteínas, ou seja, quanto menor o valor da absorbância maior a concentração de proteínas existente na amostra. Foram realizadas triplicatas de cada amostra e leituras realizadas em espectrofotômetro Modelo SF200ADV-LGS53 (*Bel Engineering*), juntamente com a curva padrão a partir de amostras com concentração conhecida de albumina sérica bovina (BSA) para determinação da equação da reta e cálculo da quantidade de proteína total extraída. Foram utilizados 80 ug de proteínas totais para a realização das análises, para tanto, as amostras foram normalizadas com o volume necessário.

6.3.3 Eletroforese diferencial em gel bidimensional com marcação fluorescente (2D-DIGE)

As metodologias aplicadas à técnica da eletroforese bidimensional com marcação fluorescente (2D-DIGE) são modificações daquelas propostas pelo fabricante dos equipamentos pertencentes à plataforma instalada no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal. A plataforma de equipamentos e os reagentes utilizados pertencem a empresa fabricante *GE Healthcare*. Esta é uma recente metodologia baseada na marcação de proteínas com fluoróforos antes da eletroforese bidimensional, permitindo a corrida de até três amostras diferentes em um mesmo gel, sendo uma delas correspondente ao padrão interno comum a todos os géis do experimento.

Alíquotas contendo 80 µg de proteínas totais extraídas de cada amostra vegetal foram marcadas com os corantes *CyDye DIGE Fluors*. A reconstituição dos corantes foi feita seguindo as recomendações do fabricante. Os corantes Cy2, Cy3 e Cy5 foram então misturados as amostras de proteínas, de modo que cada 80µg de proteínas sejam marcados com 400 pmol do corante selecionado. As amostras (padrão interno marcado com Cy2 e duas amostras marcadas com Cy3 e Cy5) foram misturadas e, então, adicionadas em aproximadamente 200 µl de solução de reidratação contendo uréia (7 M), tiouréia (2 M), triton x-100 (2% m/v), IPG buffer pH 4-7 (0,5% v/v) e azul de bromofenol (1% m/v), totalizando um volume final de 250 µl. As amostras foram aplicadas em tiras de gel com gradiente de pH imobilizado (*Immobiline™ DryStrip* GE) com 13 cm e pH 4-7 com escala linear de separação; mantidas *overnight* a 20°C em um equipamento que possui 12 canaletas, *Immobiline™ DryStrip Reswelling Tray* (GE). Após a reidratação das tiras, estas foram submetidas à focalização isoeletrica em equipamento *Ettan™ IPGphor™ 3* (GE), para separação das proteínas pelo ponto isoeletrico (pI).

Após a focalização, as tiras contendo as amostras foram submetidas a um banho com tampão de equilíbrio contendo Tris-HCl (50 mM), uréia (6 M), glicerol (30% v/v), SDS (2% m/v), azul de bromofenol (0,002% m/v) e DTT (125 mM) por 15 min para redução das proteínas focalizadas. Posteriormente, realizou-se um segundo banho com o mesmo tampão, desta vez contendo iodoacetamida (125 mM) ao invés de DTT para que as proteínas reduzidas sejam alquiladas. Este procedimento de equilíbrio é feito com o objetivo de reduzir as pontes dissulfeto das proteínas seguida da alquilação, prevenindo assim a formação errônea de pontes de dissulfeto durante a focalização isoeletrica, que podem gerar inclusive clivagem nas ligações peptídicas por comprometer resíduos de alanina (SMEJKAL et al., 2005).

Em seguida, foi realizada a eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (12% m/v), de 1,5 mm de espessura, contendo Tris-HCl 45 (0,6 M pH 8,8), Acrilamida (12% m/v), Bisacrilamida (0,3% m/v), SDS (10% m/v), Persulfato de amônio (10% m/v) e Temed (0,04% v/v), utilizando um sistema de eletroforese vertical *Ettan™ DALTsix* (GE) conforme as recomendações do fabricante (12 mA/gel, 150V e 2 W/gel). O marcador de peso molecular

utilizado possui 10 bandas que variam de 250 a 10 kDa (*Precision Plus Protein Unstained Standard Bio-Rad*).

Finalmente, a imagem dos géis foi obtida a partir da digitalização em um *scanner* específico para detectar a fluorescência das amostras e o padrão interno (*FujiFilm FLA-9000 Starion*), no Laboratório Central de Biologia Molecular Estrutural da UFSC (CEBIME – UFSC). A partir das imagens obtidas dos géis, estas foram analisadas com o programa *ImageMaster 2D Platinum7 DIGE* (*GE Healthcare*), otimizado para explorar os benefícios do padrão interno utilizado na técnica DIGE, bem como a comparação múltipla entre géis.

6.4 Quantificação de fitormônios e compostos derivados

A análise quantitativa de fitormônios em folha foi realizada nos laboratórios do Centro de Metabolômica, Departamento de Bioquímica da *North-West University* (Campus Potchefstroom – África do Sul).

A quantificação dos fitormônios foi feita a partir da técnica por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (HPLC-ESI-MS/MS), com monitoramento de reação múltipla, conforme proposto por Pan et al. (2010). Foram quantificados sete fitormônios, derivativos de fitormônios e compostos relacionados, pertencentes as principais classes envolvidas em rotas metabólicas relacionadas a defesa da planta em situações de estresse abiótico: Ácidos salicílico (SA); Ácido jasmônico (JA); Metil Jasmonato (MeJA); Ácido abscísico (ABA); Ácido Indolacético (AIA); Giberelina (GA₃); Ácido Cinâmico (CA). Todos os reagentes e os padrões internos de cada fitormônio selecionado para quantificação foram adquiridos do representante da empresa *Sigma Aldrich* na África do Sul.

Para tanto, foram utilizados para extração dos fitormônios três pools contendo quatro amostras biológicas de cada um dos dez tratamentos que compõem os dois ensaios existentes. Cada pool foi representado por 40 mg de tecido foliar das quatro plantas (10 mg cada) que compõem as unidades experimentais dos tratamentos.

Para extração dos fitormônios, cada pool representado por 40 mg de tecido foliar liofilizado foi macerado em nitrogênio líquido até sua total pulverização. Adicionou-se então 500 µl de solução de extração composto por isopropanol/H₂O/HCl concentrado (2:1:0,002, vol/vol/vol) em cada tubo. Em seguida, os tubos foram colocados em agitação na velocidade de 100 rpm por 30 min a 4 °C. É importante que se mantenha a temperatura controlada a 4 °C durante esta etapa devido a instabilidade dos fitormônios. Após agitação, adicionou-se 1 ml do solvente Diclorometano em cada tubo, e 10 µl de 2-acetamidophenol (10 ppm) como padrão interno da corrida, então estes foram agitados novamente por mais 30 min na mesma velocidade e temperatura descritas anteriormente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a uma velocidade 13.000 g por 5 min e a 4 °C. Após a centrifugação, transferiu-se 900 µl do solvente presente na fase inferior com o auxílio de uma pipeta de pasteur para um novo tubo. A mistura recuperada foi então concentrada, não secando completamente, com a utilização de um evaporador com fluxo de nitrogênio. Após concentradas, as amostras foram dissolvidas em 100 µl de metanol. A partir deste passo, as amostras permaneceram estocadas a -20 °C até o momento da análise.

Foi utilizado um cromatógrafo líquido Agilent 1290 acoplado a um triplo-quadro espectrômetro de massa Agilent 6460 para a realização das análises. Foram injetados 30 µl de cada amostra em uma coluna Agilent Zorbax Eclipse plus C18 (2.1 x 100 mm, 1.8 µm) para a realização da cromatografia. A separação cromatográfica iniciou com 5% de solvente B (metanol) e 95% de solvente A (água e ácido fórmico 0,1%). A percentagem de B foi aumentada para 90% durante os primeiros 7 min. Entre 7 a 9 min, o solvente B foi mantido a 90% e, após 9 min este foi diminuído para atingir os 5% de solvente B em 12 min. Utilizou-se um "pós run" de 4 min para garantir o reequilíbrio da coluna. Utilizou-se um fluxo constante de 0,2 ml / min e a temperatura da coluna utilizada foi de 50 °C.

A fonte da ESI (ionização por eletrospray) com tecnologia Agilent Jet Stream foi definida em ambas as ionizações positiva ou negativa para cada um dos dois métodos utilizados. A temperatura do gás de 325 ° C, fluxo de gás de 10 L / min e pressão do nebulizador de 45 psi foram utilizados em ambos os métodos. O monitoramento de múltiplas reações (MMR) de cada composto foi otimizado para que os valores de quantificação sejam mais robustos (Tabela 1).

Tabela 1. Dados para otimização do monitoramento de múltiplas reações para cada composto analisado em HPLC-ESI-MS/MS.

Nome	Modo de Ionização	Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	Fragmentor (V)	CE (V)
Ácido Jasmônico Metil Ester (MeJA)	+	225.1	151	75	4
Ácido Cinâmico (CA)	-	147	103	84	4
Ácido Giberélico (GA3)	-	345	143	110	16
Ácido Indolacético (IAA)	-	174	130	62	4
Ácido Salicílico (SA)	-	137	93	80	12
Ácido Abscísico (ABA)	-	263	153	90	0
Ácido Jasmônico(JA)	+	209	59	82	4
2-acetamidophenol (Padrão interno)	+ ou -	152(+) 150(-)	110(+) 108(-)	72(+) 67(-)	8(+) 8(-)

6.5 Análise da concentração de lignina em folha

Toda etapa de extração e análise quantitativa de lignina em folha foi realizada nas dependências do Laboratório de Enzimologia, Departamento de Microbiologia da *North-West University* (Campus Potchefstroom – África do Sul).

Para a quantificação de lignina nos tecidos foliares coletados, inicialmente as amostras de tecidos vegetais foram secas por 6 h em concentrador *Speedvac*. Deste material seco, 30 mg foram pesados, macerados com areia purificada para análises (*Merck*) e transferidos para microtubo de 2 mL. Este material foi homogeneizado com 1,5 mL de metanol 80% e permaneceu sob agitação por 15 h em agitador rotativo, protegido da luz e em temperatura ambiente. Um volume de 1,5 mL de água destilada foi adicionado ao resíduo precipitado, homogeneizado e centrifugado a 12.000 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o resíduo seco a 65 °C durante a noite. O resíduo seco insolúvel em álcool foi utilizado para determinação de lignina, de acordo com metodologia proposta por Barber & Ride (1988). Um volume de 1,5 mL de solução contendo ácido tioglicólico e HCl 2M (proporção de 1:10) foi adicionado ao resíduo seco. Os microtubos foram agitados

suavemente para hidratar o resíduo e então colocados em banho-maria a 100°C por 4 h. Após este procedimento, os tubos foram mantidos em gelo por 10 min e em seguida centrifugados a 12.000 *g* por 10 min, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com 1,5 mL de água destilada deionizada e novamente centrifugado a 10.000 *g* por 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado resuspenso em 1,5 mL de NaOH 0,5 M, sendo a mistura agitada em agitador rotativo *overnight* a temperatura ambiente. No dia seguinte a mistura foi centrifugada a 10.000 *g* por 10 min e o sobrenadante transferido para um novo microtubo. Foi então adicionado 200 µl de HCl concentrado ao sobrenadante e mantido na geladeira (4 °C) por 4 h para permitir a precipitação da lignina ligada ao ácido tioglicólico. Após, a mistura foi centrifugada a 10.000 *g* por 10 min, o sobrenadante descartado e o precipitado resuspenso em 2 mL de NaOH 0,5 M. A absorbância desta solução foi determinada a 280 nm e os valores calculados com base na curva de Lignina Alcalina padrão (*Sigma-Aldrich*), sendo expresso em µg de LTGA (derivados da lignina-ácido tioglicólico) por g de massa fresca.

Para análise quantitativa de lignina em folha também foram utilizados três pools biológicos de cada tratamento, e a partir destas foram feitas três extrações e leituras de absorbância, representando três replicatas técnicas.

6.6 Análises estatísticas

Os dados provenientes da análise de proteômica comparativa DIGE foram analisados no software de análise das imagens dos géis bidimensionais *ImageMaster 2D Platinum 7 DIGE* (GE Healthcare) a partir de análise de variância (ANOVA). Os *spots* considerados diferenciais entre tratamentos foram aqueles exclusivos a um dos tratamentos comparados, ou aqueles que estão presentes em ambos, porém apresentam diferença quantitativa significativa na sua expressão. O fator de regulação para determinação de *spots* diferenciais foi considerado como sendo $\geq 1,5$ ou 50% de variação na expressão (*fold of variation*: 1,5), conforme indicado pelo software de análise de imagens. Quando o teste estatístico F da ANOVA revelou significância estatística ao nível de 0,05%

de probabilidade quanto a sua expressão (volume e intensidade), o *spot* foi considerado diferencial entre os tratamentos.

Para a análise quantitativa de lignina, também foi empregada à análise de variância (ANOVA) os valores médios das replicatas técnicas de cada amostra biológica. Quando o F-teste foi significativo ao nível de 5% de probabilidade, foi empregado teste de separação de médias SNK a fim de verificar quais tratamentos se diferenciam com relação as variáveis analisadas.

Os resultados obtidos na análise de fitormônio foram submetidos a ANOVA da mesma forma, porém neste caso quando o F-teste revelou significância ao nível de 1% de probabilidade foi empregado o teste de separação de médias SNK. Este critério foi tomado com base nos estudos que utilizam a mesma técnica para quantificação de fitormônios, compostos estes que apresentam considerada variação entre as amostras biológicas (diferentes indivíduos).

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Análise Proteômica

7.1.1 Imunodeteção da proteína transgênica CP4 EPSPS

A partir do uso das fitas de imunodeteção foi confirmada a presença da proteína transgênica no híbrido DKB 245 RR e o resultado negativo para o híbrido não-transgênico DKB 245 (Figura 7). As duas bandas presentes na fita indicam o resultado positivo para a proteína CP4 EPSPS, sendo a primeira banda (à esquerda) controle dessa proteína e a segunda banda (à direita) o resultado da reação. A existência de apenas uma banda indica que o teste funcionou corretamente, mas o resultado é negativo para a presença da proteína CP4 EPSPS, conforme ocorreu para o híbrido convencional.



Figura 7. Fitas com o resultado do teste de imunodeteção para a proteína transgênica CP4 EPSPS evento NK603. Fita superior correspondente ao híbrido convencional DKB 245; fita inferior correspondente ao híbrido transgênico DKB 245 RR.

7.1.2 Quantificação das proteínas totais e determinação do perfil proteico

Existem diversas metodologias de princípios diferenciados para quantificação de proteínas totais, onde em sua maioria esta é calculada através de leituras de absorvância em espectrofotômetro (LOWRY et al., 1951; BRADFORD, 1976 e SMITH et al., 1985).

O método de Bradford, baseado na ligação de grupos funcionais básicos ou anéis aromáticos das proteínas ao corante Comassie Brilliant Blue G250, é o mais utilizado. Apesar de ser muito utilizado, este método limita-se a amplitude de concentração proteica entre 5 e 50 $\mu\text{g}/\text{ul}$ na solução e, além disso, pode estimar erroneamente a quantidade de proteínas totais quando reagentes interferentes (ex.: CHAPS e SDS) presentes na solução também ligam-se ao corante (NEUHOFF et al., 1988). Sendo assim, para evitar supostos erros na estimativa da quantidade dos extratos de proteínas totais, utilizou-se o método do 2D Quant-kit (GE), que é compatível tanto com grande amplitude de concentrações quanto com os reagentes utilizados nas análises de eletroforese bidimensional. A quantificação foi realizada nos extratos proteicos de todos os tratamentos que compõem os dois ensaios propostos.

As leituras foram feitas em duplicatas do extrato proteico de cada pool biológico extraído, conforme recomendações do fabricante do kit utilizado. A partir do métodos utilizado obteve-se em média $4,44 \pm 0,14$ mg proteínas/g de massa fresca (MF), o que se considera uma quantidade suficiente para a realização dos géis bidimensionais DIGE. Não houve diferença significativa ($P < 0,05$) na concentração média de proteínas entre os tratamentos que compõem os mesmos ensaios, assim como não houve diferença significativa entre as médias da concentração de proteínas entre ensaios (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração média de proteínas totais em folhas do milho transgênico (DKB 245 RR) e sua isolinha convencional (DKB 245) sob diferentes condições de cultivo.

Ensaio	Tratamentos	Proteínas totais (mg.g⁻¹ de MF)	ANOVA (p)
Ensaio sem herbicida			
Casa de Vegetação	CCONT	4,62 ± 0,43	
	TCONT	4,54 ± 0,26	
	CSECA	4,53 ± 0,18	
	TSECA	4,49 ± 0,04	
Câmara de Crescimento	CCONT	4,57 ± 0,39	
	TCONT	4,26 ± 0,44	
	CSECA	4,19 ± 0,32	
	TSECA	4,43 ± 0,13	
Ensaio com herbicida			
	TSECA	4,52 ± 0,04	
	TSECA RR	4,31 ± 0,14	
Média Geral		4,44 ± 0,14	0,6479

CCONT = convencional sob rega controle; TCONT = transgênico sob rega controle; CSECA = convencional sob seca; TSECA = transgênico sob seca; TSECA RR = transgênico sob seca com aplicação de herbicida.

O número de *spots* em um gel bidimensional de proteínas é um dos componentes mais importantes para uma análise de proteômica comparativa, isto porque, quanto maior a quantidade de *spots* presentes nos géis de cada tratamento mais eficiente será a comparação entre estes.

Sendo assim, calculou-se a quantidade média de *spots* detectados para cada amostra biológica dos tratamentos. A partir dos valores de número médio de *spots* realizou-se uma análise de variância (ANOVA). O número médio de *spots* detectados foi 657, o que se considera uma quantidade aceitável para análise comparativa em géis 2D-DIGE. Não houve diferença significativa ($P < 0,05$) quanto ao número de *spots* detectados entre os tratamentos que compõem os dois ensaios (Tabela 3).

Tabela 3. Número médio de *spots* detectados em géis 2D-DIGE do milho transgênico (DKB 245 RR) e sua isolinha convencional (DKB 245) sob diferentes condições de cultivo.

Ensaio	Tratamentos	Número de <i>spots</i> detectados	ANOVA (p)
Ensaio sem herbicida			
Casa de Vegetação	CCONT	764 ± 45	
	TCONT	789 ± 135	
	CSECA	509 ± 93	
	TSECA	623 ± 36	
Câmara de Crescimento	CCONT	591 ± 207	
	TCONT	681 ± 105	
	CSECA	579 ± 170	
	TSECA	708 ± 16	
Ensaio com herbicida			
	TSECA	623 ± 36	
	TSECA RR	668 ± 73	
Média Geral		657 ± 90	0,6848

CCONT = convencional sob rega controle; TCONT = transgênico sob rega controle; CSECA = convencional sob seca; TSECA = transgênico sob seca; TSECA RR = transgênico sob seca com aplicação de herbicida.

7.1.3 Análise proteômica comparativa DIGE

Conforme mencionado anteriormente, foi utilizado o software ImageMaster 2D Platinum DIGE (GE Healthcare) para a realização das análises comparativas entre as imagens dos géis referentes aos diferentes tratamentos corados com os fluoróforos Cy2, Cy3 e Cy5. O software utiliza como base na análise um algoritmo de co-deteccção que é capaz de detectar simultaneamente *spots* protéicos marcados em diferentes imagens que estão presentes em um mesmo gel. Sendo assim, esta co-deteccção aumenta significativamente a precisão do estudo proteômico comparativo quando

comparado aos métodos tradicionais 2D-PAGE corados com *Comassie Brilliant Blue*, em que não é possível a corrida de diferentes tratamentos no mesmo gel 2D, aumentando assim o erro experimental oriundo da variação entre os diferentes géis (replicatas técnicas).

Foi realizada uma estratégia de desenho experimental específico para a realização das corridas dos géis 2D-DIGE. Conforme mencionado foram obtidos extratos protéicos de três *pools* biológicos por tratamento, o que resultou na realização de 15 géis 2D DIGE (30 imagens diferentes). Conforme recomendado pelo fabricante do *Kit CyDye DIGE Fluor* (GE Healthcare) foi realizado um sorteio entre as 30 amostras para definir quais amostras seriam corridas no mesmo gel 2D-DIGE, já que esta técnica permite a corrida de duas amostras diferentes mais a amostra padrão em cada gel.

Sendo assim, após a obtenção das diferentes imagens que representam as 30 diferentes amostras, realizou-se a análise comparativa entre os diferentes tratamentos que compõem os ensaios. Ressalta-se que o *spot* foi considerado diferencialmente expresso quando o teste estatístico F da ANOVA revelou significância estatística ao nível de 0,05% de probabilidade. Vale ressaltar também que os *spots* considerados diferenciais entre tratamentos comparados são aqueles exclusivos a um dos tratamentos, ou aqueles que estão presentes em ambos tratamentos comparados, porém apresentam diferença quantitativa na sua expressão. A diferença de expressão foi considerada quando a porcentagem de volume foi pelo menos uma vez e meio maior ou menor entre os tratamentos (*fold change*: 1,5).

Inicialmente, foi realizada a análise comparativa entre os tratamentos que compõem o primeiro ensaio, dentro de cada ambiente (Casa de Vegetação e Câmara de Crescimento), levando em consideração os fatores Transgenia (T) e Estresse (E) (Tabela 4). Esta análise comparativa objetiva responder a pergunta sobre existência ou não da diferença de expressão proteica entre os híbridos transgênico e convencional submetidos ou não a situação de estresse por déficit hídrico. Como resposta, foram detectados 59 *spots* diferencialmente expressos nas distintas análises comparativas considerando os fatores T e E.

Com relação as análises comparativas dos tratamentos que compõem o fator Transgenia, foram detectados o total de 31 *spots* diferenciais nos dois ambientes. Deste total, 24 *spots* diferencialmente expressos entre os híbridos

Convencional e Transgênico fazem parte do ambiente Casa de Vegetação (cv). Dentre estes, 11 foram detectados como diferencialmente expressos entre os tratamentos CCONT e TCONT, ou seja, plantas convencionais e transgênicas em condições normais cultivo (sem aplicação de déficit hídrico). Os outros 13 *spots* detectados pertencem a comparação entre os tratamentos CSECA e TSECA. Para os tratamentos cultivados em Câmara de Crescimento (cc), detectou-se o total de 7 *spots* com diferença significativa na expressão, sendo 6 destes provenientes da análise comparativa entre os tratamentos CCONT e TCONT. Um *spot* foi detectado como de expressão diferencial significativa na comparação entre os tratamentos CSECA e TSECA na Câmara de Crescimento. Acredita-se que esta baixa quantidade de *spots* detectados pode estar relacionado com a baixa resolução dos géis utilizados nesta comparação específica, e assim gerando conseqüente baixo número de *spots* detectados.

Estes resultados demonstram que em situação normal de cultivo, independente de serem cultivadas em um ambiente com condições ambientais controladas ou variáveis, existem proteínas que variam sua expressão entre a variedade de milho transformada NK603 e sua isolinha mais próxima convencional. Mais especificamente, nos dois ambientes, a maioria das proteínas diferenciais (15 de 17 *spots*) apresentou maior expressão nos tratamentos em que a variedade transgênica foi usada.

Tal evento pode ser explicado por alguns fatores importantes que devem ser discutidos. Primeiramente, estes resultados podem ser explicados pelos efeitos pleiotrópicos causados pela interação de diversos genes endógenos e as sequências exógenas inseridas na planta transformada. Além disso, outra hipótese seria a fragmentação de uma ou mais cópias do transgene inserido, ligando-se a outras sequências endógenas da planta e, conseqüentemente, interferindo no aumento da transcrição destes genes. É possível também que haja aumento da transcrição e, conseqüente tradução de uma ou outra proteína, as quais podem ser importantes enzimas que estejam envolvidas no processo de regulação da síntese de outras proteínas que, conseqüentemente, serão afetadas em um efeito cascata. Já é comum o fato de que a transferência e a inserção de transgenes no genoma, para todos principais métodos, se constituem em processo aleatório, podendo provocar alterações físicas no genoma (ex.: mutação por inserção) ou na regulação gênica (ex.: efeitos

pleiotrópicos), ativação ou inativação de genes endógenos, e ainda provocar silenciamento gênico (SOMERS & MAKAREVITCH, 2004; CONNER & JACOBS, 1999). Sendo assim, é importante considerar o fato de que devido a este processo de inserção aleatória e incontrolada do número de cópias ou fragmentos do transgene, estes podem interferir diretamente alguns locos gênicos não-alvo. Um exemplo desta interferência em locos gênicos endógenos seria a alteração na regulação de sequências a jusante a sequência inserida, causada pelo promotor P35S presente no segundo cassete de expressão que compõe o inserto do evento NK603. Já está cientificamente estabelecido que o P35S é considerado um promotor constitutivo forte, gerando altos níveis de expressão em plantas (COVEY et al., 1981; GUILLEY et al., 1982).

Além disso, os resultados também demonstram que em situação de estresse por déficit hídrico, também existe diferença significativa na expressão de algumas proteínas entre as variedades transgênicas e não-transgênicas independentemente do ambiente em que as plantas foram cultivadas. Porém, nesta comparação, a maioria das proteínas diferenciais apresentaram superexpressão nos tratamentos das plantas convencionais (CSECA). Sendo assim, ao contrário do que ocorreu na comparação entre as plantas transgênicas e convencionais em situação normal de cultivo, em situação de estresse por déficit hídrico foram as plantas convencionais que tiveram a maior expressão das proteínas diferenciais. Apesar de ainda não terem sido sequenciadas tais proteínas, é possível hipotetizar que grande quantidade de proteínas que estão ligadas ao sistema de defesa da planta sejam superexpressas em situações de estresse hídrico, como já constatado em diversos estudos realizados anteriormente (BOGEAT-TRIBOULOT et al., 2007; ZHU et al., 2007; RICCARDI et al., 1999; KIYOSUE et al., 1994).

Em relação às análises comparativas que compõem o fator Estresse, foram detectados o total de 28 *spots* diferencialmente expressos nos dois ambientes. Nas comparações CCONT x CSECA dos dois ambientes (Casa de vegetação e Câmara de Crescimento) a maioria das proteínas diferenciais foram mais expressas no tratamento submetido ao estresse (CSECA). Já nas análises comparativas dos tratamentos TCONT x TSECA em dois ambientes,

ocorreu o contrário, ou seja, a maioria das proteínas superexpressas foram presentes nos tratamentos não submetidos ao estresse hídrico (TCONT).

Cientificamente, o estresse por déficit hídrico está relacionado com a redução da disponibilidade de água e a desidratação celular. Desta forma, ocorrem mudanças no metabolismo das plantas associadas ao ajustamento osmótico ou a homeostase. É também conhecido o fato de que o estresse por déficit hídrico induz a síntese de proteínas que não estão relacionadas diretamente com o estresse, mas sim com o dano celular causado por este. Sendo assim, diferentes classes de proteínas são expressas, como as proteínas de choque térmico ou chaperonas (KIYOSUE et al., 1994), inibidoras de proteases (DOWNING et al., 1992), proteases de cisteína (WILLIAMS et al., 1994) e osmotinas (KONONOWICZ et al., 1993). Bogeat-Triboulot et al. (2007), por exemplo, estudaram as mudanças no transcriptoma e proteoma de *Populus euphratica* em situação de estresse hídrico e encontraram grande aumento na expressão de proteínas relacionadas a fotossíntese e ao metabolismo do carbono, como por exemplo ATP sintetase, ATPase, Rubisco activase, e proteínas envolvidas na glicólise como GAPDH e PGK.

Cientificamente, também já é admitido que a redução da absorção de água pelas raízes gera um efeito direto no crescimento das plantas baseado no alongamento da célula vegetal como consequência do alongamento da parede celular devido a situação de déficit hídrico. No estudo comparativo do proteoma de raízes de milho submetidos a condição de estresse hídrico, Zhu et al. (2007) encontraram um aumento na expressão de enzimas peroxidases apoplásticas que eliminam e impedem a formação de novas espécies reativas de oxigênio (ERO), que contribuem para o alongamento da parede celular em situação de desidratação. Os autores também encontraram aumento na expressão de outras proteínas envolvidas na defesa ao estresse, como proteínas inibidoras de poligalacturonases, quitinases e osmotinas. No mesmo trabalho os autores reportam ainda a abundância na expressão de β -D-glicosidases, enzimas que participam na clivagem do ácido abscísico (ABA) a partir de conjugados de sacarídeos, que é conhecido como pré-requisito para atividade do ABA.

Tabela 4. Número de *spots* detectados como diferencialmente expressos entre os tratamentos que compõem o Ensaio sem herbicida.

Ensaio sem herbicida	Comparação	Número de <i>spots</i> diferenciais ($p < 0,05$)	<i>Spots</i> mais expressos por tratamento
Casa de Vegetação	CCONT x TCONT	11	C (2); T (9)
	CSECA x TSECA	13	CS (11); TS (2)
	CCONT x CSECA	7	C (2); CS (5)
	TCONT x TSECA	15	T (13); TS (2)
Câmara de Crescimento	CCONT x TCONT	6	C (0); T (6)
	CSECA x TSECA	1	CS (0); TS (1)
	CCONT x CSECA	3	C (1); CS (2)
	TCONT x TSECA	3	T (3); TS (0)
Total		59	

CCONT = convencional sob rega controle; TCONT = transgênico sob rega controle; CSECA = convencional sob seca; TSECA = transgênico sob seca; TSECA RR = transgênico sob seca com aplicação de herbicida.

A segunda análise comparativa realizada foi também com relação ao primeiro ensaio, mas agora considerando o fator Ambiente, comparando os mesmos tratamentos que foram conduzidos nos diferentes ambientes: Casa de Vegetação (cv) ou Câmara de Crescimento (cc) (Tabela 5). O principal objetivo desta análise foi verificar qual o tamanho ou quanto da variação é explicada pelo ambiente, pois ao contrário do genoma que é constante, o proteoma é extremamente dinâmico e sofre interações dependentes do ciclo celular, da influência ambiental, e do tipo de tecido ou célula em que é traduzida (ZOLLA et al., 2008).

Foram detectados 25 *spots* diferencialmente expressos entre os dois ambientes cv e cc. Quando comparado os números totais de *spots* diferenciais dos três fatores envolvidos no primeiro ensaio (Transgenia, Estresse e Ambiente), estes não apresentaram diferença significativa entre si segundo a ANOVA ($P < 0,05$). Sendo assim, a priori, pode-se concluir que a variação na expressão proteica causada pela modificação genética do evento NK603 não se difere da variação causada pelos diferentes ambientes em que as plantas

são cultivadas e pelo estresse sofrido pelas plantas durante o cultivo. No entanto, apesar das variações entre os fatores não se diferirem significativamente em termos de número total de proteínas que têm sua expressão alterada, as plantas transgênicas respondem diferencialmente com relação a sua linha isogênica quando cultivadas no mesmo ambiente controlado e na mesma situação de cultivo, o que suporta a hipótese do rearranjo no genoma após o processo de modificação genética.

Resultados similares foram encontrados no estudo de Zolla et al. (2008), que objetivou estudar os possíveis efeitos colaterais no proteoma do milho MON810, e constataram que o ambiente tem um efeito maior em mudanças no proteoma do que a inserção do gene exógeno por técnica de biobalística (no que diz respeito ao número total de proteínas diferencialmente expressas). Os autores constataram ainda que isto não torna a modificação genética menos preocupante já que, por exemplo, no mesmo trabalho foi detectada uma importante e conhecida proteína alergênica (50 kDa gama-zeína) no tratamento transgênico em comparação a sua isolinha não-transgênica cultivados no mesmo ambiente controlado. Assim, apesar dos dados relatados por Zolla et al. (2008) revelarem que o efeito ambiental tem maior efeito na expressão das proteínas (em termos de número total de proteínas alteradas) do que a inserção gênica para o evento MON810, as plantas transgênicas respondem diferencialmente com relação a sua linha isogênica quando cultivadas no mesmo ambiente.

Em outro estudo, Agapito-Tenfen et al. (2013) avaliaram a expressão de proteínas totais de um híbrido transgênico (evento MON810) e sua isolinha convencional mais próxima em diferentes agroecossistemas. Inicialmente, os autores verificaram que o principal fator responsável pela variação no proteoma eram os diferentes ambientes em que foram cultivadas as plantas. Contudo, uma análise comparativa dentro de cada ambiente revelou um total de 32 proteínas diferencialmente expressas entre as plantas transgênicas e convencionais, as quais foram identificadas e suas funções biológicas foram atribuídas principalmente ao metabolismo energético, processamento de informação genética e resposta a estresse.

Tabela 5. Número de *spots* detectados como diferencialmente expressos entre os tratamentos implantados nos diferentes ambientes que compõem o Ensaio sem herbicida.

Ensaio sem herbicida	Comparação	Número de <i>spots</i> diferenciais ($p < 0,05$)	<i>Spots</i> mais expressos por tratamento
Convencional	CCONT cv x CCONT cc	2	C cv (0); C cc (2)
	CSECA cv x CSECA cc	7	CS cv (6); CS cc (1)
Transgênico	TCONT cv x TCONT cc	10	T cv (7); T cc (3)
	TSECA cv x TSECA cc	6	TS cv (3); TS cc (3)
Total		25	

CCONT = convencional sob rega controle; TCONT = transgênico sob rega controle; CSECA = convencional sob seca; TSECA = transgênico sob seca; cv = ambiente casa de vegetação; cc = ambiente câmara de crescimento.

A última análise comparativa foi entre os dois tratamentos que compõem o ensaio com herbicida. Esta análise tem o intuito de verificar se a aplicação do herbicida interfere na expressão proteica do híbrido transgênico em situação de estresse por déficit hídrico. O resultado da comparação entre estes tratamentos mostrou que foram detectados 5 *spots* diferencialmente expressos, sendo que 4 destes apresentaram maior expressão no tratamento transgênico sob déficit hídrico com aplicação de herbicida (TSECA RR) (Tabela 6). Foi também detectado um *spot* exclusivo para o tratamento TSECA. Na análise das proteínas no tratamento TCONT do ambiente Casa de Vegetação do primeiro ensaio, onde também foi conduzido este segundo ensaio com aplicação de herbicida no mesmo momento, constatou-se que algumas das proteínas teve sua expressão aumentada (ex.: *spot* ID 98) ou diminuída (ex.: *spot* ID 258) na ordem dos tratamentos TCONT cv, TSECA e TSECA RR (Figura 8). Sendo assim, apesar de ainda não sequenciadas e identificadas, sugere-se que estas proteínas podem estar envolvidas em sistemas de defesa da planta como desintoxicação.

Zhang & Riechers (2004) estudaram mudanças no proteoma de coleótilos de *Triticum tauschii*, tratados com aplicações do herbicida safener fluxofenim, e reportaram variação na expressão de 15 proteínas pertencentes a família GST (glutathione s-transferase) envolvidas na desintoxicação de

xenobióticos através da conjugação com glutatona. Estes resultados indicam que a aplicação do herbicida induz a resposta da planta para desintoxicação deste através de mecanismos da via glutatona.

Tabela 6. Número de *spots* detectados como diferencialmente expressos entre os tratamentos que compõem o Ensaio com herbicida.

Comparações	Número de <i>spots</i> diferenciais ($p < 0,05$)	<i>Spots</i> mais expressos por tratamento
TSECA x TSECA RR	5	TSECA (1); TSECA RR (4)
Exclusivo TSECA	1	
Exclusivo TSECA RR	0	
Total	5	

TSECA = transgênico sob seca; TSECA RR = transgênico sob seca com aplicação de herbicida.

Com relação ao *spot* detectado como exclusivo ao tratamento TS, este resultado nos leva a entender que houve um silenciamento do gene responsável pela transcrição desta proteína em consequência da aplicação sequencial do herbicida. É importante ressaltar que este *spot* foi determinado como exclusivo ao tratamento TS nesta comparação, pois não foi encontrado o mesmo em nenhum dos géis que compõem o tratamento TSRR. As proteínas que foram consideradas como ausentes na amostra, são aquelas que não foram detectados pelo software de análise por não estarem presentes na amostra ou estar abaixo do limite de detecção de 1 ng da técnica utilizada neste estudo.

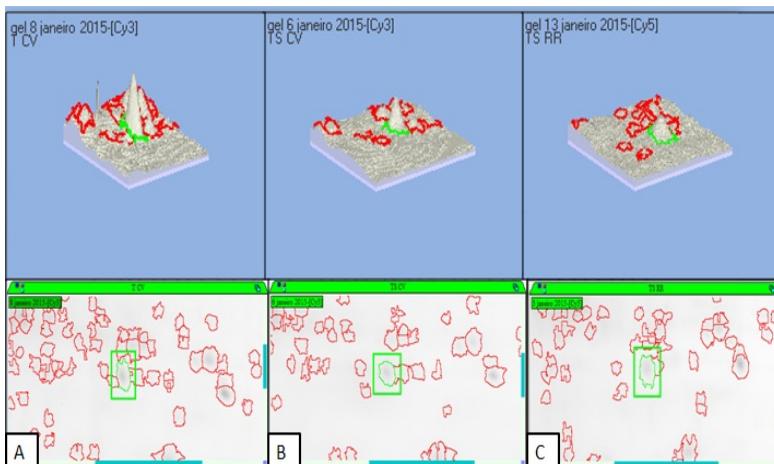


Figura 8. Imagem ampliada do spot ID 258 (abaixo), de expressão diferencial decrescente entre os tratamentos TCONT cv, TSECA e TSECA RR, e sua visualização 3D (acima). A = tratamento TCONT cv; B = tratamento TSECA; C = tratamento TSECA RR.

7.2 Análise de fitormônios e compostos derivados

Estudos sobre a resposta de plantas a privação de água relatam que há um significativo decréscimo na condutância foliar a partir do sétimo ou oitavo dia de déficit hídrico, o que indica que o estresse hídrico está sendo percebido pela planta (ALVAREZ et al., 2008; GOODGER et al., 2005). Com base nisso, a metodologia de estresse por déficit hídrico aplicada nos ensaios realizados foi de cerca de 15 dias de privação de água para que as plantas respondessem diretamente ao estresse.

Com o objetivo de cumprir os pressupostos da análise de variância (ANOVA), como a normalidade dos dados, aos que foram necessários, os valores obtidos de quantificação foram transformados em logaritmo natural previamente a realização da ANOVA. Entretanto, os valores apresentados nas tabelas, como as médias dos resultados, são os dados primários.

7.2.1. Ácido abscísico (ABA)

Inicialmente, realizou-se a ANOVA para os resultados obtidos na quantificação do conteúdo de ABA dos oito tratamentos que compõem o Ensaio sem herbicida. A análise de variância para esta variável revelou efeito significativo dos fatores “Transgenia” (T) e “Estresse” (E), bem como da interação tripla entre todos os fatores envolvidos (T, E e A) (Tabela 7). Observando os fatores de variação individuais é possível notar que, por mais que a ANOVA tenha revelado efeito significativo para os fatores “Transgenia” e “Estresse”, o quadrado médio (QM) do fator “Estresse” foi cerca de cinco vezes maior do que o QM do fator “Transgenia”. Este resultado pode indicar que o efeito do estresse no conteúdo de ABA em folha foi maior do que o efeito causado pela modificação genética. Apesar disto, é fato que a modificação genética, bem como a interação T x E, tiveram efeito significativamente na síntese de ABA.

Tabela 7. Graus de liberdade (GL), quadrado médio (QM), F teste (F) e nível de significância (p) da análise de variância para a variável ABA para os tratamentos que compõem o Ensaio sem herbicida.

Fator de Variação	GL	QM	F	p
Transgenia (T)	1	4,507	21,86**	0,0003
Estresse (E)	1	25,473	123,56**	< 0,0001
Ambiente (A)	1	1,179	5,71 ^{ns}	0,0313
Interações				
Interação T*E	1	10,106	49,02**	< 0,0001
Interação T*A	1	6,732	32,65**	< 0,0001
Interação E*A	1	0,34	1,65 ^{ns}	0,2191
Interação T*E*A	1	3,065	14,86**	0,0017

^{ns}: não significativo;

** : significativo pelo teste F ao nível de 1% de probabilidade.

Como a interação tripla dos fatores sobre o conteúdo de ABA foi significativa (Tabela 7), a análise estatística foi realizada dentro de cada um dos três fatores e os resultados foram plotados em um gráfico para facilitar a visualização dos resultados obtidos (Figura 9). Como era de se esperar, comparando os tratamentos CCONT x CSECA e TCONT x TSECA para os

dois ambientes, ou seja, considerando o fator “Estresse”, três das quatro comparações mostraram que os tratamentos submetidos ao estresse por déficit hídrico possuem significativamente mais conteúdo de ABA em folha do que os tratamentos em condições normais de cultivo. Além disso, constatou-se também que o conteúdo de ABA também variou com os fatores “Transgenia” e o “Ambiente”, sendo que a combinação do tratamento transgênicos cultivados no ambiente Câmara de Crescimento sob condição de déficit hídrico resultou na concentração de ABA no mínimo cinco vezes maior se comparado com os outros tratamentos, o que confirma a interação existente entre estes três fatores envolvidos.

Com relação ao fator “Transgenia”, é possível notar que a modificação genética combinada a situação de estresse hídrico e o cultivo em Casa de Vegetação proporcionou uma maior concentração de ABA do que os outros tratamentos, inclusive se comparado com sua isolinha convencional na mesma situação (Figura 9).

Apesar de outras funções, o papel do ABA como sinalizador de longa distância proveniente dos tecidos radiculares para o fechamento dos estômatos em situação de déficit hídrico é um fator dominante (DAVIES et al., 2005). Também já foi proposto em trabalhos anteriores que a indução ao fechamento dos estômatos como resposta ao estresse por déficit hídrico é resultado da interação entre alguns hormônios, principalmente entre a relação ABA/Zeatina (DODD, 2003). ALVAREZ et al. (2008) analisaram o metaboloma das plantas de milho sob déficit hídrico e reportaram que o conteúdo de ABA aumentou em grande quantidade durante o estresse hídrico. O acúmulo de ABA nas folhas das plantas estressadas se dá em grande parte pela hidrólise do ABA-GE, e a enzima que realiza essa clivagem liberando ABA é a β -D-glicosidase. Zhu et al. (2007) também reportaram o aumento na expressão desta enzima quando compararam o proteoma de raiz de milho sob déficit hídrico e em condições normais de cultivo.

Os resultados obtidos no ensaio com aplicação de herbicida decorrentes do F teste da ANOVA revelaram diferenças significativas entre os dois tratamentos envolvidos ($p < 0,001$). O tratamento sem aplicação de herbicida TSECA apresentou maior teor médio de ABA do que o tratamento TSECA RR que sofreu aplicação de herbicida (Tabela 8). Sendo assim, pode-se concluir

que a aplicação de herbicida diminuiu a concentração de ABA que já era crescente devido a condição de estresse hídrico sofrida pelas plantas durante a aplicação sequencial do herbicida.

Tabela 8. Conteúdo médio de ABA em pg por g de massa seca (pg/g de MS) nas folhas de milho transgênico submetido ao déficit hídrico com ou sem aplicação de herbicida (Ensaio com herbicida).

Tratamentos	ABA (pg/g de MS)
TSECA	2833,53 ± 240 a
TSECA RR	1110,99 ± 90 b
CV%	18,53%

TSECA = transgênico sob seca; TSECA RR = transgênico sob seca com aplicação de herbicida.

Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,01$).

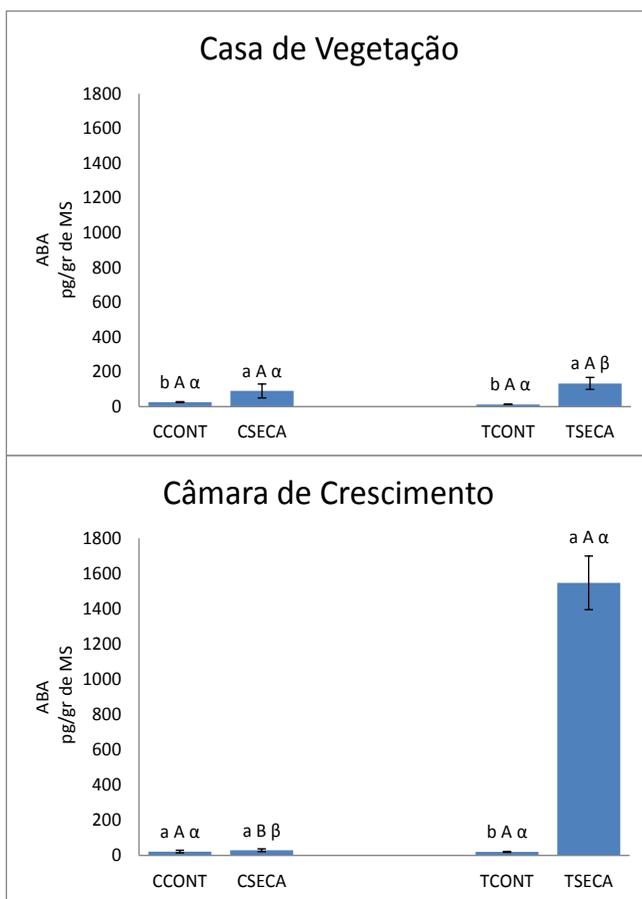


Figura 9. Conteúdo de ABA em pg/gr de Massa Seca (pg/gr de MS) para os tratamentos que compõem o Ensaio sem herbicida. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ($p < 0,01$). Letras minúsculas comparam os tratamentos CCONT x CSECA, TCONT x TSECA dentro de cada ambiente (fator Estresse). Letras maiúsculas comparam os tratamentos CCONT x TCONT, CSECA x TSECA dentro de cada ambiente (fator Transgenia); Letras gregas comparam os mesmos tratamentos entre os dois ambientes diferentes (fator Ambiente).

7.2.2. Ácido indolacético (AIA)

A partir dos resultados do conteúdo de AIA em pg/gr de MS obtidos nos tratamentos do primeiro ensaio, foi realizada a ANOVA que revelou efeito significativo somente para o fator de variação individual “Estresse” (Tabela 9). Sendo assim, podemos inferir que independente da modificação genética e do ambiente em que foi cultivado, os tratamentos submetidos a situação de estresse por déficit hídrico apresentaram em média teores maiores de AIA (16,34 pg/gr de MS) do que os tratamentos em condição normal de cultivo (9,14 pg/gr de MS).

Tabela 9. Graus de liberdade (GL), quadrado médio (QM), F teste (F) e nível de significância (p) da análise de variância para a variável AIA nos tratamentos que compõem o Ensaio sem herbicida.

Fator de Variação	GL	QM	F	p
Transgenia (T)	1	0,521	2,16 ^{ns}	0,1633
Estresse (E)	1	2,026	8,41**	0,0096
Ambiente (A)	1	0,159	0,66 ^{ns}	0,4295
Interações				
Interação T*E	1	0,185	0,76 ^{ns}	0,3957
Interação T*A	1	0,124	0,51 ^{ns}	0,4838
Interação E*A	1	0,748	3,10 ^{ns}	0,0996
Interação T*E*A	1	0,068	0,28 ^{ns}	0,6027

^{ns}: não significativo;

** : significativo pelo teste F ao nível de 1% de probabilidade.

Assim como os resultados obtidos neste trabalho, outros estudos já relataram esta relação do AIA com a adaptação da planta a situação de desidratação. Zhang et al. (2009) relatou que o conteúdo de AIA no tecido foliar da gramínea *Festuca arundinacea* foi positivamente correlacionada com a adaptabilidade da planta a situação de privação de água. Também já foi reportado que o conteúdo de AIA é elevado nas plantas que conseguem se adaptar às condições de estresse por déficit hídrico (PUSTOVOITOVA et al., 2004; SAKURAI et al., 1985). Apesar disso, é notória a grande diferença no conteúdo médio de AIA quando se compara com o conteúdo médio de ABA dos tratamentos em situação de estresse hídrico.

Com relação ao segundo ensaio (Ensaio com herbicida), os resultados também foram submetidos a ANOVA. Segundo a ANOVA, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos TSECA e TSECA RR, o que nos permite concluir que a aplicação de herbicida nas plantas estressadas por déficit hídrico não interferiu no conteúdo de AIA em folha (Tabela 10).

Tabela 10. Conteúdo médio de AIA em pg por g de massa seca (pg/g de MS) nas folhas de milho transgênico submetido ao déficit hídrico com ou sem aplicação de herbicida.

Tratamentos	AIA (pg/g de MS)
TSECA	15,60 ± 1,4 a
TSECA RR	14,17 ± 2,9 a
CV%	18,38

TSECA = transgênico sob seca; TSECA RR = transgênico sob seca com aplicação de herbicida. Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,01$).

7.2.3. Ácido Jasmônico (JA)

Os resultados da quantificação para os tratamentos do primeiro ensaio (Ensaio sem herbicida) foram submetidos a ANOVA e demonstraram que os fatores “Estresse” e “Ambiente” revelaram efeito significativo para o teor de JA em folha (Tabela 11). Como era de se esperar, a média do teor de JA entre os tratamentos que foram submetidos ao déficit hídrico (158,70 pg/gr de MS) foi significativamente superior do que o teor médio dos tratamentos que foram cultivados sob rega padrão (77,19 pg/gr de MS). O incremento dos tratamentos que sofreram déficit hídrico foi ainda maior para aqueles que compunham o ambiente Casa de Vegetação. No entanto, o mais interessante foi que ao analisarmos os valores do QM e do F calculado na Tabela 11, é possível verificar que o fator “Ambiente” teve um efeito cerca de 10 vezes maior para os teores de JA, quando comparado ao fator “Estresse”. Os tratamentos cultivados no ambiente Casa de Vegetação apresentaram um teor médio de 430,52 pg/gr de MS, enquanto os tratamentos cultivados no ambiente Câmara de

Crescimento obtiveram um teor médio mais de 10 vezes inferior (28,45 pg/gr de MS).

Tabela 11. Graus de liberdade (GL), quadrado médio (QM), F teste (F) e nível de significância (p) da análise de variância para a variável JA nos tratamentos que compõem o Ensaio sem herbicida.

Fator de Variação	GL	QM	F	p
Transgenia (T)	1	0,008	0,07 ^{ns}	0,7906
Estresse (E)	1	3,117	25,95**	0,0001
Ambiente (A)	1	44,283	368,76**	< 0,0001
Interações				
Interação T*E	1	0,372	3,09 ^{ns}	0,1000
Interação T*A	1	0,431	3,59 ^{ns}	0,0786
Interação E*A	1	0,136	1,13 ^{ns}	0,3052
Interação T*E*A	1	0,135	1,12 ^{ns}	0,3065

^{ns}: não significativo;

** : significativo pelo teste F ao nível de 1% de probabilidade.

A participação do JA em resposta ao estresse abiótico, como a seca e salinidade, já foi relatada em várias espécies. A exemplo disto, LEHMANN et al. (1995) trataram folhas de cevada com sorbitol ou manitol (solutos compatíveis para simulação de stress hídrico) e constataram aumento significativo no conteúdo de JÁ e seus derivados endógenos, seguido de síntese de proteínas induzida pelo jasmonato. Outro estudo mostrou ainda que o tratamento de sorbitol aumentou o conteúdo JA, e esta situação foi necessária o suficiente para iniciar a expressão do gene de resposta ao JA (KRAMELL et al., 2000). Estudos também já reportaram respostas relacionadas a síntese de JA em milho. Xin et al. (1997) registraram aumento significativo no conteúdo de JA endógeno em células da raiz do milho submetida a condição de desidratação.

Para os resultados de quantificação do conteúdo de JA nos tratamentos do segundo ensaio (Ensaio com herbicida), a ANOVA aplicada revelou uma diferença altamente significativa entre os tratamentos TS e TSRR. O tratamento que recebeu aplicação sequencial de herbicida apresentou teor médio mais de vinte vezes maior comparado ao tratamento que não sofreu aplicação de herbicida (Tabela 12). Neste sentido, sugere-se que as aplicações de herbicida aumentaram ainda mais a concentração de JA como um

sinalizador aos genes de resposta aos mecanismos da planta contra estresses abióticos.

Tabela 12. Conteúdo médio de JA em pg por g de massa seca (pg/g de MS) nas folhas de milho transgênico submetido ao déficit hídrico com ou sem aplicação de herbicida.

Tratamentos	JA (pg/g de MS)
TSECA	48,42 ± 9,8 b
TSECA RR	1209,66 ± 167 a
CV%	20,72

TSECA = transgênico sob seca; TSECA RR = transgênico sob seca com aplicação de herbicida. Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,01$).

7.2.4. Metil Jasmonato (MeJA)

Após a quantificação dos teores de MeJA em folha, os valores também foram submetidos a ANOVA trifatorial para os tratamentos do primeiro ensaio (Ensaio sem herbicida). A ANOVA revelou significância para todos os fatores de variação individual envolvidos, porém também revelou significância às interações dos fatores Transgenia x Ambiente (T x A) e Estresse x Ambiente (E x A) (Tabela 13).

Tabela 13. Graus de liberdade (GL), quadrado médio (QM), F teste (F) e nível de significância (p) da análise de variância para a variável MeJA nos tratamentos que compõem o Ensaio sem herbicida.

Fator de Variação	GL	QM	F	p
Transgenia (T)	1	787869	13,36**	0,002
Estresse (E)	1	755280	12,81**	0,003
Ambiente (A)	1	1971590	33,44**	< 0,0001
Interações				
Interação T*E	1	339253	5,75 ^{ns}	0,0309
Interação T*A	1	603842	10,24**	0,0064
Interação E*A	1	1175308	19,93**	0,0004
Interação T*E*A	1	7148	0,12 ^{ns}	0,7327

^{ns}: não significativo; **: significativo pelo teste F ao nível de 1% de probabilidade.

Analisando os gráficos das interações, é possível constatar como estes fatores influenciam na variação do conteúdo de MeJA em folha nas diferentes situações de cultivo. Nota-se que as duas interações variam da mesma forma, de acordo com o ambiente em que foi cultivado o tratamento (Figura 10 e 11). Para a interação entre T x A, constata-se que o conteúdo de MeJA para os tratamentos transgênicos é significativamente superior quando estas plantas são cultivadas em casa de vegetação, independente do estresse aplicado ou não (Figura 10). Esta variação é no mínimo relevante, já que segundo a empresa proponente da tecnologia afirma que as plantas transformadas com o evento NK603 são substancialmente equivalentes a sua isolinha convencional. Da mesma forma, para a interação E x A verificou-se o mesmo sentido de variação, ou seja, observou-se um significativo incremento no conteúdo de MeJA em folha para os tratamentos que sofreram déficit hídrico no ambiente casa de vegetação, independente do fator transgenia (Figura 11).

Existem estudos que reportaram o efeito do MeJA como resposta adaptativa à situações de estresse hídrico. O efeito de MeJA sobre mudanças de atividades enzimáticas de eliminação de oxigênio e composição lipídica da membrana foi estudada em folhas de morango submetido a estresse hídrico (WANG, 1999). Apesar dos autores não testarem dois ambientes diferentes como no presente estudo, eles também constataram altos níveis de MeJA nos tratamentos que sofreram estresse por desidratação. Além disso, eles constataram que os tratamentos com altos teores de MeJA também induziram aumento na atividade de importantes enzimas como peroxidase, catalase e superóxido dismutase, que estão ligadas diretamente ao sistema de defesa da planta. Os autores reportaram ainda que os níveis elevados de MeJA influenciaram na síntese de diversas proteínas de membrana (ex.: glicolipídios e fosfolipídios) que atuam como resposta de adaptação celular em situações de déficit hídrico. Sendo assim, os autores concluíram que os teores elevados de MeJA parecem alterar o metabolismo da planta para que esta seja capaz de suportar a situação de desidratação.

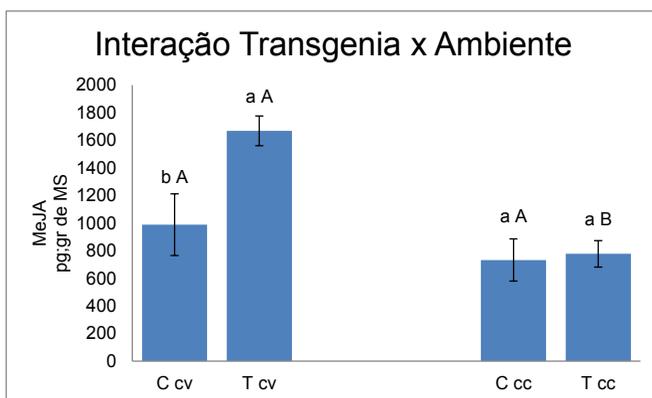


Figura 10. Conteúdo de MeJA em pg/gr de Massa Seca (pg/gr de MS) para a interação entre os fatores Transgenia e Ambiente do Ensaio sem herbicida. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ($p < 0,01$). Letras minúsculas comparam os níveis C e T do fator Transgenia dentro de cada ambiente; Letras maiúsculas comparam os níveis cv e cc do fator Ambiente dentro dos níveis C ou T do fator Transgenia.

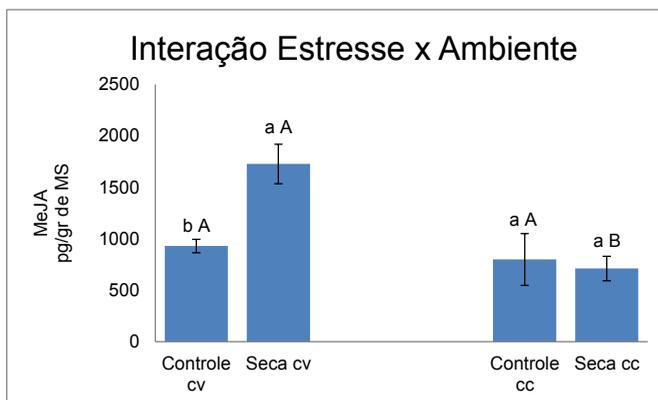


Figura 11. Conteúdo de MeJA em pg/gr de Massa Seca (pg/gr de MS) para a interação entre os fatores Estresse e Ambiente do Ensaio sem herbicida. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ($p < 0,01$). Letras minúsculas comparam os níveis Controle e Seca do fator Estresse dentro de cada ambiente; Letras maiúsculas comparam os níveis cv e cc do fator Ambiente dentro de cada nível Controle (CONT) ou Seca (SECA) do fator Estresse.

Com relação aos valores médios da quantificação de MeJA em folha para os dois tratamentos do segundo ensaio (Ensaio com herbicida), estes também foram submetidos a ANOVA. Diferentemente do JA, as médias de conteúdo de MeJA dos dois tratamentos TSECA e TSECA RR não apresentaram diferença significativa ($p>0,01$). Apesar de não serem significativamente diferentes pelo teste estatístico aplicado, é possível notar ainda sim que o conteúdo médio de MeJA é superior no tratamento das plantas estressadas por déficit hídrico e submetidas a aplicações sequenciais de herbicida (Tabela 14).

Tabela 14. Conteúdo médio de MeJA em pg por g de massa seca (pg/g de MS) nas folhas de milho transgênico submetido ao déficit hídrico com ou sem aplicação de herbicida.

Tratamentos	MeJA (pg/g de MS)
TSECA	1288,67 ± 242 a
TSECA RR	1894,72 ± 254 a
CV%	13,4

TSECA = transgênico sob seca; TSECA RR = transgênico sob seca com aplicação de herbicida. Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferença significativa ($p<0,01$).

7.2.5. Ácido Salicílico (SA)

Os dados do conteúdo de SA em pg/g de MS obtidos na análise dos tratamentos do primeiro ensaio (Ensaio sem herbicida) foram também submetidos a ANOVA. Os fatores de variação “Ambiente” e “Estresse” apresentaram diferença significativa pelo teste F ($p<0,001$). No entanto, assim como na análise do conteúdo de MeJA, a ANOVA apresentou significância para as interações Transgenia x Ambiente e Estresse x Ambiente, e por isso também foram realizados gráficos das interações com aplicação do teste de separação de médias SNK para o melhor entendimento dos resultado revelado pela ANOVA (Tabela 15).

Tabela 15. Graus de liberdade (GL), quadrado médio (QM), F teste (F) e nível de significância (p) da análise de variância para a variável SA nos tratamentos que compõem o Ensaio sem herbicida.

Fator de Variação	GL	QM	F	p
Transgenia (T)	1	0,009	0,18 ^{ns}	0,6749
Estresse (E)	1	1,001	18,65**	0,0006
Ambiente (A)	1	10,78	200,77**	< 0,0001
Interações				
Interação T*E	1	0,02	0,3740 ^{ns}	0,5505
Interação T*A	1	0,624	11,63**	0,0042
Interação E*A	1	2,306	42,94**	< 0,0001
Interação T*E*A	1	0,084	1,56 ^{ns}	0,1297

^{ns}: não significativo;

** : significativo pelo teste F ao nível de 1% de probabilidade.

Observando a Figura 12, que representa a interação entre T e A, é possível constatar que o conteúdo de SA em folha varia de acordo com o ambiente em que as plantas foram cultivadas (Figura 12). As plantas cultivadas no ambiente casa de vegetação (C cv e T cv), o qual possui alta variação ambiental quando comparado ao outro ambiente, apresentaram maiores teores de SA do que as plantas cultivadas em câmara de crescimento (C cc e T cc). Apesar dos teores de SA das plantas cultivadas em câmara de crescimento terem significativamente inferior, as plantas convencionais neste ambiente controlado apresentaram maior conteúdo médio de SA em folha do que as plantas GM.

Com relação à interação Estresse x Ambiente, o conteúdo médio de SA também é significativamente superior nos tratamentos cultivados em casa de vegetação, independente do estresse aplicado ou não (Figura 13). Ainda, no sentido inverso da interação anterior, as plantas cultivadas em casa de vegetação que sofreram estresse hídrico apresentaram valores médios de SA significativamente maiores do que as plantas que foram cultivadas em situação normal de cultivo.

Portanto, para as duas interações, o ambiente casa de vegetação resultou em elevados teores de SA. É importante constatar também que a maior parte da variação no conteúdo médio de SA em folha é explicada pela

segunda interação entre os fatores Estresse x Ambiente, já que o QM desta foi cerca de quatro vezes maior do que o QM da interação entre T x A.

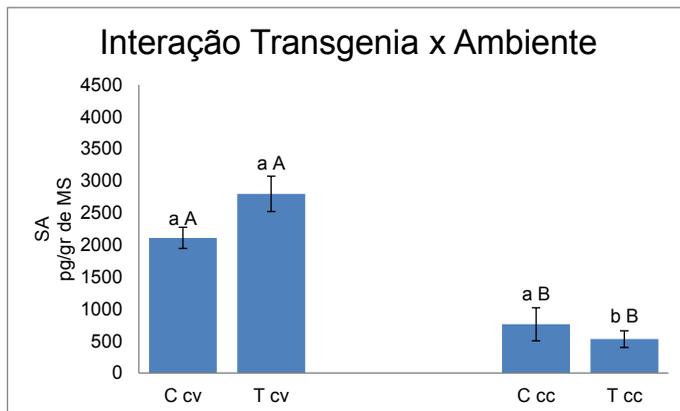


Figura 12. Conteúdo de SA em pg/gr de Massa Seca (pg/gr de MS) para a interação entre os fatores Transgenia e Ambiente Ensaio sem herbicida. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ($p < 0,01$). Letras minúsculas comparam os níveis C e T do fator Transgenia dentro de cada ambiente; Letras maiúsculas comparam os níveis cv e cc do fator Ambiente dentro de cada nível C ou T do fator Transgenia.

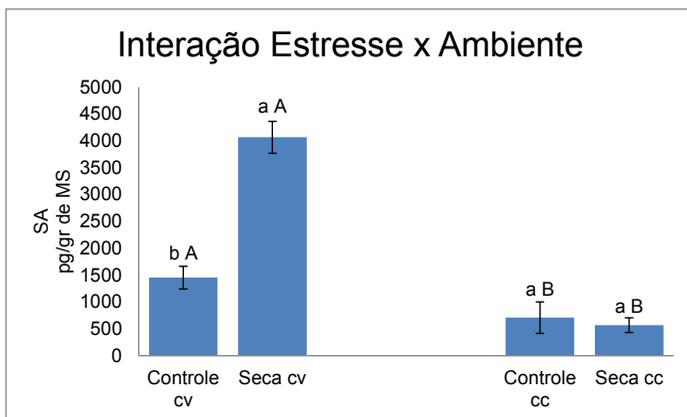


Figura 13. Conteúdo de SA em pg/gr de Massa Seca (pg/gr de MS) para a interação entre os fatores Estresse e Ambiente do Ensaio sem aplicação de herbicida. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ($p < 0,01$). Letras minúsculas comparam os níveis Controle (CONT) e Seca (SECA) do fator Estresse dentro de cada ambiente; Letras maiúsculas comparam os níveis cv e cc do fator Ambiente dentro de cada nível Controle ou Seca do fator Estresse.

Alguns estudos recentes também comprovam a alteração no conteúdo endógeno de SA em resposta ao déficit hídrico, o que aponta este como um importante sinalizador de estresse. A exemplo, Bandurska & Stroinski (2005) reportaram que os níveis endógenos de SA sofreram um significativo incremento em raízes de cevada em situação de déficit hídrico. Além disso, quando as plantas foram tratadas com adição de SA exógeno antes do estresse, o efeito do déficit hídrico na membrana celular diminuiu, e o teor de ABA aumentou. Estes resultados sugerem que o ABA contribui no desenvolvimento de reações contra o estresse, induzido pelo SA. Isto confirma a correlação positiva entre os teores de SA e ABA em resposta da planta à privação de água.

Para os resultados obtidos na quantificação dos teores de SA do segundo ensaio (Ensaio com herbicida), estes também foram submetidos a ANOVA. Como era esperado, a ANOVA ($p < 0,01$) revelou que o tratamento TSECA RR apresentou conteúdo médio de SA em folha superior ao tratamento

TSECA. Assim como ocorreu para o conteúdo de JA, o teor médio de SA sofreu um significativo incremento causado pelo acúmulo de duas situações de estresse abiótico: déficit hídrico e aplicação de herbicida (Tabela 16).

Tabela 16. Conteúdo médio de SA em pg por g de massa seca (pg/g de MS) nas folhas de milho transgênico submetido ao déficit hídrico com ou sem aplicação de herbicida.

Tratamentos	SA (pg/g de MS)
TSECA	868,28 ± 50 b
TSECA RR	2475,28 ± 346 a
CV%	15,9

TSECA = transgênico sob seca; TSECA RR = transgênico sob seca com aplicação de herbicida. Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,01$).

7.2.6. Ácido Cinâmico (CA)

Assim como os outros compostos, os valores obtidos na análise quantitativa do conteúdo de CA em folha para os tratamentos do primeiro ensaio foram submetidos a ANOVA trifatorial (Tabela 17). A ANOVA revelou significância ao nível de 1% de probabilidade somente para os fatores de variação individuais “Transgenia” e “Ambiente”. Contudo, se analisarmos a tabela da ANOVA, é possível notar que apesar de não apresentar significância ao nível de 1% de probabilidade, o valor de p para a interação entre estes dois fatores ficou na limiar ($p = 0,0111$). Acredita-se que este valor possa ter ficado um pouco acima do nível de probabilidade determinado como o ideal para a análise em questão devido a alta variação biológica para a variável analisada. Apesar do planejamento de pools para a extração dos hormônios que foram quantificados, a alta sensibilidade que é característica na análise de fitormônios em HPLC-ESI-MS/MS faz com que a variação biológica entre as amostras ainda esteja razoavelmente presente. Portanto, uma figura foi elaborada para a discussão desta interação entre os fatores Transgenia x Ambiente (Figura 14).

Tabela 17. Graus de liberdade (GL), quadrado médio (QM), F teste (F) e nível de significância (p) da análise de variância para a variável CA nos tratamentos que compõem o Ensaio sem aplicação de herbicida.

Fator de Variação	GL	QM	F	p
Transgenia (T)	1	1,013	15,14**	0,0016
Estresse (E)	1	0,254	3,80 ^{ns}	0,0712
Ambiente (A)	1	0,673	10,07**	0,0067
Interações				
Interação T*E	1	0,004	0,06 ^{ns}	0,7965
Interação T*A	1	0,572	8,55 ^{ns}	0,0111
Interação E*A	1	0,043	0,65 ^{ns}	0,4323
Interação T*E*A	1	0,044	0,66 ^{ns}	0,4288

^{ns}: não significativo;

** : significativo pelo teste F ao nível de 1% de probabilidade.

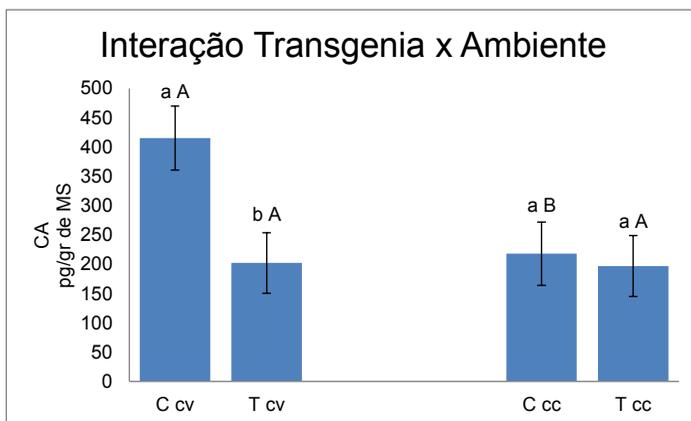


Figura 14. Conteúdo de CA em pg/gr de Massa Seca (pg/gr de MS) para a interação entre os fatores Transgenia e Ambiente do Ensaio sem herbicida. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ($p < 0,01$). Letras minúsculas comparam os níveis C e T do fator Transgenia dentro de cada ambiente; Letras maiúsculas comparam os níveis cv e cc do fator Ambiente dentro de cada nível C ou T do fator Transgenia.

Analisando a Figura 14, nota-se que as plantas convencionais cultivadas em casa de vegetação revelaram um teor médio de CA significativamente superior do que as outras combinações (Figura 14). No ambiente casa de vegetação (cv), as plantas convencionais apresentaram teor médio de CA

cerca de duas vezes a mais do que as plantas transgênicas. Novamente, esta variação pode estar ligada a efeitos pleiotrópicos causado pela interação entre o gene inserido e os genes endógenos da planta transformada, ou até o silenciamento de algum gene associado a biossíntese do ácido cinâmico em consequência da inserção da sequência exógena. Estas hipóteses devem ser ainda mais consideradas quando associamos estes resultados com o fato de que a síntese de CA e a enzima EPSPS estão envolvidas na mesma via metabólica. Independente da causa, segundo o princípio da equivalência substancial seguido pelas agências de liberação durante o processo de aprovação de um OGM, as plantas de milho GM (NK603) e não-GM deveriam responder da mesma forma com relação a síntese de ácido cinâmico, independentemente de fatores ambientais envolvidos.

Os resultados de quantificação de CA em folha nos tratamentos do Ensaio com herbicida também foram submetidos a ANOVA ($p < 0,01$). A ANOVA revelou a inexistência de diferença significativa entre os dois tratamentos TSECA e TSECA RR para o conteúdo médio de CA em folha (Tabela 18). Sendo assim, sugere-se que a aplicação de herbicida não resultou em um incremento nos teores de CA em folha nas plantas transgênicas estressadas por privação de água.

Tabela 18. Conteúdo médio de CA em pg por g de massa seca (pg/g de MS) nas folhas de milho transgênico submetido ao déficit hídrico com ou sem aplicação de herbicida.

Tratamentos	CA (pg/g de MS)
TSECA	393,52 ± 20 a
TSECA RR	307,57 ± 60 a
CV%	12,31

TSECA = transgênico sob seca; TSECA RR = transgênico sob seca com aplicação de herbicida.

Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,01$).

7.2.7. Ácido Giberélico (GA₃)

Para os resultados dos tratamentos envolvidos no primeiro ensaio (Ensaio sem herbicida) realizou-se uma ANOVA levando em consideração os três fatores envolvidos. A ANOVA revelou que nenhum dos fatores simples apresentaram diferença significativa, e que somente a interação entre os fatores Transgenia x Ambiente foi significativa pelo teste F ao nível de 1% de probabilidade (Tabela 19).

Tabela 19. Grau de liberdade (GL), quadrado médio (QM), F teste (F) e nível de significância (p) da análise de variância para a variável GA₃ nos tratamentos que compõem Ensaio sem herbicida.

Fator de Variação	GL	QM	F	p
Transgenia (T)	1	3,497	1,75 ^{ns}	0,2068
Estresse (E)	1	4,023	2,01 ^{ns}	0,1776
Ambiente (A)	1	11,920	5,96 ^{ns}	0,0284
Interações				
Interação T*E	1	0,0344	0,17 ^{ns}	0,6841
Interação T*A	1	21,356	10,69**	0,0055
Interação E*A	1	1,823	0,91 ^{ns}	0,3554
Interação T*E*A	1	4,683	2,34 ^{ns}	0,1479

^{ns}: não significativo; **: significativo pelo teste F ao nível de 1% de probabilidade.

Após a aplicação do teste de separação de médias SNK, foi possível observar que o tratamento transgênico combinado ao ambiente de cultivo controlado na câmara de crescimento proporcionou o maior acúmulo médio de GA₃ em folha quando comparado aos outros tratamentos (Figura 15). Assim como ocorreu para na análise do fitormônio ácido cinâmico (CA), as causas para esta diferença pode ser das mais diversas, porém é preciso frisar que este resultado também indica que as plantas transformadas com o evento NK603 e sua isolinha convencional mais próxima não são equivalentes substancialmente para este composto. A interação entre o efeito do ambiente controlado com a transformação genética proporcionou de alguma forma um incremento na concentração deste fitormônio quase duas vezes superior do que os outros tratamentos envolvidos nesta interação.

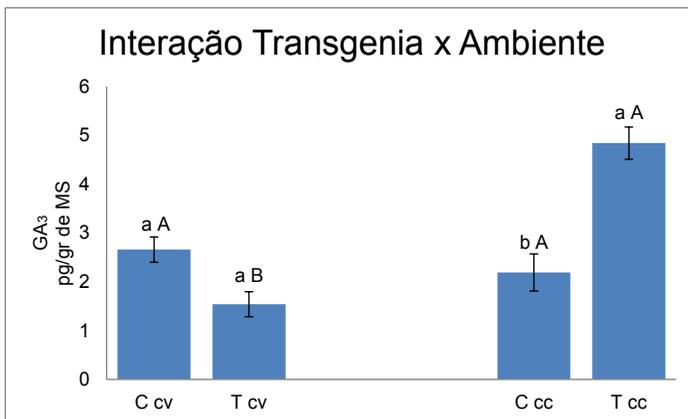


Figura 15. Conteúdo de GA₃ em pg/gr de Massa Seca (pg/gr de MS) para a interação entre os fatores Transgenia e Ambiente do Ensaio sem herbicida. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ($p < 0,01$). Letras minúsculas comparam os níveis C e T do fator Transgenia dentro de cada ambiente; Letras maiúsculas comparam os níveis cv e cc do fator Ambiente dentro dos níveis C ou T do fator Transgenia.

Foram quantificados teores de GA₃ em folha também para os tratamentos que compõem o segundo ensaio (Ensaio com herbicida). Os resultados obtidos foram submetidos a ANOVA seguida do Teste T ($p < 0,01$). A ANOVA revelou que não houve diferença estatística entre os dois tratamentos TSECA e TSECA RR, ou seja, segundo o teste estatístico as aplicações sequenciais de herbicida não interferiram na concentração de GA₃ em folha em plantas transgênicas NK603 submetidas a condição de estresse por desidratação (Tabela 20). Apesar disto, os teores de GA₃ no tratamento que sofreu aplicação de herbicida foram ligeiramente inferiores se comparado ao tratamento que não recebeu as aplicações. Este resultado corrobora com outros trabalhos publicados no sentido de que existe um decréscimo na concentração de GA₃ como forma de sinalização a mecanismos adaptativos da planta a situações de estresse.

Tabela 20. Conteúdo médio de GA₃ em pg por g de massa seca (pg/g de MS) nas folhas de milho transgênico submetido ao déficit hídrico com ou sem aplicação de herbicida.

Tratamentos	GA₃ (pg/g de MS)
TSECA	4,19 ± 0,79 a
TSECA RR	3,51 ± 0.23 a
CV%	11,73

TSECA = transgênico sob seca; TSECA RR = transgênico sob seca com aplicação de herbicida.

Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,01$).

7.3 Quantificação de lignina em folha

Os valores de absorbâncias obtidos foram transformados em ug de derivados de lignina-ácido tioglicólico (LTGA) por g de MF (ug/g de MF) a partir da fórmula obtida com a curva padrão realizada. As médias de cada pool biológico de todos os tratamentos que compõem o primeiro ensaio (Ensaio sem herbicida) foram submetidas a análise de variância (ANOVA) e quando o teste F revelou significância ao nível de 0,05% de probabilidade, foi realizado teste de separação de médias SNK. Vale lembrar que este primeiro ensaio sem aplicação de herbicida enquadra-se em uma análise de ensaio trifatorial (Transgenia x Estresse x Ambiente), e assim foi feito.

Os resultados obtidos na análise de LTGA (derivados de lignina ácido-tioglicólico) do primeiro ensaio (Ensaio sem herbicida) mostram que não houve diferença significativa para a interação entre nenhum dos três fatores envolvidos na análise. No entanto, as médias dos fatores Transgenia e Ambiente apresentaram diferença significativa na concentração de derivados da LTGA. Na análise de separação de médias aplicada as médias do fator "Transgenia", mostrou que a concentração de derivados da LTGA foi significativamente maior nas plantas transgênicas do que nas plantas convencionais, independente do déficit hídrico aplicado ou não e do ambiente em que os tratamentos foram conduzidos (Tabela 21). Esta diferença média entre as plantas transgênicas e convencionais foi de 47% na Casa de Vegetação e 26% na Câmara de Crescimento. Este resultado está de acordo com outros estudos que demonstraram que variedades transgênicas Bt de diversas espécies (canola, batata, milho, tabaco e algodão) apresentam maiores teores de lignina quando comparados com suas isolinhas não transgênicas (STOZKY, 2004).

Tabela 21. Concentração dos derivados da lignina ácido-tioglicólico (LTGA) em ug por g de massa fresca (ug/g MF) nas folhas de milho transgênico e convencional, submetido ou não ao déficit hídrico, cultivados em casa de vegetação e câmara de crescimento (Ensaio sem herbicida).

ESTRESSE	CASA DE VEGETAÇÃO			CÂMARA DE CRESCIMENTO		
	Convencional	Transgênico	Média ²	Convencional	Transgênico	Média ²
CONT	495,19 ^{ns}	825,04	660,11 ^{ns}	863,84 ^{ns}	1001,18	932,51 ^{ns}
SECA	499,32	644,67	571,99	736,35	1016,49	876,42
Média ¹	497,26 b	734,86 a		800,10 b	1008,84 a	
Média ³	616,06 B			904,47 A		

CV% 16,98

^{ns}: Dentro dos ambientes Casa de Vegetação (cv) e Câmara de Crescimento (cc) as médias não foram submetidas ao teste de separação de médias por que o F da interação não foi significativo (p<0,05).

¹: Médias do fator "Transgenia". As médias deste fator apresentaram F significativo e portanto aplicou-se o teste de separação de médias SNK (p<0,01).

²: Médias do fator "Estresse". As médias deste fator não apresentaram F significativo pelo Teste F (p<0,05).

³: Médias do fator "Ambiente". As médias deste fator apresentaram F significativo e portanto aplicou-se o teste de separação de médias SNK (p<0,01).

Saxena & Stotzky (2001) também analisaram o teor de lignina em 10 diferentes híbridos de milho Bt, de três eventos de transformação (Bt11, MON810 e 176), e suas respectivas isolinhas não transgênicas cultivadas também em dois ambientes diferentes, câmara de crescimento (26 ± 2 ° C, 12 h fotoperíodo) e no campo. Os autores realizaram cortes histológicos entre o terceiro e quarto nó do caule das plantas, para examinar o conteúdo de lignina em microscopia de fluorescência a 400 nm, e verificaram maior concentração de lignina nas células que compõem a bainha do feixe vascular e do esclerênquima em todos os híbridos Bt em comparação com a sua isolinha não transgênica nos dois ambientes. O diâmetro médio das células que compõem o feixe vascular no milho Bt foi de 21.5±0.84 mm, enquanto na isolinha convencional não-Bt foi de 12,4 ± 1,14 mm. Os autores também analisaram nestas mesmas seções o teor de lignina solúvel em brometo de acetila, e

confirmaram que o conteúdo de lignina dos híbridos Bt, se cultivados em câmara de crescimento ou no campo, é significativamente elevado (33 a 97% mais elevado) quando comparado a suas isolinhas não-Bt. Masoero et al. (1999) também indicou em seu trabalho um acréscimo de 16% no teor de lignina do milho Bt em comparação a sua isolinha não-Bt cultivados no campo.

Os resultados dos estudos acima referidos concordam com os resultados obtidos nesse trabalho, pois apesar de não serem híbridos transgênicos com o mesmo evento de transformação genética que foi utilizado no presente estudo, e dos autores utilizarem outras metodologias para analisarem o conteúdo de lignina, estes também encontraram maiores concentrações de lignina nos híbridos transgênicos quando comparados as suas isolinhas não transgênicas. Com base na literatura acessada, acredita-se que este seja o primeiro estudo que realizou análise comparativa da concentração de lignina (LTGA) em híbridos de milho transgênico evento NK603 e sua contraparte não-transgênica. Contudo, os resultados do presente estudo não concordam com os relatados por Faust (1999) que mostram a inexistência de diferença significativa no conteúdo de lignina entre a biomassa seca de plantas inteiras de milho Bt (evento MON810) e sua contraparte não-Bt. Apesar disso, no mesmo estudo Faust (1999) relata que o híbrido transgênico apresentou significativamente maiores teores de umidade e menores níveis de amônia em comparação ao híbrido não-transgênico.

Partindo do princípio de que a lignina, em suas diferentes formas, é o principal componente estrutural da célula vegetal, e que este componente é responsável por dar resistência, impermeabilidade e até proteção contra a biodegradação a alguns componentes celulares pouco estáveis, como importantes proteínas e carboidratos, as modificações não esperadas nos teores de lignina podem resultar em efeitos que tenham importantes implicações ecológicas (HALPHIN et al., 1994).

Por exemplo, a lignina e outros importantes componentes estruturais são lentamente degradados pela microbiota do solo, e o aumento não esperado no conteúdo de lignina e destes outros componentes podem retardar este processo natural de decomposição. Com o retardo na decomposição do solo, efeitos maléficos dos resíduos vegetais de plantas transgênicas no solo, já reportados, podem ser prolongados por grandes períodos. Como exemplo

destes efeitos já reportados, Castaldini et al. (2005) indicaram que resíduos vegetais de milho transgênico Bt misturado com solo e mantido por até quatro meses, afetou na respiração do solo (redução na liberação de CO₂), nas comunidades bacterianas, e no estabelecimento de micorrizas e microorganismos endofíticos. Donegan et al. (1995) relataram que algumas variedades de algodão Bt afetaram a população microbiana total do solo, enquanto as toxinas purificadas produzidas de *B. thuringiensis* não afetaram em nada a mesma população microbiana, indicando que o impacto sobre os microorganismos do solo tem origem nos eventos de transformação genética ou nas técnicas de cultura de tecidos utilizadas durante a transformação genética dessas plantas. Flores et al. (2004) demonstraram em seus resultados que a biomassa de plantas de milho transgênico Bt foi decomposta mais lentamente do que a biomassa de sua isolinha convencional, e também mostraram que houve diminuição na evolução e liberação de CO₂ no solo misturado com a biomassa das plantas Bt. Neste mesmo trabalho, a biodegradação da biomassa de canola Bt, algodão Bt, batata Bt e arroz Bt também foram significativamente mais lentas do que suas respectivas isolinhas não transgênicas. Além disto, a lignina em altas concentrações na célula vegetal pode dificultar seriamente a digestibilidade na alimentação de herbívoros devido a sua alta resistência física e durabilidade química. Por estar ligada a celulose e outras proteínas, a lignina em altas concentrações consequentemente também pode diminuir a digestibilidade destas substâncias pelo animal (TAIZ & ZEIGER, 2004). Levando em consideração que o híbrido utilizado neste trabalho, assim como muitos outros também modificados geneticamente com o evento NK603 são produzidos no Brasil também para alimentação animal (ex: silagem), a diminuição da digestibilidade causada pelo incremento de lignina pode ser um grave problema.

Por outro lado, o aumento nos teores de lignina podem ser benéficos no sentido de que podem proporcionar maior resistência ao ataque de insetos e microorganismos fitopatogênicos. Além disso, com relação ao retardo na decomposição da biomassa das plantas, este pode ser benéfico pelo fato de que a matéria orgânica derivada desta biomassa pode permanecer mais tempo e em maiores níveis no solo, auxiliando assim na redução da erosão e proporcionando uma melhor estrutura ao solo. No entanto, o maior tempo de

decomposição da biomassa de plantas transgênicas pode fazer com que as toxinas transgênicas que ali se encontram, permaneçam no solo e aumente a exposição destas toxinas a organismos não alvos, e até auxiliando na seleção de organismos resistentes a estas toxinas. É possível questionar também, que o aumento nos teores de lignina podem ser benéficos no sentido de que podem proporcionar maior resistência ao ataque de insetos e microorganismos fitopatogênicos.

Outro resultado relevante obtido na análise trifatorial do Ensaio sem herbicida, é com relação ao fator Ambiente. Segundo a ANOVA e separação de médias realizada, independente do híbrido transgênico ou convencional, e da aplicação ou não do estresse hídrico, as plantas cultivadas em câmara de crescimento apresentaram um incremento significativo de 46% na concentração média da LTGA em comparação as cultivadas em casa de vegetação (Tabela 21). Este resultado confirma a influência ambiental, proveniente da interação genótipo x ambiente, na concentração de derivados da lignina-ácido tioglicólico dos híbridos transgênicos e não transgênicos, sob ou não déficit hídrico. Se for levado em conta a correlação já reportada entre o longo período de exposição ao déficit hídrico e a diminuição na concentração de lignina como forma de adaptação ao estresse para posterior afrouxamento e alongamento da parede celular no processo de reidratação (VICENT et al., 2005), pode-se dizer que o resultado obtido em nosso trabalho concorda com outros trabalhos publicados anteriormente os quais sugerem que as plantas submetidas ao estresse por déficit hídrico cultivadas em casa de vegetação foram mais estressadas do que as cultivadas em câmara de crescimento (RICCARDI et al., 1999).

Com relação aos resultados obtidos na análise de LTGA dos tratamentos que compõem o segundo ensaio (Ensaio com herbicida), as plantas que pertencem ao tratamento milho transgênico submetido a seca com aplicação de herbicida (TSECA RR) obtiveram valores significativamente maiores da concentração média de LTGA quando comparadas as plantas do tratamento sem aplicação de herbicida (TSECA) (Tabela 22). O tratamento TSECA RR apresentou em média um aumento de 33% na concentração de LTGA em comparação ao tratamento TSECA. Assim, a partir deste resultado, pode-se aferir que apesar do estresse por déficit hídrico isolado não influenciar a

concentração de lignina das plantas transgênicas, a aplicação do herbicida comercial *Roundup Ready Original* combinada a esta situação de estresse por déficit hídrico, influencia na maior concentração de compostos derivados da lignina ácido-tioglicólico em plantas de milho transgênico evento NK603.

Tabela 22. Concentração dos derivados da lignina ácido-tioglicólico (LTGA) em ug por g de massa fresca (ug/g MF) nas folhas de milho transgênico submetido ao déficit hídrico com ou sem aplicação de herbicida.

Tratamentos	LTGA (ug/g MF)
TSECA	644,67 b
TSECA RR	858,56 a
CV%	4,48

TSECA = transgênico sob seca; TSECA RR = transgênico sob seca com aplicação de herbicida.

Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

Zobiolo et al. (2010) estudaram os efeitos da aplicação de doses crescentes de glifosato em parâmetros fotossintéticos, concentração de aminoácidos e lignina de plantas de soja transgênica tolerantes a herbicida. Os autores analisaram a concentração de LTGA na raiz e no caule das plantas, e ao contrário dos nossos resultados, reportaram que a aplicação de glifosato diminui a concentração de lignina em comparação as plantas não tratadas. Diferentemente do presente estudo, Zobiolo et al. (2010) estudaram a concentração de lignina na raiz e no caule de plantas de soja em condições ideais de irrigação. Além da lignina, este mesmo estudo mostra que a aplicação de herbicida diminuiu também o conteúdo de aminoácidos e reduziu importantes parâmetros fotossintéticos.

Pouco é conhecido ainda sobre a ocorrência de efeitos pleiotrópicos decorrentes da modificação genética de plantas transgênicas submetidas a diferentes condições de cultivo e estresses bióticos ou abióticos, principalmente com relação a biossíntese de lignina e seus derivados. Apesar disso, estudos neste sentido são importantes, já que a biossíntese de lignina é controlada pela fenilalanina, um aminoácido aromático produto da via metabólica do

chiquimato, via na qual a síntese da enzima EPSPS também está envolvida (Padgett et al., 1995).

8. COMENTÁRIOS FINAIS

Inicialmente, com base nos resultados obtidos pode-se admitir que a metodologia dos dois ensaios realizados neste trabalho foram eficientes para responder as perguntas norteadoras e hipóteses elaboradas no início do trabalho. Contudo, um maior número de amostras biológicas em cada pool utilizado, poderia reduzir mais ainda a variação biológica nas análises realizadas. Apesar disto, com o desenho experimental utilizado foi possível detectar as variações significativas existentes e, principalmente, as interações entre os fatores que compunham o primeiro ensaio. Com relação à escolha das técnicas empregadas para realização das análises proteômica comparativa (2D DIGE), quantificação de fitormônios (HPLC-ESI-MS/MS) e quantificação de lignina (LTGA), estas foram eficientes na detecção dos possíveis efeitos pleiotrópicos da transformação de plantas evento NK603 sob situação de estresse por déficit hídrico.

A análise proteômica comparativa DIGE demonstrou diferença na expressão de proteínas entre as plantas de milho transgênicas (NK603) e sua isolinha convencional mais próxima. A expressão diferencial destas proteínas permite concluir que as plantas transgênicas respondem diferencialmente, com relação a expressão proteica, em comparação a sua isolinha não-transgênica, tanto em situação normal de cultivo quanto em condições de estresse por déficit hídrico. O fato de terem sido detectadas proteínas diferencialmente expressas entre os tratamentos CCONT x TCONT e CSECA x TSECA, leva a conclusão de que estas plantas não diferem entre si apenas pela expressão da proteína alvo da transformação genética (CP4 EPSPS), conforme proposto pela empresa proponente desta tecnologia, o que deve ser levado em consideração pelas agências regulatórias. Sugere-se que a causa desta diferença na expressão está nos efeitos pleiotrópicos consequentes da transformação genética, que por ser imprecisa, causa rearranjos gênicos e interfere na expressão de outros genes nativos. Além disso, apesar do nível de variação causada pela modificação genética não se diferir do nível da variação causada pelo ambiente (em termos de número total de proteínas diferenciais), as plantas transgênicas respondem diferencialmente com relação a sua linha isogênica quando cultivadas no mesmo ambiente, o que apoia a ideia da

existência de efeitos pleiotrópicos oriundo da inserção da sequência exógena para o evento NK603. Por fim, a análise comparativa do proteoma ainda revelou que a aplicação de herbicida nas plantas transgênicas em situação de estresse por desidratação resulta no aumento da expressão de algumas proteínas e até no provável silenciamento de um ou mais genes responsável pela transcrição de uma proteína.

A análise de quantificação de alguns fitormônios, derivativos e compostos relacionados, envolvidos nos mecanismos de defesa a estresse pelas plantas, revelou que a concentração de ABA, MeJA, SA, CA e GA₃ foi diferente entre as plantas transformadas e não-transformadas em diferentes interações com os fatores “Estresse” e “Ambiente”. Em alguns casos a variação nos teores médios destes compostos acima mencionados foram maiores do que a variação causada pelo estresse ou ambiente em que as plantas foram cultivadas. Este resultado corrobora para a conclusão da existência de efeitos pleiotrópicos consequentes do rearranjo no genoma após a transformação genética para o evento NK603. Além disso, as proteínas mais ou menos expressas no tratamento transgênico podem estar envolvidas em processos de sinalização das rotas de biossíntese destes compostos, ou podem também estarem sendo moduladas por estes, interferindo assim na concentração final destes no tecido foliar. Verificou-se também que a situação de estresse e o cultivo em diferentes ambientes resultaram na variação no conteúdo de todos os fitormônios analisados.

Com relação a análise quantitativa de lignina, a transformação genética também provocou alterações na concentração de LTGA, pois assim como encontrado por outros autores em diferentes eventos de transformação, as plantas transformadas (NK603) apresentaram teores de lignina superior aos das plantas não transformadas. Além disso, independente da transformação genética e da aplicação de estresse, as plantas cultivadas em casa de vegetação apresentaram teores menores de lignina do que as plantas cultivadas em ambiente controlado. Esta situação nos faz concluir que as plantas da casa de vegetação foram mais estressadas, já que a diminuição na concentração de lignina é considerado um mecanismo de adaptação ao estresse causado pela seca. Ainda, a análise de lignina nos tratamentos do segundo ensaio revelou que a aplicação de herbicida em plantas transgênicas

em situação de déficit hídrico provoca ainda mais o aumento na síntese de lignina.

Como perspectivas futuras, pretende-se sequenciar as proteínas diferencialmente expressas em todas as análises comparativas realizadas, a fim de discutir a fundo a interação entre estas proteínas diferencialmente expressas e os diferentes teores livres de lignina e dos fitormônios analisados.

9. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo demonstram que os testes realizados pelas empresas proponentes, exigidos pela CTNBio como parte para a liberação para plantio e comercialização de um OGM no país, são incompletos, já que não foi encontrado relatórios ou publicações da empresa proponente da tecnologia, sobre testes similares aos realizados no presente estudo. Além disso, os estudos de avaliação de risco deveriam incluir a submissão das plantas transformadas sob diversas condições ambientais de cultivo, como por exemplo condições de estresse biótico e abiótico. Ainda, por questões éticas, a execução destes estudos deveria ser responsabilidade de pesquisadores independentes.

Por fim, os resultados encontrados no presente estudo não dão suporte científico para o critério da equivalência substancial. Sendo assim, este critério poderia ser substituído do regramento normativo, por estudos científicos mais robustos, o que seguramente traria mais tranquilidade aos consumidores.

Portanto, os resultados encontrados neste trabalho concordam com resultados de outros estudos, em particular, sobre a existência de efeitos pleiotrópicos relacionados a expressão proteica, síntese de fitormônios e lignina em plantas geneticamente modificadas do evento NK603, submetidas a diferentes condições de cultivo.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAPITO-TENFEN S.Z., GUERRA M.P., WIKMARK O.G., & NODARI R. O., 2013. Comparative proteomic analysis of genetically modified maize grown under different agroecosystems conditions in Brazil. *Proteome Science*, 11(1), 46.

AGRICULTURA FAMILIAR E AGROECOLOGIA (AS-PTA), 2012. Sementes transgênicas liberadas comercialmente no Brasil. Online. Disponível em: < <http://aspta.org.br/itens-de-campanha/monitoramento-ctnbio/> >. Acesso em 12 de outubro de 2012.

AITTOKALLIO T., SALMI J., NYMAN T.A., NEVALAINEN O.S., 2005. Geometrical distortions in two-dimensional gels: applicable correction methods. *Journal of Chromatography B*, 815, 25–37.

ARAUS, J.L., SLAFER G.A., REYNOLDS M.P., ROYO C., 2002. Plant breeding and drought in C3 cereals: What should we breed for? *Annals of Botany* 89:925–940.

BARBER M.S., RIDE J.P., 1988. A quantitative assay for induced lignification in wounded wheat leaves and its use to survey potential elicitors of the response. *Physiol Mol Plant Pathol*;32:185–97.

BARI R. & JONES J.D.G., 2009. Role of hormones in plant defense responses. *Plant Mol. Biol.*69: 473-488

BARROS E., LEZAR S., ANTONEN M.J., VAN DIJK J.P., ROHLIG R.M., KOK E.J., ENGEL K., 2010. Comparison of two GM maize varieties with a nearisogenic non-GM variety using transcriptomics, proteomics and metabolomics. *Plant Biotechnology Journal*, 8, pp. 436–451.

BARTON N. H., 1990. Pleiotropic models of quantitative variation. *Genetics* 124: 773–782.

BENTLEY R., 1990. The shikimate pathway: a metabolic tree with many branches. In G. D. Fasman, ed. *Critical Reviews of Biochemistry and Molecular Biology*. Volume 25. Boca Raton, FL: CRC.

BRADY N.C., WEIL R.R., 2008. *The nature and properties of soils*, 14th ed. Columbus, OH: Pearson/ Prentice Hall.

CALZADILLA A., REHDANZ K., 2010. ToI. The economic impact of more sustainable water use in agriculture: A computable general equilibrium analysis. *Journal of Hydrology* 384(3–4):292–305.

CARPENTIER S.C., WITTERS E., LAUKENS K., DECKERS P., SWENNEN R., PANIS B., 2005. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: and evaluation of different methods for two dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics*, v. 5, p. 2497-2507.

CASTALDINI M., TURRINI A., SABRANA C., 2005. Impact of Bt corn on rhizospheric and soil eubacterial communities and on beneficial mycorrhizal symbiosis in experimental microcosms. *Appl Environ Microbiol* 71: 6719–6729

CASTRO A.J., CARAPITO C., ZORN N., MAGNÉ C., LEIZE E., VANDORSSELAER A., 2005. Proteomic analysis of grape vine (*Vitis vinifera* L.) tissues subjected to herbicide stress. *J Exp Bot*; 56:27 83 95.

CAVALLI V.L.L.O., CATTANI D., RIEG C.E.H, PIEROZAN P., ZANATTA, L., PARISSOTO E.B., FILHO D.W., SILVA F.R.M.B., PESSOA-PUREUR R., ZAMONER A., 2013. Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 65, 335-346.

CDB, 2000. Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança para a Convenção Sobre a Diversidade Biológica, Montreal. Disponível em: <

<http://www.cbd.int/doc/legal/cartagena-protocol-en.pdf> > Acesso em 18 de novembro de 2013.

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE ESTUDOS E PESQUISAS SOBRE DESASTRES (CEPED – UFSC), 2011. Atlas brasileiro de desastres naturais 1991 a 2010: volume Santa Catarina, Florianópolis: CEPED UFSC, 89 p.: il. color.; 30cm.

CERA, 2009. GM Crop Data Base NK603 – Center for Environmental Risk Assessment – 6 de Agosto de 2009. Disponível em: < http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database&mode=Submit > Acesso em 23 de outubro de 2012.

CIRAM/EPAGRI, 2012. Centro de Informações de Recursos Ambientais e Hidrometeorologia de Santa Catarina - Estiagem já provocou prejuízo de R\$777 milhões à agricultura catarinense – 18 de Abril de 2012. Disponível em: < <http://ciram.epagri.sc.gov.br/portal/Controlador?command=ExibirNoticiaImprensamodule=website&idNotic=1105&ixFoto=0&pag=1> > Acesso em 26 de outubro de 2012.

COMISSÃO EUROPÉIA, 2013. União Européia – Comissão Européia, Pesquisa & Inovação. Disponível em: < http://ec.europa.eu/research/participants/portal/page/call_FP7;efp7_SESSION_ID=rXJqR24L8rFPz4p8Qr2y2JFpT85nCgs3NMhBt2qvw688GWZL5pMp!51455273?callIdentifier=FP7-KBBE-2013FEEDTRIALS&specificProgram=COOPERATION#wlp_call_FP > Acesso em 29 de Julho de 2013.

CONCEIÇÃO, F.R., MOREIRA, A.N., BINSFELD, P.C., 2006. Detecção e quantificação de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares. *Revista Ciência Rural*, Santa Maria, v. 36, n.1, p. 315-324, jan-fev.

CREELMAN R.A., RAO M.V., 2002. The oxylipin pathway in Arabidopsis. In *The Arabidopsis Book* (Somerville, C.R. and Meyerowitz, E.M., eds), doi10.1199/tab.0012, American Society of Plant Biologists

CTNBio, 2008. Parecer Técnico nº 1596/2008 - Liberação Comercial de Milho Geneticamente Modificado Tolerante ao Glifosato, Milho Roundup Ready 2, Evento NK603 - Processo nº 01200.002293/2004-16 – 18 de Setembro de 2008. Disponível em: < <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/12341.html> > Acesso em 15 de setembro de 2012.

CTNBio, 2012. AVALIAÇÃO DE PUBLICAÇÃO DE TRABALHO EXPERIMENTAL EM CARÁTER DE URGÊNCIA – 24 de Outubro de 2012. Disponível em: < http://www.ctnbio.gov.br/upd_blob/0001/1752.pdf > Acesso em 18 de novembro de 2013.

DAMERVAL C., 1986. Technical improvements in two dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat seedling proteins. *Electrophoresis* 7:52–54.

DONEGAN K. K., PALM C.J., FIELAND V.J., PORTEOUS L.A., GANIO L.M., SCHALLER D.L., BUCAO L.Q., SEIDLER R.J., 1995. Changes in levels, species and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* endotoxin. *Appl. Soil Ecol.* 2:111–124.

DOWNING W.L., MAUXION F., FAUVARQUE M.O., REVIRON M.P., DE VIENNE D., VARTANIAN N., GIRAUDAT J., 1992. A *Brassica napus* transcript encoding a protein related to the *Kunitz* protease inhibitor family accumulates upon water stress in leaves, not in seeds. *Plant J* 2: 685–693.

EFSA JOURNAL, 2013. Considerations on the applicability of OECD TG 453 to whole food/feed testing. Disponível em: <

<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3347.htm> > Acesso em 02 de agosto de 2013.

FAROOQ M., WAHID A., KOBAYASHI N., FUJITA D., BASRA S.M.A., 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron. Sustain. Dev.*, 29: 185–212.

FAUST M.A., 1999. Research update on Bt corn silage. In Proceedings of the Four-State Applied Nutrition and Management Conference. MWPS-4SD5. Ames, Iowa State University, Iowa, USA.

FLORES S., SAXENA D., STOTZKY G., 2005. Transgenic Bt plants decompose less in soil than non-Bt plants. *Soil Biol. Biochem.* 37:1073–1082.

GASNIER C., DUMONT C., BENACHOUR N., CLAIR E., CHAGNON, M.C., SÉRALINI G.E., 2009. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology*, 262, 184–191.

GMDD, 2012. GMO Detection method Data Base – Event NK603. Disponível em: < <http://gmdd.shgmo.org/event/view/88> > Acesso em 06 de novembro de 2012.

GONÇALVES, E. F.; MOLLERI, G. S. F.; RUDORFF, F. M. Distribuição dos desastres naturais no Estado de Santa Catarina: estiagem (1980-2003). In: SIMPÓSIO BRASILEIROS DE DESASTRES NATURAIS, 1., Florianópolis. Anais Florianópolis: GEDB/UFSC, 2004. p. 773-786. 1 CD-ROM. Disponível em: < http://www.cfh.ufsc.br/~gedn/sibraden/cd/EIX0%204_0K/4-60.pdf >. Acesso em 16 de setembro de 2013.

GUERRERO F.D., JONES J.T., MULLET J.E., 1990. Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted: sequence and expression of three inducible genes. *Plant Mol Biol* 15: 11–26.

HALPIN C., KNIGHT M.E., FOXON G.A., CAMPBELL M.M., BOUDET A.M., BOON J.J., CHABBERT B., TOLLIER M., SCHUCH W., 1994. Manipulation of lignin quality by down regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Plant Journal* 6: 339–350.

HAYAT Q., HAYAT S., IRFAN M., AHMAD A., 2010. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environ. Exp. Bot.* 8: 14-25.

HEADEY D., FAN S., 2008. Anatomy of a crisis: the causes and consequences of surging food prices. *Agricultural Economics* 39 (suppl.):375–391, 2008.

HUBICK K.T., TAYLOR J.S., REID D.M., 1986. The effect of drought on levels of ABA, cytokinin, gibberellins and ethylene in aeroponically grown sun•flower plants. 1. *Plant Growth Regul.* 4:139-51.

ISAAA. Executive Summary of Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010 Briefs No 42-2010. Disponível em: <<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/42/default.asp>>. Acesso em: outubro de 2012.

ISAAA. Executive Summary of Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011 Briefs No 42-2010. Disponível em: <<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/42/default.asp>>. Acesso em: outubro de 2012.

ISAASD, 2008. International assessment of agricultural knowledge, science and technology for development: global report. Washington, Island Press, 593p.

ISHITANI M., NAKAMURA T., HAN S.Y., TAKABE T., 1995. Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid. *Plant Mol Biol* 27: 307–315.

JANDA T., SZALAI G., TARI I., PÁLDI E., 1999. Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta* 208:175–180.

JIANG Y., 2009. China's water scarcity. *Journal of Environmental Management* 90:3185–3196.

KAPLAN G., 1981. On the quantitative definition of risk. *Risk Analysis*, v. 1, n.1, p. 11-27.

KAY R., CHAN A., DALY M., MCPHERSON J., 1985. Duplication of the CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236: 1299-1302.

KISHORE G.M., SHAH D.M., 1998. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annu. Rev. Biochem.* 57:627–663.

KOSOVA K., VITAMVAS P., PRASIL I.T., RENAUT J., 2011. Plant proteome changes under abiotic stress - contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *J Proteomics*.

LOTTER D.W., SEIDEL R., LIEBHARDT W., 2003. The performance of conventional and organic cropping systems in an extreme climate year. *American Journal of Alternative Agriculture* 18(2):1–9.

MASOERO F., MOSCHINI M., ROSSI F., PRANDINI A., PIETRI A., 1999. Nutritive value, mycotoxin contamination and in vitro rumen fermentation of normal and genetically modified corn (Cry1A(B)) grown in northern Italy. *Maydica* 44, 205–209.

MCELROY D., ZHANG W., CAO J., WU R., 1990. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *Plant Cell* 2: 163-171.

MOLINA A., BUENO P., MARÍN M.C., RODRÍGUEZ-ROSALES M.P., BELVER A., VENEMA K., 2002. Involvement of endogenous salicylic acid content, lipoxygenase and antioxidant enzyme activities in the response of tomato cell suspension cultures to NaCl. *New Phytol.* 156: 409–415.

MUNNE-BOSCH S., PEÑUELAS J., 2003. Photo- and antioxidative protection, and a role for salicylic acid during drought and recovery in field-grown *Phillyrea angustifolia* plants. *Planta.* 217: 758–766.

NILSEN E.T., ORCUTTE D.M., 1996. Phytohormones and plant responses to stress, in: Nilsen E.T., Orcutte D.M. (Eds.), *Physiology of Plant under Stress: Abiotic Factors*, Wiley, New York, pp. 183–198.

NODARI R.O., GUERRA M.P., 2001. Avaliação de riscos ambientais de plantas transgênicas. *Cadernos de Ciência e Tecnologia*, Brasília 18: 81-116.

PADGETTE S.R., BIEST-TAYLOR N., NIDA D.L., BAILEY M.R., MACDONALD J., HOLDEN L.R., FUCHS R.L., 1996. The composition of glyphosate- tolerant soybean seeds is equivalent to that of conventional soybeans. *J. Nutr.* 126, 702±716.

PAN X., WELTI R., WANG X., 2010. Quantitative analysis of major plant hormones in crude plant extracts by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Nat. Protoc.* 5, 986–992.

PIETERSE C.M.J., LEON-REYES A., VAN DER ENT S., VAN WEES S.C.M., 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* 5: 308–316.

RAMIREZ-ROMERO R., DESNEUX N., DECOURTYE A., CHAFFIOL A., PHAM-DELEGUE M.H., 2008. Does Cry1Ab protein affect learning

performances of the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae)?
Ecotoxicol. Environ. Safety 70, 327–333.

RAO M.V., DAVIS R.D., 1999. Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: the role of salicylic acid. *Plant J.* 17: 603–614.

REID K.E., OLSSON N., SCHLOSSER J., PENG F., LUND S.T., 2006. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biol.*

RICCARDI F., GAZEAU P., DE VIENNE D., ZIVY M., 1998. Protein changes in response to progressive water deficit in maize. *Plant Physiology* 117, 1253–1263.

RICHARD S., MOSTEMI S., SIPAHUTAR H., BENACHOUR N., SÉRALINI G.E., 2005. Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. *Environ. Health Perspect.*, 113, 716–720.

RICHARDS R.A., 2006. Physiological traits used in the breeding of new cultivars for water-scarce environments. *Agricultural Water Management* 80(1–3):197–211.

RIJSBERMAN F.R., 2006. Water scarcity: Fact or fiction? *Agricultural Water Management* 80 (1-3):5–22.

RIVAS-SAN VICENTE M., PLASENCIA J., 2011. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *J. Exp. Bot.* doi: 10.1093/jxb/err031

ROSI-MARSHALL E.J., TANK J.L., ROYER T.V., WHILES M.R., EVANS-WHITE M., CHAMBERS C., 2007. Toxins in transgenic crop

byproducts may affect headwater stream ecosystems. Proceedings of the National Academy of Science;104:16204–8.

SAGSTAD A., SANDEN M., HAUGLAND Ø., HANSEN A.C., OLSVIK P.A., HEMRE G.I., 2007. Evaluation of stress and immune-response biomarkers in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed different levels of genetically modified maize (Bt maize), compared with its near-isogenic parental line and a commercial suprex maize. *Journal of Fish Diseases* 30, 201–212.

SAXENA D., STOTZKY G., 2001. Bt corn has a higher lignin content than non-Bt corn. *Am. J. Bot.* 88, 1704–1706.

SEO H.S., SONG J.T., CHEONG J.J., LEE Y.-H., LEE Y.-W., HWANG I., LEE J.S., CHOI Y.D., 2001. Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:4788-93.

SÉRALINI G.E., CELLIER D., SPIROUX DE VENDÔMOIS J., 2007. New analysis of a rat feeding study with a genetically modified maize reveals signs of hepatorenal toxicity. *Arch Environ Contam Toxicol.*

SÉRALINI G.E., CLAIRE E., MESNAGE R., GRESS S., DEFARGE N., MALATESTA M., HENNEQUIN D., VENDÔMOIS J.S. "Republished Study: Long Term Toxicity of a Roundup Herbicide and a Roundup-Tolerant Genetically Modified Maize," *Environmental Sciences Europe* vol. 26:14. 2014. Available online: <http://www.enveurope.com/content/26/1/14>

SHEVCHENKO A., WILM M., VORM O., MANN M., 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850–858.

SHI Q., ZHU Z., 2008. Effects of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, element contents and antioxidative system in cucumber. *Environ. Exper. Bot.* 63: 317-326.

SIEHL D.L., 1997. Inhibitors of EPSP synthase, glutamine synthetase and histidine synthesis. Pages 37–67 in R. M. Roe, ed. *Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry, and Molecular Biology*. Amsterdam, Netherlands: IOS, 1997.

SMEJKAL G.B., 2005. Protein Staining in Polyacrylamide Gels. In: SMEJKAL, G. B. e LAZAREU, A. *Separation Methods in Proteomics*. Cleveland, p 439-452.

SOPHOCLEUS M., 2010. Review: Groundwater management practices, challenges, and innovations in the High Plains aquifer, USA: Lessons and recommended actions. *Hydrogeology Journal* 18:559–575.

STOTZKY G., 2004. Persistence and biological activity in soil of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*, especially from transgenic plants. *Plant Soil* 266:77–89.

TAYLOR N.L., HEAZLEWOOD J.L., DAY D.A., MILLAR A.H., 2005. Differential impact of environmental stresses on the pea mitochondrial proteome. *Mol Cell Proteomics*; 4:1122–33.

U.S. Drought Monitor (2012). National U.S. Drought Monitor – Disponível em: http://droughtmonitor.unl.edu/archive/20120807/pdfs/total_dm_120807.pdf> Acesso em 26 de novembro de 2012.

VICENT D., LAPIERRE C., POLLET B., CORNIC G., NEGRONI L, ZIVY M., 2005. Water deficits affect caffeate O-methyltransferase, lignification, and related enzymes in maize leaves. A proteomic investigation. *Plant Physiology* 137:949–960.

WAIZBORT R., SOLHA G.C., 2007. Os genes interrompidos: o impacto da descoberta dos íntrons sobre a definição de gene molecular clássico. *Revista da SBHC*, Rio de Janeiro, v. 5, n. 1, p. 63-84.

WALSH L.P., MCCORMICK C., MARTIN C., STOCCO D.M., 2000. Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. *Environ Health Perspect* 108:769–776.

WANDER M., TRAINA S., STINNER B., PETERS S., 1994. Organic and conventional management effects on biologically active soil organic matter pools. *Soil Science Society of America Journal* 58:1130–1139.

WANG S.Y., 1999. Methyl jasmonate reduces water stress in strawberry. *J Plant Growth Regul* 18: 127–134

WASTERNAK C., HAUSE B., 2002. Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 72: 165-221.

WASTERNAK C., KOMBRINCK E., 2010. Jasmonates: Structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. *A.C.S. Chemical Biology.* 5:63-77.

WASTERNAK C., 2007. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann. Bot.* 100: 681-697.

WASTERNAK C., PARTHIER B., 1997. Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends Plant Sci.* 2, 302–307

WILHITE D.A., SVOBODA M.D., HAYES H.J., 2007. Understanding the complex impacts of drought: A key to enhancing drought mitigation and preparedness. *Water Resource Management* 21:763–774.

WILKINS M.R., WILLIAMS K.L., APPEL R.D., HOCHSTRASSER D.F., 1997. Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics, Springer: Berlin.

WILLIAMS G.C., 1957. Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution* 11: 398–411.

WRIGHT S., 1968. *Evolution and the Genetics of Populations*. University of Chicago Press, Chicago.

ZOLLA L., RINALDUCCI S., ANTONIOLI P., RIGHETTI P.G., 2008. Proteomics as a complementary tool for identifying unintended side effects occurring in transgenic maize seeds as a result of genetic modifications. *Journal of Proteome Research* 7: 1850-1861.