



## AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA SEIVA APOPLÁSTICA E SIMPLÁSTICA DE PLANTAS CONVENCIONAIS

*Jéssica Cristina Stefanutto<sup>1</sup>; José Eduardo Gonçalves<sup>2</sup>*

**RESUMO:** O feijão e o milho são culturas de grande importância econômica mundial. São cultivados em regiões tropicais e subtropicais de mais de 90 países. Uma ferramenta muito importante atualmente é o uso da biotecnologia como a transformação genética. Ela é empregada na obtenção de plantas mais resistentes aos fatores que acarretam perdas na produção, principalmente estresses abióticos. Os tecidos dos colmos desta planta consistem do espaço intercelular (apoplasto) e espaço vacuolar (simplasto), e desses tecidos se obtém as seivas apoplástica e simplástica. A partir dessas seivas se faz a determinação da composição química dos componentes majoritários, e verifica suas possíveis relações com a modificação genética empregada. Há o propósito de se obter maior conhecimento sobre o impacto de organismos geneticamente modificados (OGM) sobre o ambiente e sobre a sanidade alimentar, contribuindo com a melhoria na produção de feijão e milho e diminuindo os possíveis impactos ambientais causados pelos OGM. As amostras estudadas demonstraram mudanças no perfil químico das seivas de feijão e milho, nas concentrações de carboidratos, aminoácidos, proteínas e prolina em todas as determinações do conteúdo da seiva apoplástica. Deste modo, evidencia-se que a mudança empregada está correlacionada a vários fatores condicionantes para o desenvolvimento da planta.

**PALAVRAS-CHAVE:** Análise química, seiva simplástica e apoplástica, OGM.

### 1 INTRODUÇÃO

No Brasil existe uma preocupação crescente com a qualidade da alimentação servida aos alunos dentro das escolas para que os mesmos consumam alimentos saudáveis, uma vez que temos um aumento da obesidade e todos os problemas de saúde relacionados. Uma alimentação saudável está relacionada aos tipos de alimentos consumidos e também com a qualidade destes alimentos.

Com o aumento da população mundial, tem-se um aumento no consumo de alimentos e uma produção cada vez maior para suprir a demanda. Neste sentido existe uma busca frequente para aumentar a produção de alimentos através da adição de produtos químicos ou através de melhoramentos genéticos (transgênicos).

O uso desta tecnologia abre oportunidades para o aumento da tolerância pela incorporação de genes envolvidos na proteção de alguma fonte dentro de plantas

<sup>1</sup> Acadêmica do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR. Maringá – Paraná. Programa de Bolsas de Iniciação Científica do Cesumar (PROBIC). jessica\_cristinna@hotmail.com

<sup>2</sup> Orientador e Professor do Programa de Mestrado em Promoção da Saúde do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR. jeroncal@cesumar.br



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

Em plantas superiores, o transporte do floema oferece a maioria dos nutrientes necessários para o crescimento e armazenamento. Cerca de 90% da biomassa vegetal, são transportados como açúcares e aminoácidos num fluxo de solução, em que é impelido do floema por força hidrostática gerada pela diferença de pressão entre fonte (ex. folha) até os órgãos dreno (ex. caule) através de caminhos do floema.

A via simplástica é característica da maioria dos caminhos de carregamento e descarregamento, e em algumas circunstâncias, pode ser interrompida pela via apoplástica.

Açúcares como a rafinose parecem ser carregados pela via simplástica. Enquanto a sacarose e certos aminoácidos são carregados em veias menores dos apoplastos da folha por transportadores localizados na membrana plasmática do complexo elemento crivado/célula companheira (LALONDE et al, 2003).

A sacarose é o principal produto da fotossíntese em muitas plantas superiores. Ela é transportada a partir do tecido de origem através do floema para os diversos tecidos drenos para apoiar o crescimento, desenvolvimento e reprodução da planta (FELIX et al, 2009).

Os tecidos dos colmos da cana-de-açúcar, milho e feijão consistem de espaços intercelulares (apoplasto) e o espaço vacuolar (simplasto), onde se encontra a seiva (DONG et al, 1994). O apoplasto está envolvido com transportes de minerais a curta e longa distância, importantes para a nutrição mineral da planta. Há também a presença de bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio, envolvidas no crescimento da cana-de-açúcar, milho e feijão (SATTELMACHER, 2001).

A composição química do fluido apoplástico e simplástico foi alvo de estudos anteriores, estes estudos deram enfoque a associação de bactérias fixadoras de nitrogênio localizadas no meio rico em sacarose (líquido do apoplasto) e suas quantidades no volume total líquido. Houve a verificação das relações de simbiose nessas culturas em solos pobres e ricos em nitrogênio. E em relação aos carboidratos, a determinação do acúmulo de sacarose nesses espaços livres e seus mecanismos de



transporte foram elucidados. Além de identificação e quantificação de compostos nitrogenados tais como proteínas, aminoácidos, amônio, nitratos, nitritos nas seivas dos caules (GLASZIOU; GAYLER, 1972; DONG et al, 1994; BALDANI et al, 1997; TEJERA et al, 2006).

Atualmente, ao nosso conhecimento, as análises dos componentes majoritários em cana-de-açúcar transgênica tem sido realizadas somente nas folhas, e o presente trabalho vem contribuir para discutir a presença desses componentes químicos no caule (parte da cana-de-açúcar que é utilizada tanto para a produção de alimento, combustível ou energia). Ocorrendo a possibilidade de verificar se a transgenia para uma expressão isolada tem influência na planta como um todo. Este estudo enfoca mais as alterações químicas nas concentrações dos componentes primários das plantas. Entretanto, possibilita uma grande abertura para o estudo das razões metabólicas para qualquer tipo de alteração ocorrida em um organismo geneticamente modificado (OGM).

Neste contexto; o presente trabalho realizou a análise dos componentes principais da seiva apoplástica e simplástica de feijão e milho. Realizou-se a análise de componentes como açúcares totais, aminoácidos livres, prolina livre e proteínas totais. Em especial o componente prolina dessas plantas, possibilitando uma comparação do ponto de vista químico, com o propósito de se obter conhecimento sobre o impacto de organismos geneticamente modificados (OGM).

## 2 OBJETIVOS

Determinar a composição química das seivas apoplástica e simplástica de milho e feijão transgênico e convencional; Verificar a interferência da transformação genética na síntese e translocação dos componentes majoritários das plantas.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

O material vegetal foi gentilmente cedido pelo Instituto Agronômico do Paraná – IAPAR de Londrina. Para este estudo foram utilizadas plantas de feijão e milho (convencionais). Estas plantas foram cultivadas em casa de vegetação na Estação do Instituto Agronômico do Paraná – IAPAR em Londrina, sob as mesmas condições.

As plantas estavam sob a responsabilidade do Pesquisador Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira. Este material foi coletado no IAPAR, se retirou as folhas, e os colmos foram cortados entrenós e congelados para transporte e armazenamento. Armazenou-se em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração.

#### 3.2 EXTRAÇÃO DAS SEIVAS

A extração do fluido apoplástico das plantas de feijão e milho foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por DONG et al,1994. Os entrenós dos caules foram cortados ao meio. Os fragmentos dos caules foram imersos em etanol por 10 minutos em recipiente de vidro refratário dentro de capela de exaustão, depois foram inflamados. Após este tratamento a seiva apoplástica foi obtida por centrifugação a 5.500 rpm por 20 minutos em temperatura de  $0 - 5^{\circ}\text{C}$  (TEJERA et al; 2006).

A seiva extraída foi centrifugada para retirada de sujidades decorrentes da queima. E a seguir foi armazenada em freezer. Após a centrifugação, os fragmentos resultantes, foram prensados em centrífuga para liberação da seiva simplástica, (líquido vacuolar da célula), e foi filtrada em gaze. Para retirada do material lignificado, fez-se esta última centrifugação a 9500 rpm por 10 min. em temperatura de  $0 - 5^{\circ}\text{C}$  e congelou-se. As amostras resultantes das extrações foram liofilizadas e armazenadas em freezer para posteriormente serem utilizadas nas análises químicas.



### 3.3 DETERMINAÇÃO DE MASSA SECA DOS COLMOS

Retirou-se amostras de massa conhecida e congelou-se. Estas amostras sofreram liofilização até a obtenção de material estável.

### 3.4 DETERMINAÇÃO DE MASSA SECA DAS SEIVAS APOPLÁSTICA E SIMPLÁSTICA

As seivas apoplástica e simplástica foram congeladas e passaram pelo processo de liofilização até obtenção de material seco estável.

### 3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 3.5.1 Métodos Espectrofotométricos

As amostras foram analisadas em triplicatas e tiveram as médias calculadas para obtenção dos resultados.

A dosagem de açúcares totais foi realizada pela preparação de uma solução das seivas apoplástica e simplástica em concentração de 50 µg/mL e analisados segundo o método colorimétrico do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS; GILES; HAMILTON, 1956). Adicionou-se 1 mL dessas soluções em tubos de ensaio e a seguir 0,5 mL da solução reagente A (5 g de fenol em água q.s.p. 100mL). Agitou-se por 10 segundos. A seguir adicionou-se 2,5 mL da solução reagente B (ácido sulfúrico concentrado) sobre a solução com agitação vigorosa. Estas soluções foram aquecidas em banho-maria durante 10 minutos, e a seguir resfriadas por 15 minutos. A presença de açúcares foi visualizada pelo aparecimento da cor amarelo alaranjado. Para as leituras em 490 nm utilizou-se espectrofotômetro Varian Cary Modelo 1E UV-VIS. A curva padrão de glicose foi construída na concentração 10-60µg/mL.



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

A determinação de prolina livre foi realizada pelo método colorimétrico empregando o reagente de ninidrina (MAGNÉ; LARHER, 1992) e o preparo das seivas apoplástica e simplástica se deu em concentração de 50.000 µg/mL. Colocou-se em tubos de ensaio 0,5 mL das soluções de seivas. Sobre esses, adicionou-se 2 mL de solução de ninidrina (1 g de ninidrina em ácido acético: água 60: 40 v/v q.s.p. 100 mL). Após agitação, os tubos foram aquecidos em banho fervente por 1 hora, resfriados a temperatura ambiente e adicionou-se 5 mL 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 realizada em 520 nm e a curva padrão de L-prolina na concentração de 10-60µg/mL.

A dosagem de proteínas totais foi realizada pela preparação de uma solução das seivas apoplástica e simplástica em concentração de 1000 µg/mL e quantificadas pelo método de HARTREE (1972). Colocou-se em tubos de ensaio, 1 mL dessas soluções. Sobre esse 1 mL, adicionou-se 0,9 mL do reagente A (2 g de tartarato duplo de sódio e potássio, 100 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em 500 mL de NaOH 1 mol/L, q.s.p 1000 mL água destilada). As soluções permaneceram em banho-maria a 50 °C durante 10 min. Em seguida foram resfriadas até a temperatura ambiente e adicionou-se 0,1 mL do reagente B (2 g de tartarato duplo de sódio e potássio, 1 g de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O em 90 mL de água destilada e 10 mL de NaOH 1 mol/L), permanecendo 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 3 mL do reagente C (1 mL de reagente de Folin Ciocalteau 2 N diluído em 15 mL de água destilada), e as soluções permaneceram em banho-maria a 50



°C por 10 minutos. Resfriou-se até temperatura ambiente. A presença de proteínas foi visualizada pelo aparecimento de uma coloração arroxeada. A curva padrão de soroalbumina bovina estava na concentração de 10-100µg/mL. Realizou-se a leitura em 650 nm.

### 3.5.2 Método Espectroscópico

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ ) e Carbono treze (RMN de  $^{13}\text{C}$ ) foram realizados no Departamento de Química-UEM e obtidos em espectrômetro VARIAN, modelo Mercury Plus, operando a 300,059 MHz para o núcleo de  $^1\text{H}$  e 75,457 MHz para o núcleo de  $^{13}\text{C}$ . Também foram obtidos espectros DEPT e bidimensionais, HMBC, HMQC e COSY, os quais foram utilizados como auxílio nas atribuições dos deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  das amostras foram obtidos utilizando-se como solvente a água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em ppm.

## 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa STATISTICA 8.0. Sendo a comparação entre as médias efetuada pelo teste T para amostras independentes em nível de 5% de significância.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 DETERMINAÇÃO DE MASSA SECA

Para o milho, o valor encontrado para a massa seca foi de 31,00 % e para o feijão 47,48%. Segundo WACLAWOVSKY et al, 2010 , rendimentos comerciais são relatados com base no peso fresco como uma tentativa de corrigir a quantidade de matéria. A



quantidade de água e biomassa está condicionada ao tipo de cultivar e estação do ano em que é colhida, de modo que os cálculos devem se basear empiricamente, determinou-se que os dados são bastante consistentes.

Por outro lado, o teor de fibra (massa seca insolúvel em água) é uma característica da cultivar, em que os fitomelhoristas praticamente descartam variedades obtidas que não superem 10,5% de fibra. Além do fator condicionante ambiental, os ambientes como solo, umidade, idade ou corte, exercem grande influência na formação das partes moles (75% do colmo, com 8% de fibra e 80% do caldo) e das partes duras (25% do colmo, com 75% de fibra e 75% do caldo) (HORII, 2004).

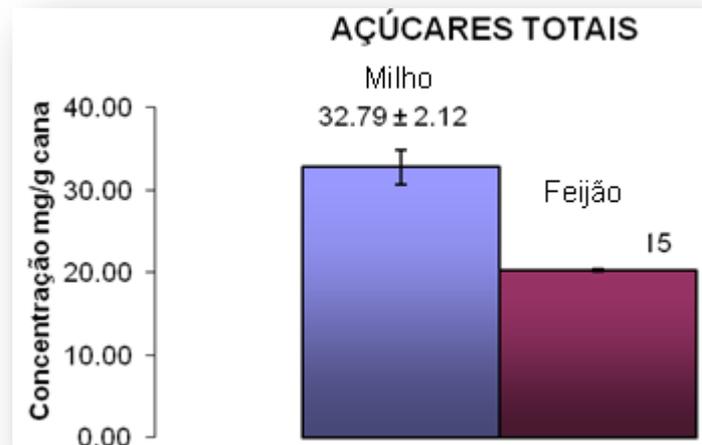
#### 4.2 DETERMINAÇÃO DE MASSA SECA DAS SEIVAS APOPLÁSTICA E SIMPLÁSTICA

Para o milho, o valor encontrado a partir da massa seca foi de 5.23 % e 14.8% para o feijão. Os valores encontrados reiteram um maior rendimento do feijão na obtenção das seivas em relação ao milho, o volume de fluido do apoplasto do feijão encontrado na seiva apoplástica teve um rendimento maior que do milho, em estudos anteriores houve a verificação dos volumes de líquido do apoplasto e conforme descrito havia maior espaço livre em caules de cana maduros (DONG et al, 1994).

#### 4.3 ANÁLISE QUÍMICA DAS SEIVAS

Os açúcares totais foram quantificados por um método colorimétrico. O valor médio de açúcares determinado para a seiva apoplástica foi de  $32.79 \pm 2.12$  mg de açúcares totais/g de milho e para a seiva apoplástica foi de  $20.34 \pm 0.15$  mg de açúcares totais/g de feijão.

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste T demonstraram que os valores são significativamente diferentes para um intervalo de confiança de 95%. Os resultados mostram um aumento significativo na quantidade de açúcares totais presentes no milho comparado ao do feijão.



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

O descarregamento da sacarose (principal açúcar transportado) do floema pode passar através de três compartimentos celulares, compartimento apoplástico ou espaço intercelular, compartimento metabólico ou citoplasma e compartimento de armazenamento ou vacúolo.

Diferentes formas de invertases estão associadas com cada um desses compartimentos metabólicos. Invertases têm sido consideradas como principais reguladores de crescimento das plantas, e mais especificamente da acumulação de sacarose (GAYLER; GLASZIOU, 1972).

A potencial contribuição para a relação fonte-dreno de variação espacial e temporal na expressão de uma variedade de transportadores de açúcar é o principal foco de considerável atenção em acumulação de carboidratos em culturas. Os envolvidos com o metabolismo de sacarose na cana em internodos das plantas maduras têm sido identificados como transportadores de açúcar de renome (CASU et al, 2003).

Os estudos que estão em andamento, estabeleceram e pretendem estabelecer a localização e caracterização funcional de uma série de transportadores de hexose e sacarose (RAE et al.,2005).

Na análise da seiva simplástica, os resultados obtidos foram de  $94.21 \pm 0.88$  mg de açúcares totais/g de milho e  $72.56 \pm 5.18$  mg de açúcares totais/g de feijão. Estes valores foram significantes pelo Teste T, houve o aumento da quantidade de açúcares totais da seiva simplástica do milho em relação à seiva simplástica do feijão.

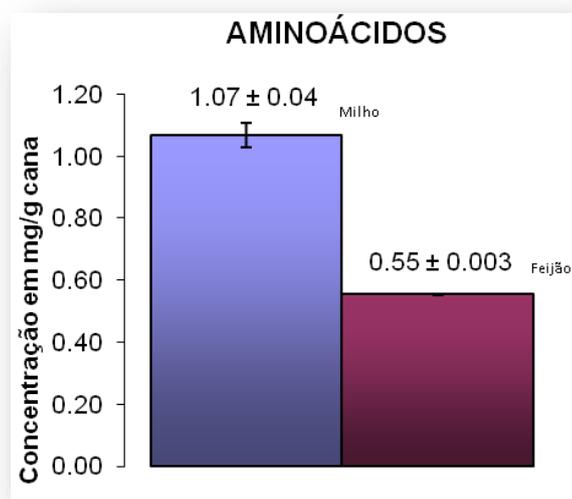
O armazenamento de açúcares totais solúveis se encontra no vacúolo que é conhecido como um importante sítio de armazenamento de produtos de fotossíntese como sacarose e frutanas. A remobilização e quebra desses compostos no vacúolo podem afetar o crescimento, rendimento e valor das culturas gramíneas (RAE, et al, 2009).

Sob certas condições, as partições de carbono para sacarose nos internodos, chega a ser de 50% de seu peso seco (0.7 M) (MOORE,1995). A sacarose composta de carbonos é fixada por fotossíntese e translocada das folhas para vários tecidos dreno e pode ser estocada como sacarose ou particionada entre respiração, incluindo processos catabólicos (glicólise) e anabólico (gliconeogênese).

Considerando a seiva simplástica do milho, houve maior acúmulo de açúcares, e este acúmulo deve estar relacionado com mecanismos moleculares como enzimas catalíticas e transportadores de açúcares.

Os aminoácidos foram quantificados por um método colorimétrico empregando o reagente de ninidrina e o valor médio de aminoácido determinado para a seiva apoplástica do milho foi de  $1.07 \pm 0.04$  mg de aminoácido/g de milho e para a seiva apoplástica fo feijão foi de  $0.55 \pm 0.003$  mg de aminoácido/g de feijão.

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste T demonstraram que os valores são significativamente diferentes para um intervalo de confiança de 95%. Os resultados mostram um aumento significativo na quantidade de aminoácidos presente no milho comparado ao do feijão.



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



Na análise da seiva simplástica, os resultados obtidos foram de  $2.80 \pm 0.01$  mg de aminoácido/g de milho e  $2.00 \pm 0.02$  aminoácido/g de feijão. Estes valores foram significantes pelo teste T.

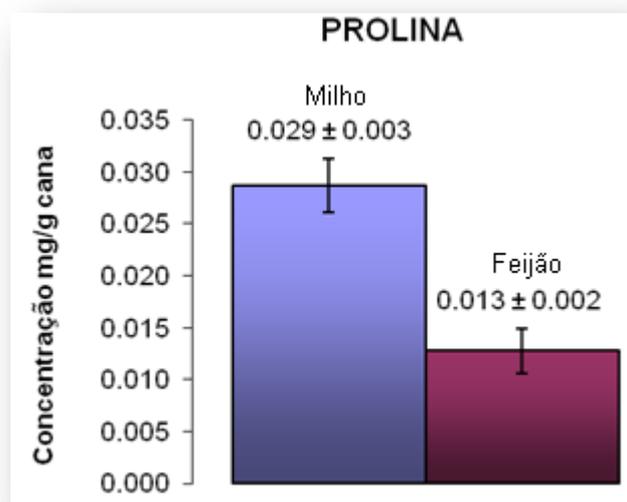
A assimilação de nitrogênio é um processo vital para o controle de crescimento e desenvolvimento da planta. Nitrogênio inorgânico é assimilado como aminoácidos glutamina, glutamato, asparagina e aspartato, servindo como importantes carregadores de nitrogênio em plantas. As enzimas glutamina sintase (GS), glutamato sintase (GOGAT), glutamato desidrogenase (GDH), aspartato aminotransferase (ASpAT), e asparagina sintetase (AS), são responsáveis pela biossíntese destes aminoácidos transportadores. Estudos bioquímicos revelaram a existência de múltiplas para cada uma destas enzimas (LAM et al, 1996). Isto sugere que o aumento de aminoácidos nas plantas estejam relacionados ao sistema enzimático.

O aminoácido prolina foi quantificado por um método colorimétrico empregando o reagente de ninidrina e o valor médio de prolina determinado para a seiva do milho foi de  $0.029 \pm 0.003$  mg de prolina/g de milho e para a seiva apoplástica do feijão foi de  $0.013 \pm 0.002$  mg de prolina/g de feijão.

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste T demonstraram que os valores são significativamente diferentes para um intervalo de confiança de 95%. Os resultados mostram um aumento significativo na quantidade de prolina presente no milho comparado à seiva apoplástica do feijão.

O estresse hídrico induz grandes aumentos na concentração de prolina no floema de alfafa, sugerindo que o aumento na deposição de prolina no ápice radicular em plantas estressadas hidricamente pode, em parte, ocorrer pelo transporte de prolina via floema.

Em termos de significância de acumulação de prolina, a hipótese mais comum considera prolina como um agente protetor para enzimas citosólicas e estruturas de membranas (GIROUSSE; BOURNOVILLE; BONNEMAIN, 1996).



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

Altos níveis de prolina livre têm sido reportados pela modificação genética de várias espécies de plantas e a maioria dos relatos revelam acúmulo somente em condições de estresse. Ela tem se mostrado hábil para indução da expressão gênica (HELLMANN et al. 2000). A prolina desempenharia um papel base na transdução da regulação gênica desempenhado por outros aminoácidos (FAFOURNOUX et al. 2000). Uma função da prolina no desenvolvimento pode ser que ela atue na proteção das células contra danos osmóticos, especialmente em processos de desenvolvimento, nos tecidos que sofrem desidratação espontânea (TROVATO; MATIOLI; COSTANTINO, 2008).

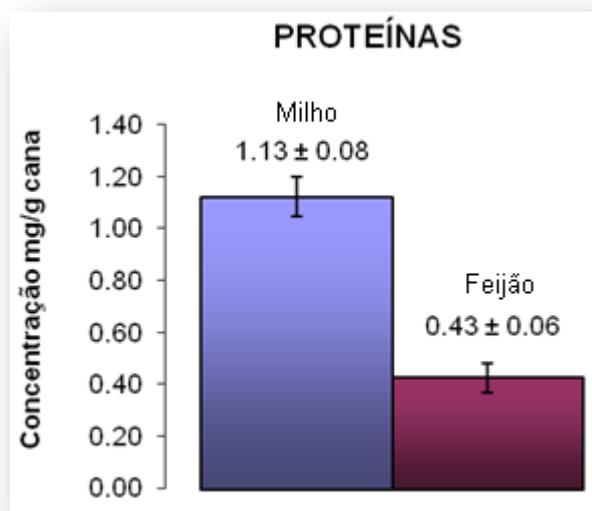
Na análise da seiva simplástica, os resultados obtidos foram de  $0.091 \pm 0.041$  mg de prolina/g de de milho e  $0.049 \pm 0.023$  prolina/g de feijão. Estes valores não foram ghsignificantes pelo teste T.

A concentração de prolina livre acumulada nas plantas varia conforme o estágio vegetativo, tipo de órgão ou tecido e, principalmente entre espécies (KAVI KISHOR et al., 2005). Diante das condições experimentais e dos resultados obtidos observou-se que as concentrações de prolina entre as plantas são similares em termos de seiva simplástica em condições de suprimento de água normais.

As proteínas foram quantificadas pelo método de (HARTREE, 1972) e o valor médio de proteínas determinado para o milho foi de  $1,13 \pm 0,08$  mg/g de milho e para o

feijão de  $0,43 \pm 0,06$  mg de proteína/g de feijão. Os resultados obtidos foram submetidos ao tratamento estatístico e revelam que os valores são significativamente diferentes entre si para um intervalo de confiança de 95%.

As proteínas encontradas no floema incluem proteínas-P filamentosas (as quais estão envolvidas na obstrução dos elementos crivados danificados), as proteínas quinases (proteínas de fosforilação), a tioredoxina (redução dissulfídica), a ubiquitina (degradação de proteínas), as chaperonas (dobramento de proteínas), e os inibidores de proteases (proteção das proteínas do floema contra a degradação e defesa contra os insetos sugadores) (TAIZ; ZEIGER, 2010).



**Figura 4.** Comparação entre as concentrações de proteínas de seivas apoplásticas do milho e do feijão.

O conteúdo de proteína se mostrou mais elevado na seiva apoplástica do milho, evidenciando novamente o papel na via de absorção e acúmulo de nitrogênio, pois a prolina, é obtida do glutamato, que exerce papel fundamental nessa via (LAM et al, 1996).

Para as seivas simplásticas do milho e feijão os valores obtidos foram de  $2,23 \pm 0,28$  e  $1,85 \pm 0,22$  mg de proteína/g de milho e feijão, respectivamente. Os resultados obtidos foram submetidos ao tratamento estatístico e revelaram que os valores não são significativamente diferentes entre si para um intervalo de confiança de 95%.



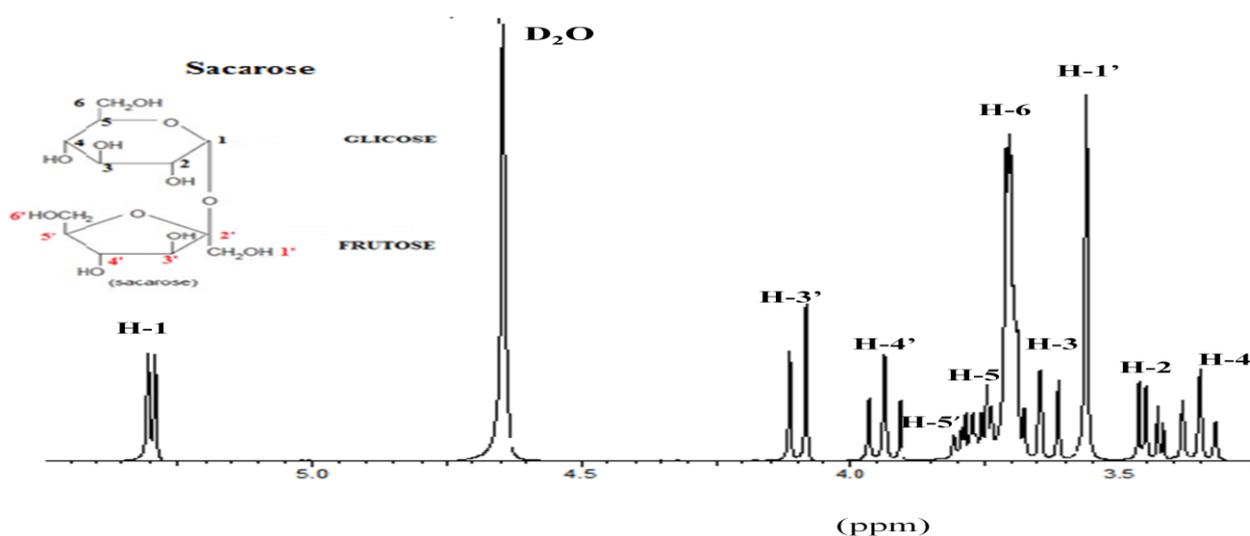
## 5.4 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

As interpretações dos dados de RMN nos levaram à molécula de sacarose (Figura 10), 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, foi realizada com base nos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , em comparação com aqueles obtidos nas mesmas condições, a partir da molécula de sacarose de origem comercial (PARADA *et al.*, 2001).

Analisando o espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , se verificou sinais na região de açúcar entre  $\delta\text{H}$  3.2 e 4.0, além do sinal atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono anomérico em  $\delta\text{H}$  5.46. No experimento DEPT para todas as seivas, registraram-se 12 sinais de carbono, sendo três sinais atribuídos aos carbonos metilênicos  $\delta\text{C}_{\text{H}_2-6}$  (62.98-63.09), C-1' (64.19-64.33) e C-6' (65.26-65.33) e um quaternário em  $\delta\text{C}-2'$  (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.



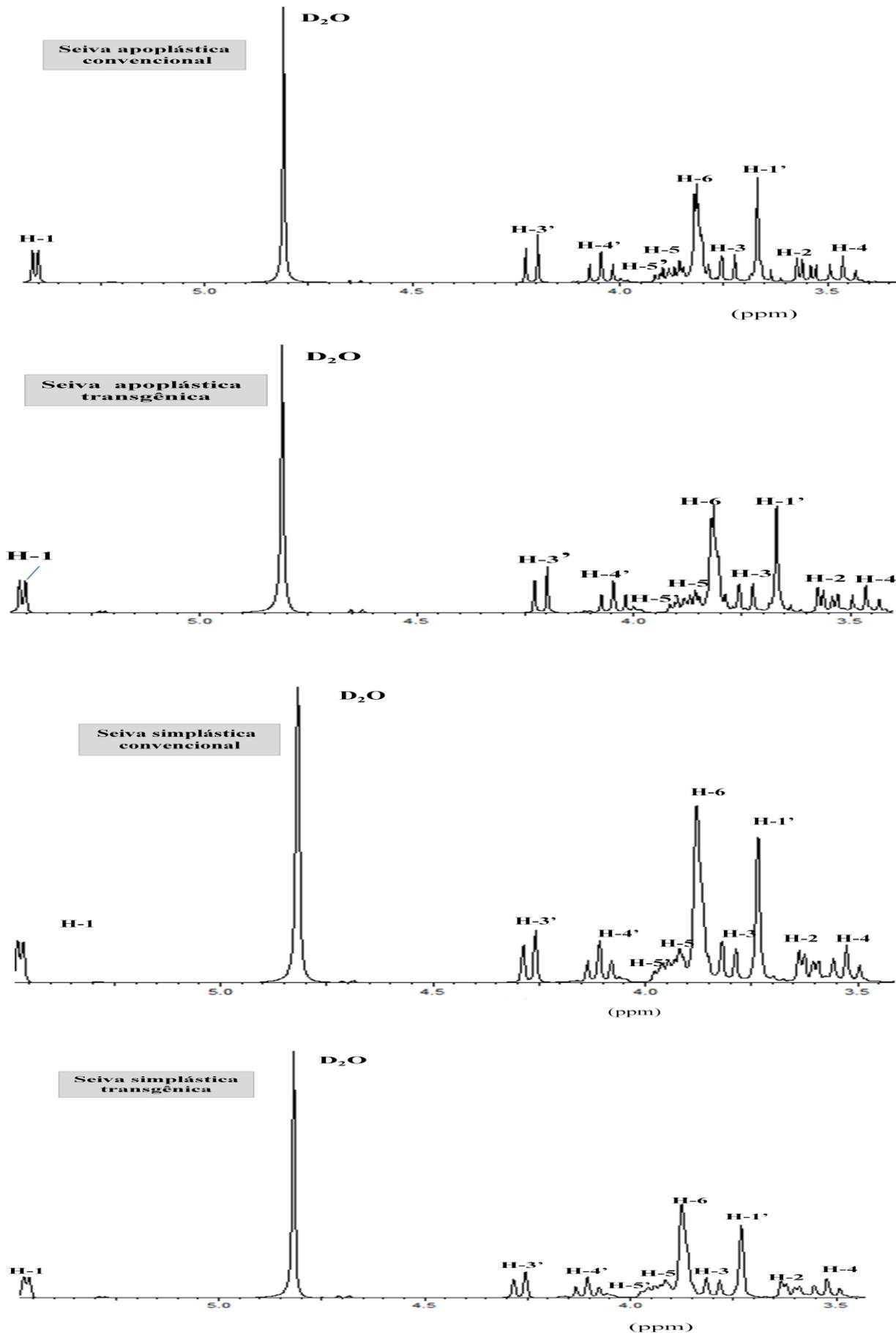


Figura 5. Espectros de RMN  $^1\text{H}$  da sacarose e das seivas apoplástica e simplástica do milho e feijão



Estes espectros de RMN  $^1\text{H}$  evidenciam a semelhança entre as seivas apoplásticas e simplásticas do milho e feijão com o espectro da molécula de sacarose sintética.

**Tabela 1** - Deslocamentos químicos (ppm) de  $^{13}\text{C}$ , para a sacarose e seivas apoplástica e simplástica do milho e feijão dissolvida em água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ).

Composto	Atribuição	Sac	Milho SA	Feijão SA	Milho SS	Feijão SS
<b>Sacarose (Sac)</b>	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 <sub>2</sub> -6	63.08	62.98	62.98	63.09	63.09
	CH <sub>2</sub> -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 <sub>2</sub> -6'	65.32	65.26	65.26	65.33	65.33

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

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  $^1\text{H}$ , para a sacarose e seivas apoplástica e simplástica do milho e feijão dissolvida em água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ).

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
	CH-5	3.91	3.86	3.86	3.91	3.91
	CH <sub>2</sub> -6	3.86	3.80	3.81	3.86	3.86
	CH <sub>2</sub> -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 <sub>2</sub> -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 aos hidrogênios 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.

## 6 CONCLUSÃO

Verificaram-se diferenças significativas nas determinações de todos os componentes das seivas apoplásticas do milho em comparação ao feijão. Já na verificação da seiva simplástica ocorreram mudanças somente nos conteúdos de açúcares totais e aminoácidos totais.



O nível de prolina em todas as células das plantas (milho e feijão) não foram significativamente diferentes, mas de alguma maneira, teve influência no desenvolvimento de cada cultura.

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 vêm 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.

## REFERÊNCIAS

ARRUDA, P. Sugarcane transcriptome. A landmark in plant genomics in the tropics. **Genet. Mol. Biol.**, v24, p.1; 2001.

ASHRAF, M.; FOOLAND M. R. Role of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v 59, p. 206-216, 2007.

BOTHA, F. C.; SAWYER, B. J. B.; BIRCH, R. G. Sucrose metabolism in the culm of transgenic sugarcane with reduced soluble acid invertase activity. In: **HOGARTH, D. M., ed. Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol., Brisbane**, v.24, p.588–591, 2001.

BOWER, R.; BIRCH, R. G. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. **Plant Journal**, v.2, p. 409-416; 1992.

CHAVES, M. M.; FLEXAS J.; PINHEIRO C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, v. 103, p. 551–560, 2009.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biol.**, v. 4, p.62–89, 2011.

DE RONDE, J. A.; CRESS, W. A.; KRUGER, G. H. J.; STRASSER, R. J.; VAN STADEN, J. Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an Arabidopsis P5CR gene, during heat and drought stress. **Journal of Plant Physiology**, v.161, p.1211-1224, 2004.

DONG, Z.; CANNY, M. J.; MCCULLY, M.; REBOREDO, M. R.; FERNÁNDEZ, 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.

FELIX J. M. et al. Expression Profile of Signal Transduction Components in a Sugarcane Population Segregating for Sugar Content. **Tropical Plant Biol**, v.2, p.98–109, 2009.

GALLO-MEAGHER, M.; IRVINE, J. E. Herbicide resistant transgenic sugarcane plants containing the bar gene. **Crop Science**, v.36, p. 1367-1374, 1996.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, p. 422-427, 1972.

HELLMANNH, FUNKD, RENTSCHD, FROMMERWB. Hypersensitivity of an Arabidopsis sugar signaling mutant towards exogenous proline application. **Plant Physiol**, v.123, p.779–790, 2000.

HMIDA-SAYARI, A.; GARGOURI-BOUZID, R.; BIDAN, A.; JAOUA, L.; SAVOURE, A.; JAOUA, S. Overexpression of pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. **Plant Science**, v.196, p.746-752, 2005.

HORII, J. A cana-de-açúcar como matéria-prima. **Revista Visão Agrícola**, v. 1, p. 88-93, 2004.

HU C-A. A; DELAUNEY, A. J; VERMA, D. P. S. A bifunctional enzyme (D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 89, p.9354–9358,1992.

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.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R. J.; AITKEN, K. S.; GROF, C. P. L.; BONNETT, G. D.; SMITH, G. R. Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. **In Vitro Cell Dev Biol Plant**, v.41, p.345–363, 2005.

LALONDE, S., TEGEDER, M., THRONE-HOLST, M., FROMMER, W. B., PATRICK, J. W. Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. **Plant, Cell & Environment**, v.26, p. 37–56, 2003.

LAM, H. M.; COSCHIGANO, K. T. I.; OLIVEIRA, C.; MELO-OLIVEIRA, R. G.; CORUZZI, M. The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol**, V. 47, p.569–93, 1996.

MAGNÉ, C.; LARHER, F. High Sugar content of extracts interferes with determination of amino acids and free praline. **Analytical Biochemistry**, v. 200, p.115-118, 1992.

MANNERS, J. M.; CASU, R. E. Transcriptome Analysis and Functional Genomics of Sugarcane. **Tropical Plant Biol**. v.4, p.9–21, 2011.



- MATSUOKA, S.; FERRO, J.; ARRUDA, P. The Brazilian experience of sugarcane ethanol industry. **In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant**, v. 45 p.372–381, 2009
- MCQUALTER, R. B.; CHONG, F. B.; MEYER, K.; DYK, D. E.; VAN O'SHEA, M. G.; WALTON, N. J.; VIITANEN, P. V.; BRUMBLEY, S. M. Initial evaluation of sugarcane as a production platform for p-hydroxybenzoic acid. **Plant Biotechnology Journal**, v.3, p.29-41, 2005.
- MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Trends in Plant Science**, v. 11, n.1, 2006.
- MOLINARI, H. B. C.; MARURA, C. J.; DAROS, E.; CAMPOS, M. K. F.; CARVALHO, J. F. R. P.; BESPALHOK FILHO, J. C.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum spp.*): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, v.130, p. 218–229, 2007.
- MOLINARI, H. B. C.; MARUR, C. J.; BESPALHOK, J. C.; KOBAYASHI, A. K.; PILEGGI, M.; PEREIRA, F. P. P.; VIEIRA, L. G. E. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. **Plant Science**, v.167, p.1375-1381, 2004.
- MOORE, G. Cereal genome evolution: pastoral pursuits with 'Lego' genomes. **Curr. Opin. Genet. Dev**, V. 5, p. 717–724, 1995.
- RAE, A. L.; JACKSON, M. A.; NGUYEN, C. H.; BONNETT, G. D. Functional Specialization of Vacuoles in Sugarcane Leaf and Stem. **Tropical Plant Biol**, v.2, p.13–22, 2009.
- SATTELMACHER, S. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. **New phytologist**, v.149, p.167-192, 2001.
- SOUZA, Z. M. et al. Manejo de palhada de cana colhida sem queima produtividade do canavial e qualidade do caldo. **Cienc. Rural**, v.35, p. 1062-1068, 2005.
- 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.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, p.739-746, 2010.
- TEJERA, N.; ORTEGA, E.; RODES, R.; LLUCH, C. Nitrogen compounds in the apoplastic sap of sugarcane stem: Some implications in the association with endophytes. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, p. 80-85, 2006.
- UNIÃO DAS INDÚSTRIAS DE CANA DE AÇÚCAR. **Avaliação da safra 2009/2010**. São Paulo, p. 39, 2009.
- VETTORE, A. L.; DA SILVA, F. R.; KEMPER, E. L. et al. The libraries that made SUCEST. **Genet. Mol. Biol**, v.24, p. 1–7, 2001.



VICKERS, J. E.; GROF, C. P. L.; BONNET, G. D.; JACKSON, P. A.; KNIGHT, D. P.; ROBERTS, S. E. & ROBINSON, S. P. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic sugarcane results in darker juice and raw sugar. **Crop Science**, v.45, p.354-362, 2005.

VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. **Current Opinion in Biotechnology**, v.16, p.123–132, 2005.

VITORELLO, V. A.; CAPALDI, F. R.; STEFANUTO, V. A. Recents advances in aluminium toxicity and resistente in higher plants. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 17, n.1, p. 129-143, 2005.

WACLAWOVSKY, A. J.; SATO, P.M. ; LEMBKE, C. G. ; MOORE, P. H.; SOUZA, G. M. Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant Biotechnology Journal**, v.8, p. 263–276, 2010.

WANG, M. L.; GOLDSTEIN, C.; SU, W.; MOORE, P. H; ALBERT, H. H. Production of biologically active GM-CSF in sugarcane: a secure biofactory. **Transgenic Res**, v.14, p. 167 -178, 2005.