



AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA SEIVA APOPLÁSTICA E SIMPLÁSTICA DE PLANTAS TRANSGÊNICAS

Mariana Rosa Pelogia¹ Talita Carla Sanguino²; José Eduardo Gonçalves³

RESUMO: O Brasil é um grande produtor de alimentos e o estado do Paraná se destaca como um dos maiores produtores do Brasil. Algumas culturas ganharam destaques em função de modificações químicas, biológicas e genéticas, dentre estas culturas podemos destacar a soja, o milho e o feijão, entre outras. Os tecidos dos colmos destas plantas consistem dos espaços intercelulares (apoplasto) e o espaço vacuolar (simplast) cuja composição química foi alvo de alguns estudos. As plantas utilizadas foram cultivadas em casa de vegetação na Estação do Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR em Londrina. Os objetivos deste projeto foram realizar a análise dos componentes principais da seiva apoplástica e simplástica de plantas transgênicas e fazer uma comparação entre eles do ponto de vista químico e biológico. A coleta foi realizada através dos internódios dos caules, sendo estes cortados transversalmente. Os fragmentos foram imersos em etanol e após a seiva apoplástica foi extraída por centrifugação. Após, os fragmentos foram prensados para liberação de um fluido, contendo o líquido vacuolar da célula (seiva simplástica). A seiva permaneceu armazenada durante todos os procedimentos da coleta a -80°C até a realização das análises. Os resultados obtidos demonstram que na seiva apoplástica e simplástica o milho transgênico apresentou um aumento significativo na quantidade de açúcares totais, aminoácidos livres e prolina comparado ao do feijão transgênico. Para proteínas totais, na análise da seiva apoplástica o milho apresentou um aumento significativo comparado ao feijão, já na análise da seiva simplástica o milho em comparação ao feijão não apresentou tanta diferença.

PALAVRAS-CHAVES: Avaliação da composição química; planta transgênica; seiva apoplástica e simplástica.

ABSTRACT: Brazil is a major food producer and the state of Paraná presents itself as one of the largest Brazilian producers. Some cultures gained relevance due to chemical, biological and genetic modifications, such as soy, corn and bean. The culm tissues of these plants consist of the intercellular spaces (apoplast) and the vacuolar space (symplast) whose composition has been subject of some studies. The utilized plants were cultivated in the vegetation house of the Agronomic Institute of Paraná (IAPAR) Station in Londrina. The objectives of this project were to perform the analysis of the main elements of the apoplastic and symplastic sap of transgenic plants and make a comparison between them regarding a chemical and biological perspective. The collection has been performed through transversal cuts of stalks internodes. The fragments have been immersed in ethanol and later on the apoplastic sap was extracted through centrifugation. Then, the fragments were pressed for the fluid liberation, presenting the cell vacuolar liquid (symplast sap). The sap remained stored at a temperature of -80 Celsius degrees during all the collecting procedures until the performance of the analysis. The results obtained demonstrated that in the apoplastic and symplastic sap the transgenic corn presented a significant increase on the quantity of total sugars, free amino acids and proline when compared to those of the transgenic bean. For total proteins, the analysis of apoplastic sap of the corn presented a significant increase when compared to the bean. Regarding the symplastic sap analysis, the corn didn't present significant differences when compared to the bean.

KEYWORDS: Chemical composition assessment; transgenic plant; apoplastic and symplastic sap.

Anais Eletrônico

VIII EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar
UNICESUMAR – Centro Universitário Cesumar
Editora CESUMAR
Maringá – Paraná – Brasil

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar, o milho, a soja, o trigo são culturas de grande importância econômica no mundo. Estas plantas podem ser cultivadas em regiões tropicais e subtropicais de mais de 70 países, sendo o Brasil um dos maiores produtores mundial destas culturas (OIA, 2006). Somente o setor sucroalcooleiro responde por um faturamento anual da ordem de US\$ 7 bilhões (UNICA, 2006). Atualmente, a maioria das variedades cultivadas são o resultado do cruzamento interespecífico entre as espécies convencionais e selvagens.

Toda cultura agrícola são influenciadas por um grande número de fatores ambientais que afetam negativamente seu crescimento, metabolismo e produtividade. Seca, salinidade, baixas e altas temperaturas, inundações, poluentes e radiação são os fatores de estresse mais importantes (LAWLOR, 2002). No Brasil, dentre estes fatores, o estresse hídrico é o que frequentemente mais influencia de forma negativa a produtividade destas culturas. Assim o déficit hídrico influencia de maneira direta o crescimento e a altura final e, conseqüentemente, a produção (GASCHO; SHIH, 1983, SUGIHARTO, 2004).

Plantas submetidas ao déficit hídrico acumulam prolina nas células, o que resulta em decréscimos no potencial osmótico (s). A prolina também está envolvida na proteção de estruturas celulares, e de vários processos metabólicos (RATHINASABAPATHI et al., 2000; KISHOR et al., 2005). Além disso, a prolina pode atuar como um removedor de espécies reativas de oxigênio (ROS) (BOWLER et al., 1992; TSUGANE et al., 1999). Desta forma, o aumento da síntese de prolina em plantas pode auxiliar na tolerância ao estresse oxidativo.

Uma alternativa para criar novas plantas tolerantes ao déficit hídrico seria a utilização da transformação genética. Além disso, esta ferramenta viabilizaria o ganho de informações para o melhor entendimento dos mecanismos que envolvem a tolerância ao estresse. O uso desta tecnologia abre oportunidades para o aumento da tolerância pela incorporação de genes envolvidos na proteção ao estresse de alguma fonte dentro de plantas importantes para a agricultura.

Assim, o desenvolvimento de plantas com a expressão do transgene dirigida por promotores induzidos por stress pode ser uma estratégia promissora para superar possíveis danos causados pelo acúmulo de prolina e manter produtividade em regiões afetadas por períodos de falta de água ou por doenças.

2 METODOLOGIA

2.1 Análises

2.1.1 Açúcares total

A dosagem de açúcares total foi realizada com concentração de 50 μ g/mL e analisados segundo o método colorimétrico do fenol-acido sulfúrico (DUBOIS; GILES; HAMILTON, 1956). Adicionou-se 1mL dessas soluções em tubos de ensaio, 0,5mL da solução reagente A (5g de fenol em 100mL de água q.s.p), 2,5mL da solução B (ácido sulfúrico concentrado) sobre a solução com agitação vigorosa. Estas soluções foram aquecidas em banho-maria durante 10 min., e resfriadas por 15 mim. Para as leituras em 490nm utilizou-se um espectofotômetro BEL PHOTONICS 2000 UV. A curva padrão de glicose foi na concentração 10-55 μ g/mL

2.1.1 Aminoácidos livres

A determinação de aminoácidos livres foi realizada pelo método colorimétrico empregando o reagente de ninidrina (MAGNÉ AND LARHER, 1992), à concentração da amostra foi de 1.000µg/mL. Colocou-se em tubos de ensaio 0,5mL de tampão citrato 0,2 M – pH 4,6 (21,008g de ácido em 200mL de água destilada, 200mL de NaOH 1 N, água q.s.p. 500mL), 1mL das soluções das seivas e 1mL de solução de ninidrina (1g de ninidrina, 0,03g de ácido ascórbico em etilenoglicol monometil éter q.s.p. 100mL). Após agitação, os tubos foram aquecidos em um banho fervente por 15 min., resfriados em temperatura ambiente e adicionou-se 3mL de solução hidroetanólica 60% como diluente. Fez-se a leitura em 570nm e a curva de calibração foi com padrão de L-leucina na concentração de 10-100µg/mL.

2.1.2 Prolina livre

A determinação de prolina livre foi realizada pelo método colorimétrico empregando o reagente de ninidrina (MAGNÉ; LARHER, 1992) na concentração de 50.000µg/mL. Colocou-se em tubos de ensaio 0,5ml das soluções de seivas, 2mL de solução de ninidrina (1g de ninidrina em ácido acético: água 60: 40 v/v q.s.p. 100mL). Após agitação, os tubos foram aquecidos em banho fervente por 1 h, resfriados a temperatura ambiente e adicionou-se 5mL de tolueno. Seguiu-se 15 segundos de agitação vigorosa e as fases foram separadas. Retirou-se a fase superior para leitura, sendo esta estável por 24 horas. A leitura foi em 520 nm e a curva padrão de L-prolina na concentração de 10-60µg/mL.

2.1.3 Proteínas totais

A dosagem de proteínas totais foi realizada pela preparação de uma solução na concentração de 1000µg/mL e quantificadas pelo método de HARTREE (1972). Colocou-se em tubos de ensaio, 1mL dessas soluções, 0,9mL do reagente A (2g de tártaro duplo de sódio e potássio, 100g de Na₂CO₃ em 500mL de NaOH 1 mol/L, q.s.p. 1000mL água destilada). Colocou no banho-maria a 50°C durante 10 min. Em seguida foram resfriadas até a temperatura ambiente e adicionou-se 0,1mL do reagente B (2g de tártaro duplo de sódio e potássio, 1g de CuSO₄. 5H₂O em 90mL de água destilada e 10mL de NaOH 1 mol/l), permanecendo 10 min. em temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 3mL do reagente C (1mL do reagente de Folin Ciocalteau 2 N diluído em 15mL de água destilada), e as soluções permaneceram em banho-maria a 50°C por 10 min. Resfriou-se até temperatura ambiente. A presença de proteínas foi visualizada pelo aparecimento de uma coloração arroxeada. A curva padrão foi realizada em 650 nm com soroalbumina bovina de 10-100µg/mL.

2.1.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C foram realizados no Departamento de Química-UEM e obtidos em espectrômetro VARIAN, modelo Mercury Plus, operando a 300,059 MHz para o núcleo de ¹H e 75,457 MHz para o núcleo de ¹³C. também foram obtidos espectros DEPT e bidimensionais, HMBC, HMQC e COSY, os quais foram utilizados como auxílio nas atribuições dos deslocamentos químicos (δ) de ¹H e ¹³C. os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C das amostras foram obtidos utilizando-se como solvente a água deuterada (D₂O).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

a. DETERMINAÇÃO DE MASSA SECA

Para o milho transgênico, o valor encontrado para a massa seca foi de 31,68 % e para o feijão transgênico 47,95%. Segundo WACLAWOVSKY et al, 2010 , rendimentos comerciais são relatados com base no peso fresco como uma tentativa de corrigir a quantidade de matéria.

b. DETERMINAÇÕES DE MASSA SECA DAS SEIVAS APOPLÁSTICA E SIMPLÁSTICA

Para o milho transgênico, o valor encontrado a partir da massa seca foi de 5.74 % e 15.2% para o feijão transgênico. Os valores encontrados reiteram um maior rendimento do feijão transgênico na obtenção das seivas em relação ao milho, o volume de fluido do apoplasto do feijão transgênico encontrado na seiva apoplástica teve um rendimento maior que do milho transgênico.

c. ANÁLISE QUÍMICA DAS SEIVAS

Açúcares totais

Na análise da seiva apoplástica, os resultados foram de $44,65 \pm 0,66$ mg de açúcares totais/g de milho transgênico e $28,27 \pm 0,99$ mg de açúcares totais/g de feijão transgênico.

Na análise da seiva simplástica, os resultados obtidos foram de $94,21 \pm 0,88$ mg de açúcares totais/g de milho transgênico e $72,56 \pm 5,18$ mg de açúcares totais/g de feijão transgênico.

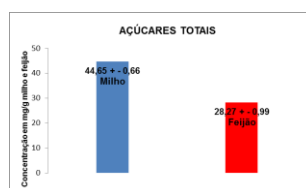


Figura 1. Comparação entre as concentrações de açúcares totais de seivas apoplástica do milho e feijão transgênicos.

Aminoácidos livres

Na análise da seiva apoplástica do milho transgênico o resultado foi de $1,15 \pm 0,04$ mg de aminoácido/g de milho e do feijão transgênico foi de $0,58 \pm 0,003$ mg de aminoácido/g de feijão.

Na análise da seiva simplástica, os resultados obtidos foram de $2,93 \pm 0,02$ mg de aminoácido/g de milho transgênico e $2,02 \pm 0,02$ aminoácido/g de feijão transgênico.

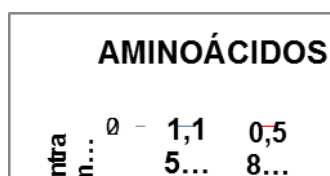


Figura 2. Comparação entre as concentrações de aminoácidos de seivas apoplástica do milho e do feijão transgênicos.

Prolina livre

Na análise de prolina na seiva apoplástica determinado para milho transgênico foi de 0.027 ± 0.002 mg de prolina/g e do feijão transgênico foi de 0.015 ± 0.002 mg de prolina/g de feijão.

Na análise da seiva simplástica, os resultados obtidos foram de 0.088 ± 0.031 mg de prolina/g de milho transgênico e 0.046 ± 0.021 prolina/g de feijão transgênico.

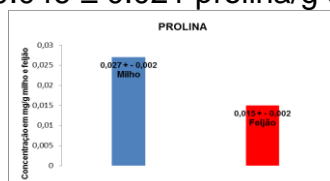


Figura 3. Comparação entre as concentrações de prolina das seivas apoplásticas do milho e do feijão transgênicos.

Proteínas totais

Na análise da seiva apoplástica para o milho transgênico as proteínas totais foi de $1,21 + 0,07$ mg/g e para o feijão transgênico de $0,55 + 0,05$ mg de proteína/g de feijão.

Para as seivas simplásticas do milho e feijão transgênicos; os valores obtidos foram de $2.19 + 0.26$ e $1.88 + 0.21$ mg de proteína/g de milho e feijão transgênicos, respectivamente.

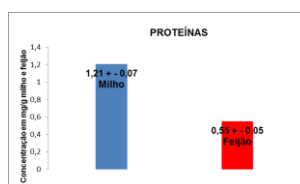


Figura 4. Comparação entre as concentrações de proteínas de seivas apoplástica milho e feijão transgênicos.

Todos os resultados foram submetidos ao teste T demonstraram que os valores são significamente diferentes para um intervalo de confiança de 95%. Os resultados mostraram um aumento significativo na quantidade de açúcares total e aminoácidos presente no milho comparado ao feijão, visto tanto na seiva apoplástica como simplástica. Os resultados observados de prolina e proteínas totais para seiva apoplástica mostraram-se aumentado para o milho comparado com o feijão, já para a seiva simplástica os resultados mostraram-se similares.

RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

As interpretações dos dados de RMN nos levaram à molécula de sacarose (Figura 5), que se trata de um dissacarídeo muito comum entre as espécies vegetais e este se classifica como componente principal (FERREIRA et al., 2001). A identificação da sacarose, isolada das seivas do milho e feijão transgênicos, foi realizada com base nos dados de RMN de ^1H e ^{13}C , em comparação com àqueles obtidos nas mesmas condições, a partir da sacarose de origem comercial (PARADA et al., 2001).

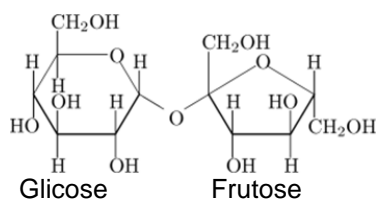


Figura 5 - Estrutura da sacarose

Anais Eletrônico

Analisando o espectro de RMN de ^1H , se verificou sinais na região de açúcar entre δH 3.2 e 4.0, além do sinal atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono anomérico em δH 5.46.

No experimento DEPT para todas as seivas, registraram-se 12 sinais de carbono, sendo três sinais atribuídos aos carbonos metilênicos δCH_2 -6 (62.98-63.09), C-1' (64.19-64.33) e C-6' (65.26-65.33) e um quaternário em δC -2' (106.58-106.65), que confirmaram a estrutura do dissacarídeo sacarose.

Não foi localizado nenhum sinal para o aminoácido prolina em relação ao padrão comercial, visto que pela espectrofotometria ele se encontrava em concentração muito baixa nas seivas.

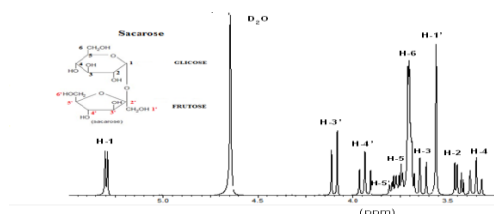


Figura 6 - Espectros de RMN ^1H da sacarose e das seivas apoplásticas do milho e feijão transgênicos.

Estes espectros evidenciam a semelhança entre as seivas apoplásticas do milho e do feijão transgênicos com o espectro da molécula de sacarose sintética.

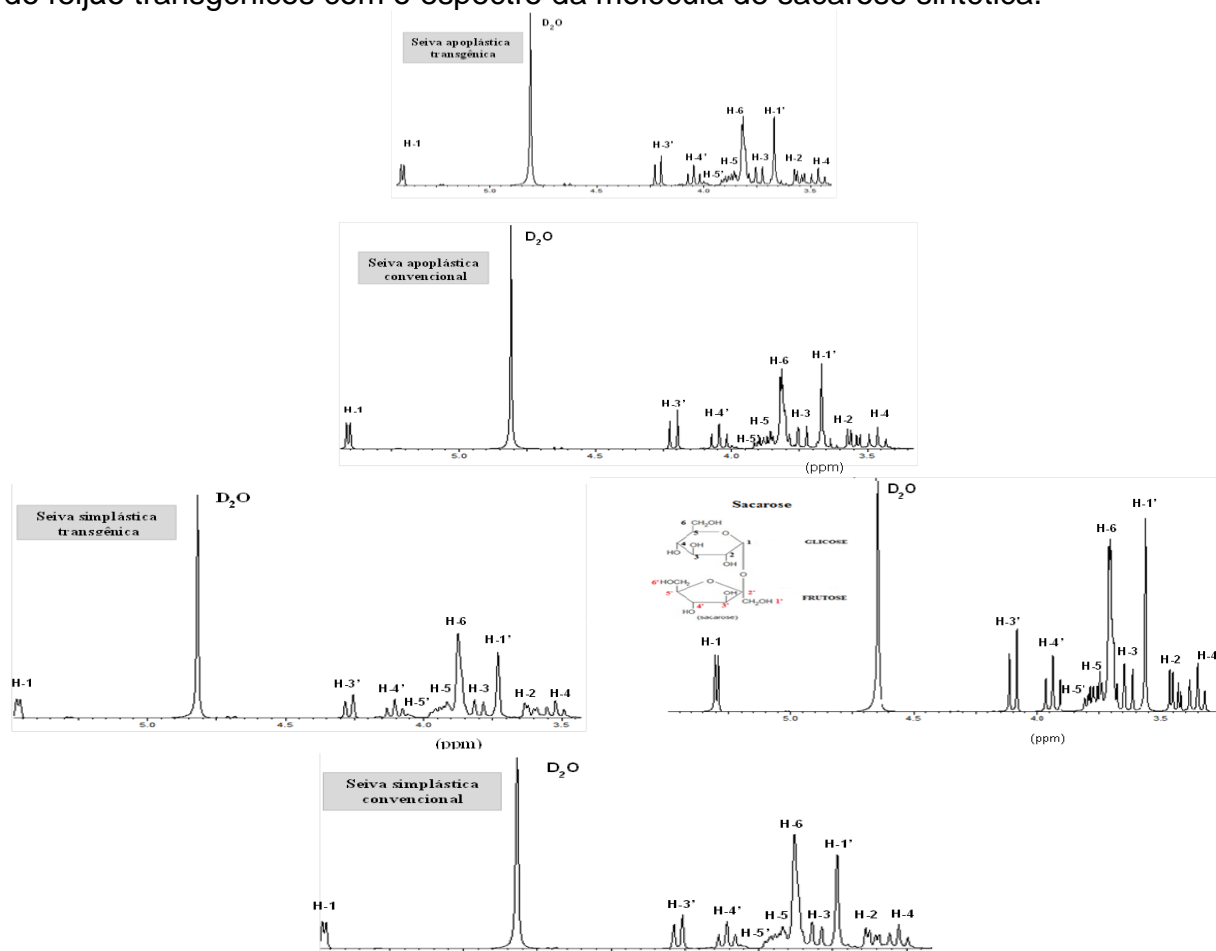


Figura 7- Espectros de RMN ^1H da sacarose e das seivas simplásticas milho e feijão transgênicos.

Anais Eletrônico

Estes espectros de RMN ^1H evidenciam a semelhança entre as seivas simplásticas do milho e do feijão transgênicos com o espectro da molécula de sacarose sintética.

Tabela 1 - Deslocamentos químicos (ppm) de ^{13}C , para a sacarose e seivas apoplástica e simplástica do milho e feijão transgênicos dissolvida em água deuterada (D_2O).

Composto	Atribuição	Sac	Milho SAT	Feijão SAT	Milho SST	Feijão SST
Sacarose (Sac)	CH-1 (Gli)	95.13	95.07	95.07	95.15	95.15
	CH-2	72.18	72.09	72.09	72.19	72.19
	CH-3	74.03	73.96	73.96	74.04	74.04
	CH-4	75.36	75.29	75.28	75.37	75.37
	CH-5	75.53	75.44	75.44	75.53	75.53
	CH ₂ -6	63.08	62.98	62.98	63.09	63.09
	CH ₂ 1'(Fru)	64.32	64.19	64.19	64.33	64.33
	CH-2'	106.64	106.58	106.58	106.65	106.65
	CH-3'	79.38	79.25	79.25	79.39	79.39
	CH-4'	76.96	76.86	76.86	76.97	76.97
	CH-5'	84.32	84.26	84.27	84.32	84.32
	CH ₂ -6'	65.32	65.26	65.26	65.33	65.33

*Sac=Sacarose, SAT=Seiva apoplástica transgênica, SST=Seiva simplástica transgênica.

A tabela demonstra os valores de deslocamentos atribuídos aos carbonos das seivas apoplástica e simplástica do milho e feijão, com o composto de sacarose comercial, e verifica a pouca ou ausência de diferenças entre eles.

Tabela 2 - Deslocamentos químicos (ppm) de ^1H , para a sacarose e seivas apoplástica e simplástica do milho e feijão dissolvida em água deuterada (D_2O)

Composto	Atribuição	Sac	Milho SA	Feijão SA	Milho SS	Feijão SS
Sacarose	CH-1(Gli)	5.46	5.40	5.40	5.45	5.45
	CH-2	3.63	3.60	3.60	3.63	3.63
	CH-3	3.81	3.76	3.75	3.81	3.81
	CH-4	3.52	3.46	3.46	3.51	3.52

Anais Eletrônico

VIII EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar
UNICESUMAR – Centro Universitário Cesumar
Editora CESUMAR
Maringá – Paraná – Brasil

CH-5	3.91	3.86	3.86	3.91	3.91
CH ₂ -6	3.86	3.80	3.81	3.86	3.86
CH ₂ 1'(Fru)	3.73	3.70	3.67	3.72	3.73
CH-2'	---	---	---	---	---
CH-3'	4.25	4.20	4.20	4.25	4.25
CH-4'	4.10	4.05	4.05	4.10	4.10
CH-5'	3.97	3.92	3.91	3.97	3.97
CH ₂ -6'	3.87	3.82	3.82	3.87	3.87

*Sac=Sacarose, SA=Seiva apoplástica, SS=Seiva simplástica.

A tabela demonstra os valores de deslocamentos atribuídos ao hidrogênio das seivas apoplástica e simplástica do milho e do feijão transgênicos, com o composto de sacarose comercial, e verifica-se pouca ou ausência de diferenças entre eles.

4 CONCLUSÃO

Verificaram-se diferenças na verificação da seiva simplástica ocorreram mudanças somente nos conteúdos de açúcares totais e aminoácidos totais.

Se faz necessária uma investigação maior no campo da bioquímica e genética para verificar a manipulação genética nestas culturas (milho e feijão) para melhor elucidação dos mecanismos referentes às alterações que as mesmas veem sofrendo durante os últimos anos, assim novos estudos serão realizados nas culturas de milho e feijão para fazer uma avaliação entre as plantas geneticamente modificadas com as plantas que não sofreram mudanças genéticas.

5 REFERÊNCIAS

BOWLER, C.; VAN MONTAGUE, M.; INZE, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** v.43, p.83-116, 1992.

DONG Z, CANNY MJ, MCCULLY M, REBOREDO MR, FERNA'NDEZ C, ORTEGA E, RODE'S R. **A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems: a new role for the apoplast.** **Plant Physiol**, v.105, p. 1139-47, 1994.

DUBOIS, M; GILES, K.A.; HAMILTON, J.K. **Colorimetric method for determination of sugars and related substances.** **Analytical Chemistry**. v.28, p.350-356,1956.

GASCHO, G.J.; SHIH, S.F. Sugarcane. In: TEARE, I.D.; PEET, M.M. (Ed.). **Crop-Water relations**. New York: John Wiley, p.445-479, 1983.

KISHOR, P.B.K. et al., **Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance.** **Current Science**, v.88, p.424-438, 2005.

LAWLOR, D.W. The effects of water deficit on photosynthesis. In: Smirnoff N (ed), **Environmental and plant metabolism-flexibility and acclimation**, Bios Scientific Publisher, Oxford. pp.129-160, 1995.

OIA 2006 <http://www.isosugar.org/>, capturada em 10/05 2006.

RATHINASABAPATHI, B.; SIGUA, C.; HO, J.; GAGE, D.A. **Osmoprotectant - alanine betaine synthesis in the Plumbaginaceae: S-adenosyl-l-methionine dependent N-methylation of -alanine to its betaine is via N-methyl and N,N dimethyl-alanines.** *Physiologia Plantarum* v.109, p.225-231. 2000.

SUGIHARTO, B. **Biochemical and molecular studies on sucrose-phosphate synthase and drought inducible-protein in sugarcane (*Saccharum officinarum*)** *Journal ILMU DASAR* v.5, p.62-67, 2004.

TSUGANE, K.; KOBAYASHI, K.; NIWA, Y.; OHBA, Y.; WADA, K.; KOBAYASHI, H. **A Recessive Arabidopsis Mutant That Grows Photoautotrophically under Salt Stress Shows Enhanced Active Oxygen Detoxification.** *Plant Cell* v.11, p.1195-1206, 1999.
UNICA. 2006. <http://www.unica.com.br/>, capturada em 10/05 2006.