



FABIANO DOS SANTOS FERREIRA

**CONSEQUÊNCIAS DA PIRAMIDAÇÃO DE
TRANSGENES POR MEIO DE HIBRIDAÇÃO**

LAVRAS - MG

2014

FABIANO DOS SANTOS FERREIRA

**CONSEQUÊNCIAS DA PIRAMIDAÇÃO DE TRANSGENES POR MEIO
DE HIBRIDAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Profissional em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. João Cândido de Souza

LAVRAS - MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Ferreira, Fabiano dos Santos.

Conseqüências da piramidação de transgenes por meio da
hibridação / Fabiano dos Santos Ferreira. – Lavras : UFLA, 2014.
136 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.
Orientador: João Cândido de Souza.
Bibliografia.

1. Biotecnologia. 2. Transgênicos. 3. Milho. 4. Piramidação. 5.
CTNBio. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.153

FABIANO DOS SANTOS FERREIRA

**CONSEQUÊNCIAS DA PIRAMIDAÇÃO DE TRANSGENES POR MEIO
DE HIBRIDAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Profissional em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2014.

Dr. Magno Antônio Patto Ramalho

UFLA

Dr. Sérgio Ricardo Nozawa

Dow AgroSciences

Dr. João Cândido de Souza
Orientador

LAVRAS - MG

2014

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Biologia (DBI).

Ao Professor Dr. João Cândido de Souza.

Ao Dr. Sérgio Ricardo Nozawa.

Ao Professor Dr. Magno Antônio Patto Ramalho.

À Professora Dra. Elaine Aparecida de Souza.

Ao Professor Dr. César Augusto Brasil P. Pinto.

Ao Professor Dr. João Bosco dos Santos.

Ao Professor Dr. José Airton Rodrigues Nunes.

À Professora Dr. Flávia Maria Avelar Gonçalves.

À Dow AgroSciences.

Ao Dr. William José da Silva.

A Luzia Mara Schiavon.

Ao Mário José Ether von Zuben.

Ao André Gradowski Figueiredo.

Ao Dr. Celso Fiori Spada.

Ao Dr. Luiz Ricardo Hanai.

Ao Felipe Mikio Arashida.

Ao Juliano Ribeiro Araujo.

A Daniela Augustinho.

Ao Jurandir Pereira Segundo.

A Bruna Line de Carvalho.

A Mariana Junqueira de Abreu.

A Monik Evelin Leite.

Ao Bráulio Fabiano Xavier de Moraes.

Ao Paulo Eduardo Rodrigues Prado.

Ao Regis de Castro Carvalho.

A Letícia Aparecida de Castro Lara.

Ao Samuel Bonfim Fernandes.

Ao Kaio Olimpio das Graças Dias.

À minha esposa, Elis Regina Oliveira Ferreira.

RESUMO

A hibridação é um procedimento comum nos programas de melhoramento de plantas, e vem sendo feita desde o início do aprimoramento genético das espécies cultivadas. O procedimento de hibridação utilizado na introgressão de transgenes em plantas cultivadas é o mesmo utilizado há décadas para o melhoramento genético de plantas. Entretanto, apesar da ausência de evidências de qualquer efeito decorrente da piramidação de transgenes por meio de hibridação, estudos adicionais são exigidos pelas agências reguladoras como condicionante da aprovação desses produtos. Para demonstrar a equivalência nutricional e agrônômica entre o produto transgênico portador de transgenes piramidados por meio de hibridação, os seus componentes singulares e o produto convencional, comparou-se os milhos TC1507 x DAS-59122-7, TC1507, DAS-59122-7 e os respectivos iso-híbridos. Para demonstrar a equivalência da expressão das proteínas CRY1F, CRY34AB1, CRY35AB1 e PAT o milho TC1507 x DAS-59122-7 foi comparado com os milhos TC1507 e DAS-59122-7. O milho TC1507 x DAS-59122-7 foi equivalente ao iso-híbrido e aos seus componentes portadores de eventos singulares para a composição nutricional em 148 das 150 comparações, para as características agrônômicas em todas as 24 comparações e para a expressão das proteínas em 33 das 40 comparações realizadas neste estudo. Os resultados avaliados comprovam a equivalência entre o milho portador dos eventos piramidados por meio de hibridação e o iso-híbrido convencional. Os produtos com eventos piramidados por hibridação poderiam, com base nestes resultados, ser automaticamente aprovados para cultivo e consumo quando os componentes singulares já tenham sido anteriormente aprovados.

Palavras-chave: Biotecnologia. Transgênicos. Piramidação. CTNBio. Milho.

ABSTRACT

Plant hybridization is a common procedure in plant breeding programs, and has been performed since the beginning of the genetic improvement of cultured species. The hybridization procedure used for the introgression of transgenes in crop plants is the same used for decades for the genetic improvement of plants. However, despite the lack of evidence of any effect derived from the transgene pyramiding by hybridization, additional studies are demanded by the regulating agencies as a condition in approving these products. In order to demonstrate the nutritional and agronomic equivalence between a transgenic product bearer of transgenes stacked by hybridization, its single components and the conventional product, the corn TC1507 x DAS-59122-7 was compared with TC1507, DAS-59122-7 and respective iso-hybrids. In order to demonstrate the equivalence of the expression of the proteins CRY1F, CRY34AB1, CRY35AB1 and PAT the hybrid TC1507 x DAS-59122-7 was compared with TC1507 and DAS-59122-7. In order to demonstrate the nutritional and agronomic equivalence between a transgenic product bearer of transgenes stacked by hybridization, its single components and the conventional product, the corn TC1507 x DAS-59122-7 was compared with TC1507, DAS-59122-7 and respective iso-hybrids. In order to demonstrate the equivalence of the expression of the proteins CRY1F, CRY34AB1, CRY35AB1 and PAT the hybrid TC1507 x DAS-59122-7 was compared with TC1507 and DAS-59122-7. The TC1507 x DAS-59122-7 maize was equivalent to the iso-hybrid and to its components bearing singular events for nutritional composition in 148 of 150 comparisons, for agronomic characteristics in all 24 comparisons and for protein expression in 33 of 40 comparisons performed in this study. The assessed results prove the equivalence between the maize bearing the events pyramided by hybridization and the conventional iso-hybrid. The products with events pyramided by hybridization, based on these results, might be automatically approved for cultivation and consumption in situations where the singular components have been previously approved.

Keywords: Biotechnology. Transgenic. Pyramiding. CTNBio. Maize.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mapa do plasmídeo PHP8999.....	38
Figura 2	Construção gênica do evento TC1507.....	38
Figura 3	Mapa do plasmídeo PHP17662.....	42
Figura 4	Construção gênica do evento DAS-59122-7.....	42
Figura 5	Sequência de aminoácidos da proteína CRY1F.....	48
Figura 6	Sequência de aminoácidos da proteína CRY34AB1.....	51
Figura 7	Sequência de aminoácidos da proteína CRY35AB1.....	51
Figura 8	Sequência de aminoácidos da proteína PAT.....	54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Precipitação pluviométrica e temperatura média mensal observadas em Indianópolis (MG) no período de condução dos experimentos do Estudo 1, ano de 2007	59
Gráfico 2	Precipitação pluviométrica e temperatura média mensal observadas em Mogi Mirim (SP) no período de condução dos experimentos do Estudo 1, ano de 2007	59
Gráfico 3	Precipitação pluviométrica e temperatura média mensal observadas em Indianópolis (MG) no período de condução dos experimentos do Estudo 2, ano de 2010	60
Gráfico 4	Precipitação pluviométrica e temperatura média mensal observadas em Mogi Mirim (SP) no período de condução dos experimentos do Estudo 2, ano de 2010	60
Gráfico 5	Precipitação pluviométrica e temperatura média mensal observadas em Indianópolis (MG) no período de condução dos experimentos do Estudo 3, anos de 2009 e 2010	61
Gráfico 6	Precipitação pluviométrica e temperatura média mensal observadas em Mogi Mirim (SP) no período de condução dos experimentos do Estudo 3, ano de 2010	61
Gráfico 7	Resultados médios das avaliações de composição centesimal e fibras em grãos dos milhos TC1507, DAS59122-7 e TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente aos respectivos iso-híbridos, em análise combinada dos dados dos experimentos do Estudo 3 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	96

Gráfico 8	Resultados médios das avaliações de composição de minerais em grãos dos milhos TC1507, DAS59122-7 e TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente aos respectivos iso-híbridos, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	98
Gráfico 9	Resultados médios das avaliações da composição de aminoácidos em grãos dos milhos TC1507, DAS59122-7 e TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente aos respectivos iso-híbridos, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)	100
Gráfico 10	Resultados médios das avaliações de composição de ácidos graxos em grãos dos milhos TC1507, DAS59122-7 e TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente aos respectivos iso-híbridos, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	102
Gráfico 11	Resultados médios das avaliações de composição de vitaminas em grãos dos milhos TC1507, DAS59122-7 e TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente aos respectivos iso-híbridos, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	104
Gráfico 12	Resultados médios das avaliações de composição de antinutrientes em grãos dos milhos TC1507, DAS59122-7 e TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente aos respectivos iso-híbridos, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)	105

Gráfico 13	Resultados médios das avaliações de composição centesimal, fibras e minerais em forragem dos milhos TC1507, DAS59122-7 e TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente aos respectivos iso-híbridos, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	108
Gráfico 14	Resultados comparativos das médias das avaliações de expressão da proteína CRY1F do milho TC1507 x DAS-59122-7 e do milho TC1507, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	124
Gráfico 15	Resultados comparativos das médias das avaliações de expressão da proteína CRY34AB1 do milho TC1507 x DAS-59122-7 e do milho DAS-59122-7, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	126
Gráfico 16	Resultados comparativos das médias das avaliações de expressão da proteína CRY35AB1 do milho TC1507 x DAS-59122-7 e do milho DAS-59122-7, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	128
Gráfico 17	Resultados comparativos das médias das avaliações de expressão da proteína PAT do milho TC1507 x DAS-59122-7, do milho TC1507 e do milho DAS-59122-7, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sequências de DNA, organismos doadores e função dos elementos presentes na construção gênica do evento TC1507.....	37
Tabela 2	Sequências de DNA, organismos doadores e função dos elementos presentes na construção gênica do evento TC1507.....	41
Tabela 3	Descrição dos híbridos testados	55
Tabela 4	Desenho experimental utilizado nos estudos de determinação da composição nutricional, das características agronômicas e da expressão de proteínas	56
Tabela 5	Estádios fenológicos do milho	63
Tabela 6	Variações descritas na literatura para análise centesimal e fibras de grãos	64
Tabela 7	Variações descritas na literatura para análise de minerais em grãos	65
Tabela 8	Variações descritas na literatura para análise de aminoácidos em grãos.....	65
Tabela 9	Variações descritas na literatura para análise de ácidos graxos em grãos.....	66
Tabela 10	Variações descritas na literatura para análise de vitaminas em grãos	66
Tabela 11	Variações descritas na literatura para análise de antinutrientes em grãos.....	67
Tabela 12	Variações descritas na literatura para análise centesimal, fibras e minerais de forragem	67
Tabela 13	Descrição das características agronômicas avaliadas nos estudos para o milho geneticamente modificado e o iso-híbrido ..	69

Tabela 14	Resultados de composição centesimal e fibras em grãos do milho TC1507 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 1 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	73
Tabela 15	Resultados de composição de minerais em grãos do milho TC1507 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 1 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	74
Tabela 16	Resultados da composição de aminoácidos em grãos do milho TC1507 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 1 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	75
Tabela 17	Resultados de composição de ácidos graxos em grãos do milho TC1507 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 1 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	76
Tabela 18	Resultados de composição de vitaminas em grãos do milho TC1507 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 1 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	77
Tabela 19	Resultados de composição de antinutrientes em grãos do milho TC1507 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 1 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	78
Tabela 20	Resultados de composição centesimal aproximada e fibras em forragem do milho TC1507 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 1 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)	79

Tabela 21	Resultados de composição centesimal e fibras em grãos do milho DAS-59122-7 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 2 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)	80
Tabela 22	Resultados de composição de minerais em grãos do milho DAS-59122-7 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 2 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	81
Tabela 23	Resultados da composição de aminoácidos em grãos do milho DAS-59122-7 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 2 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	82
Tabela 24	Resultados de composição de ácidos graxos em grãos do milho DAS-59122-7 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 2 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)	83
Tabela 25	Resultados de composição de vitaminas em grãos do milho DAS-59122-7 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 2 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	84
Tabela 26	Resultados de composição de antinutrientes em grãos do milho DAS-59122-7 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 2 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	85
Tabela 27	Resultados de composição centesimal aproximada e fibras em forragem do milho DAS-59122-7 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 2 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	86

Tabela 28	Resultados de composição centesimal e fibras em grãos do milho TC1507 x DAS-59122-7 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 3 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	87
Tabela 29	Resultados de composição de minerais em grãos do milho TC1507 x DAS-59122-7 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 3 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)	88
Tabela 30	Resultados da composição de aminoácidos em grãos do milho TC1507 x DAS-59122-7 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 3 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)	89
Tabela 31	Resultados de composição de ácidos graxos em grãos do milho TC1507 x DAS-59122-7 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 3 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	91
Tabela 32	Resultados de composição de vitaminas em grãos do milho TC1507 x DAS-59122-7 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 3 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)	92
Tabela 33	Resultados de composição de antinutrientes em grãos do milho TC1507 x DAS-59122-7 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 3 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)	93

Tabela 34	Resultados de composição centesimal aproximada e fibras em forragem do milho TC1507 x DAS-59122-7 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 3 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	94
Tabela 35	Resultados médios das avaliações de composição centesimal e fibras em grãos dos milhos TC1507, DAS59122-7 e TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente aos respectivos iso-híbridos, em análise combinada dos dados dos experimentos conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	95
Tabela 36	Resultados médios das avaliações de composição de minerais em grãos dos milhos TC1507, DAS59122-7 e TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente aos respectivos iso-híbridos, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	97
Tabela 37	Resultados médios das avaliações de composição de ácidos graxos em grãos dos milhos TC1507, DAS59122-7 e TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente aos respectivos iso-híbridos, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	101
Tabela 38	Resultados médios das avaliações de composição de vitaminas em grãos dos milhos TC1507, DAS59122-7 e TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente aos respectivos iso-híbridos, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	103

Tabela 39	Resultados médios das avaliações de composição de antinutrientes em grãos dos milhos TC1507, DAS59122-7 e TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente aos respectivos iso-híbridos, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)	105
Tabela 40	Resultados das avaliações das características agronômicas do milho TC1507 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	109
Tabela 41	Resultados das avaliações das características agronômicas do milho DAS-59122-7 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	110
Tabela 42	Resultados das avaliações das características agronômicas do milho TC1507 x DAS-59122-7 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	111
Tabela 43	Resultados médios das avaliações das características agronômicas em grãos dos milhos TC1507, DAS59122-7 e TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente aos respectivos iso-híbridos, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)	113
Tabela 44	Resultados das avaliações de expressão das proteínas CRY1F e PAT no milho TC1507 e em seu iso-híbrido, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	115

Tabela 45	Resultados das avaliações de expressão da proteína CRY34AB1 no milho DAS-59122-7 e em seu iso-híbrido, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	117
Tabela 46	Resultados das avaliações de expressão da proteína CRY35AB1 no milho DAS-59122-7 e em seu iso-híbrido, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	117
Tabela 47	Resultados das avaliações de expressão da proteína PAT no milho DAS-59122-7 e em seu iso-híbrido, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	118
Tabela 48	Resultados das avaliações de expressão da proteína CRY1F no milho TC1507 x DAS-59122-7 e em seu iso-híbrido, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	120
Tabela 49	Resultados das avaliações de expressão da proteína CRY34AB1 no milho TC1507 x DAS-59122-7 e em seu iso-híbrido, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)	120
Tabela 50	Resultados das avaliações de expressão da proteína CRY35AB1 no milho TC1507 x DAS-59122-7 e em seu iso-híbrido, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)	121
Tabela 51	Resultados das avaliações de expressão da proteína PAT no milho TC1507 x DAS-59122-7 e em seu iso-híbrido, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	121

Tabela 52	Resultados comparativos das médias das avaliações de expressão da proteína CRY1F do milho TC1507 x DAS-59122-7 e do milho TC1507, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	123
Tabela 53	Resultados comparativos das médias das avaliações de expressão da proteína CRY34AB1 do milho TC1507 x DAS-59122-7 e do milho DAS-59122-7, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	125
Tabela 54	Resultados comparativos das médias das avaliações de expressão da proteína CRY35AB1 do milho TC1507 x DAS-59122-7 e do milho DAS-59122-7, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	127
Tabela 55	Resultados comparativos das médias das avaliações de expressão da proteína PAT do milho TC1507 x DAS-59122-7, do milho TC1507 e do milho DAS-59122-7, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG).....	129

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
A-T	Adenina-Timina
cm	centímetro
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
FDA	Fibra em Detergente Ácido
FDN	Fibra em Detergente Neutro
G-C	Guanina-Citosina
g	Gramas
ha	Hectare
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
kDa	QuiloDalton
Kg	Quilograma
LOD	Limite de Detecção
LPMA	Liberação Planejada no Meio Ambiente
m	Metro
máx	Máximo
mg	Miligramas
MG	Minas Gerais
mín	Mínimo
mm	Milímetro
NA	Não Analisado
ng	Nanograma
ns	Não significativo estatisticamente
NR	Não citado em literatura
°C	Grau Celsius
pH	Potencial Hidrogeniônico
R1	Estádio R1 (embonecamento e polinização)
R4	Estádio R4 (grão pastoso)
R6	Estádio R6 (maturação fisiológica)
s	Significativo estatisticamente
SP	São Paulo
TIU	Unidades de Inibidor de Tripsina
V2	Estádio V2, 2 folhas expandidas

V4	Estádio V4, 4 folhas expandidas
V9	Estádio V9, 9 folhas expandidas
x□	Média

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REFERENCIAL TEÓRICO	28
2.1	Classificação botânica	28
2.2	A área de ocorrência natural, seus ancestrais e parentes silvestres	28
2.3	Centros de origem e de diversidade genética	31
2.4	Dispersão e propagação	33
2.5	Descrição do milho TC1507 x DAS-59122-7 e de seus parentais milho TC1507 e milho DAS-59122-7	35
2.5.1	Descrição do milho TC1507	35
2.5.2	Descrição do milho DAS-59122-7	39
2.5.3	Descrição do milho TC1507 x DAS-59122-7	43
2.6	Os produtos de expressão dos genes inseridos no milho TC1507 x DAS-59122-7	44
2.6.1	Descrição das proteínas CRY	44
2.6.1.1	Descrição da proteína CRY1F	47
2.6.1.2	Descrição das proteínas CRY34AB1 e CRY35AB1	49
2.6.2	Descrição da proteína PAT	51
3	MATERIAL E MÉTODOS	55
3.1	Híbridos de milho testados	55
3.2	Desenho experimental	55
3.3	Condições climáticas observadas durante a condução dos experimentos	57
3.4	Determinação da composição química e nutricional do milho geneticamente modificado comparativamente ao iso-híbrido convencional	62
3.5	Avaliação das características agronômicas do milho geneticamente modificado comparativamente ao iso-híbrido convencional	67
3.6	Quantificação da expressão das proteínas transgênicas do milho portador dos eventos combinados comparativamente aos parentais contendo os eventos singulares	69
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
4.1	Composição química e nutricional do milho TC1507 x DAS-59122-7 e de seus componentes singulares milho TC1507 e milho DAS-59122-7	72
4.1.1	Composição química e nutricional do milho TC1507 comparativamente ao iso-híbrido	72
4.1.1.1	Análise centesimal e fibras em grãos	72

4.1.1.2	Análise de minerais em grãos	73
4.1.1.3	Análise de aminoácidos em grãos	74
4.1.1.4	Análise de ácidos graxos em grãos	75
4.1.1.5	Análise de vitaminas em grãos	77
4.1.1.6	Análise de antinutrientes em grãos	78
4.1.1.7	Análise centesimal, fibras e minerais em forragem	78
4.1.2	Composição química e nutricional do milho DAS-59122-7 comparativamente ao Iso-híbrido	79
4.1.2.1	Análise centesimal e fibras em grãos	80
4.1.2.2	Análise de minerais em grãos	81
4.1.2.3	Análise de aminoácidos em grãos	82
4.1.2.4	Análise de ácidos graxos em grãos	83
4.1.2.5	Análise de vitaminas em grãos	84
4.1.2.6	Análise de antinutrientes em grãos	85
4.1.2.7	Análise centesimal, fibras e minerais em forragem	85
4.1.3	Composição química e nutricional do milho TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente ao iso-híbrido	86
4.1.3.1	Análise centesimal e fibras em grãos	87
4.1.3.2	Análise de minerais em grãos	88
4.1.3.3	Análise de aminoácidos em grãos	89
4.1.3.4	Análise de ácidos graxos em grãos	90
4.1.3.5	Análise de vitaminas em grãos	91
4.1.3.6	Análise de antinutrientes em grãos	92
4.1.3.7	Análise centesimal, fibras e minerais em forragem	93
4.1.4	Comparação entre a composição química e nutricional do milho TC1507 x DAS-59122-7 e de seus componentes singulares milho TC1507 e milho DAS-59122-7	94
4.2	Características agronômicas do milho TC1507 x DAS-59122-7 e de seus componentes singulares milho TC1507 e milho DAS-59122-7	108
4.2.1	Características agronômicas do milho TC1507 comparativamente ao iso-híbrido	109
4.2.2	Características agronômicas do milho DAS-59122-7 comparativamente ao iso-híbrido	110
4.2.3	Características agronômicas do milho TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente ao iso-híbrido	111
4.2.4	Comparação entre as características agronômicas do milho TC1507 x DAS-59122-7 e de seus componentes singulares milho TC1507 e milho DAS-59122-7	112
4.3	Expressão das proteínas do milho TC1507 x DAS-59122-7 e de seus componentes singulares milho TC1507 e milho DAS-59122-7	113

4.3.1	Expressão das proteínas CRY1F e PAT do milho TC1507 comparativamente ao iso-híbrido.....	114
4.3.2	Expressão das proteínas CRY34AB1, CRY35AB1 e PAT do milho DAS-59122-7 comparativamente ao iso-híbrido.....	115
4.3.3	Expressão das proteínas CRY1F, CRY34AB1, CRY35AB1 e PAT do milho TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente ao iso-híbrido	118
4.3.4	Comparação entre a expressão das proteínas CRY1F, CRY34AB1, CRY35AB1 e PAT do milho TC1507 x DAS-59122-7 e de seus componentes singulares milho TC1507 e milho DAS-59122-7	122
5	CONCLUSÃO.....	131
	REFERÊNCIAS.....	132

1 INTRODUÇÃO

A hibridação de plantas de uma mesma população ou de populações diferentes é um procedimento comum nos programas de melhoramento de plantas, e vem sendo feita desde o início do aprimoramento genético das espécies cultivadas.

Os melhoristas identificam e selecionam os melhores fenótipos dos caracteres de interesse dentro da população híbrida, sejam eles quantitativos ou qualitativos, aumentando a frequência dos alelos favoráveis ao caráter na população em melhoramento.

Um exemplo é a seleção das plantas com base na produtividade de grãos, que é um caráter quantitativo, condicionado por um grande número de alelos de pequena contribuição individual e com grande influência do ambiente (RAMALHO, 2008), de forma que o aumento da produtividade é conseguido por meio do aumento da frequência de alelos favoráveis a esse caráter, através de hibridação entre plantas de diferentes grupos heteróticos seguida da seleção das plantas da geração filial, concomitantemente ao aprimoramento das linhagens por meio de seleções intrapopulacionais e interpopulacionais, e nenhum efeito indesejável tem sido observado em decorrência da hibridação de plantas no melhoramento das espécies cultivadas.

Um dos mais importantes procedimentos da biotecnologia agrícola é a introgressão de uma ou mais construções gênicas por meio da hibridação entre uma planta doadora portadora dos transgenes e uma planta receptora com alto potencial produtivo.

O procedimento de hibridação utilizado na introgressão de transgenes em plantas cultivadas é o mesmo utilizado há décadas para o melhoramento genético de plantas.

Até o presente momento, não existe qualquer evidência de que uma planta portadora de transgenes piramidados por hibridação tenha sofrido qualquer tipo de alteração em sua composição nutricional, nas suas características agronômicas ou na expressão das proteínas codificadas pelos transgenes.

Esse fato tem sido comprovado pelas aprovações da Comissão Técnica Nacional (CTNBio) para o cultivo e consumo de cultivares de soja, milho e algodão portadoras de transgenes piramidados por meio de hibridação.

Entretanto, a despeito das evidências apresentadas por milhões de hectares cultivados no Brasil com plantas portadoras de transgenes piramidados por hibridação, a atual legislação brasileira de biossegurança (Resolução Normativa nº 5 da CTNBio) considera esses produtos como um novo evento de biotecnologia, e exige a realização de todos os testes de campo e de laboratório que já foram feitos para cada um dos seus parentais portadores dos eventos singulares.

Com base na hipótese da necessidade do aprimoramento da legislação brasileira de biossegurança, o presente trabalho tem como objetivo geral demonstrar que a planta geneticamente modificada portadora de eventos piramidados por hibridação é equivalente ao iso-híbrido e aos parentais portadores dos eventos singulares que a originou e o objetivo específico deste trabalho de dissertação é demonstrar que as plantas transgênicas portadoras de eventos piramidados por hibridação deveriam ser automaticamente autorizadas pela CTNBio, para cultivo e consumo, nas situações em que os parentais portadores dos eventos singulares tenham sido previamente aprovados pela CTNBio.

Para demonstrar a equivalência entre as plantas portadoras de transgenes piramidados por hibridação, o iso-híbrido não transgênico e os parentais portadores dos eventos singulares, serão comparados os parâmetros de

composição nutricional (proteína bruta, extrato etéreo, cinzas, umidade, carboidrato, fibra bruta, fibra em detergente ácido, fibra em detergente neutro, minerais, aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e antinutrientes), as características agronômicas das plantas (vigor de plântula, florescimento feminino, florescimento masculino, altura de planta, altura da espiga principal, tombamento, incidência de doenças, dano de inseto e produtividade de grãos) e a expressão das proteínas CRY1F, CRY34AB1, CRY35AB1 e PAT.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Classificação botânica

O milho cultivado, objeto deste trabalho, é uma gramínea pertencente à família Poacea, tribo Maydeae, gênero *Zea* e espécie *Zea mays* L. *ssp. mays* (PATERNIANI; CAMPOS, 2005).

2.2 A área de ocorrência natural, seus ancestrais e parentes silvestres

O milho (*Zea mays* L. *ssp mays*) foi domesticado pelas populações indígenas da América Central, notadamente Maias e Astecas, que cultivavam um grande número de variedades de milho na região central e sul do México, como seu alimento principal, tendo se difundido para cultivo em toda América. Entre os anos de 1250 e 1700, praticamente todo o continente Americano teve acesso ao milho e todos os principais centros populacionais desenvolveram uma grande rede de intercâmbio de variedades da espécie.

Quando a América foi descoberta pelos europeus, o milho já vinha sendo cultivado pelos nativos deste continente desde o Canadá até a Argentina, de forma que o primeiro contato do homem civilizado com o milho ocorreu provavelmente no dia 5 de novembro de 1492, dia da chegada de Cristóvão Colombo à América (PATERNIANI; CAMPOS, 2005). Após o contato dos europeus com as populações americanas, no final do século XV e início do século XVI, os exploradores e comerciantes levaram o milho para a Europa e a partir desse período a planta conquistou popularidade no resto do mundo, principalmente por suas características nutricionais e pela possibilidade de ser cultivada nos mais diversos climas.

O milho adaptou-se em ambientes desérticos e em lugares com alto índice de precipitações, aos climas tropicais e temperados e aos solos elevados até 4.000 metros acima do nível do mar (SALVADOR, 1997). O milho é cultivado sob uma ampla gama de condições climáticas devido aos seus numerosos tipos divergentes. Todavia, a sobrevivência e a reprodução do milho são limitadas em baixas temperaturas (SHAW, 1988). Praticamente não se cultiva milho nas regiões cuja temperatura média em pleno verão seja menor que 19 °C ou onde a temperatura média noturna desça abaixo dos 13 °C. A maior parte do milho é produzida em latitudes entre 30 e 35 graus, com relativamente pouco cultivo nas latitudes superiores aos 47 graus em qualquer parte do mundo. A maior parte da produção de milho se dá em zonas onde as isotermas mensais oscilam entre 21 e 27 °C e a estação sem períodos frios durante 120 e 180 dias. As precipitações de 150 mm em períodos de veranico durante a safra constituem o limite mais baixo para a produção de milho sem risco. Não existe um limite superior de precipitações para o cultivo de milho, mas o excesso de chuvas pode diminuir a produtividade.

O milho cultivado (*Zea mays* L. ssp. *mays*) pertence ao gênero *Zea*, que inclui várias outras espécies selvagens, conhecidas como teosintes. O capim guatemala (*Tripsacum andersonii*), espécie do gênero *Tripsacum*, pouco mais distante do milho é cultivado amplamente como forrageira na América Central e na América do Sul. O *Tripsacum andersonii* é praticamente estéril e não se têm registros de cruzamentos com o milho. Apenas o *Tripsacum dactyloides* ($2n = 72$) em cruzamento com milho ($2n = 20$), em condições especiais pode gerar um número mínimo de descendentes férteis. Entretanto, a fecundação somente ocorre em cruzamentos artificiais com a ajuda do homem usando-se pólen de *Tripsacum dactyloides* sobre o estilo-estigma de milho previamente cortado para diminuir o trajeto do tubo polínico. Na América do Sul, o *Tripsacum ssp.* encontra-se ao longo do Rio Amazonas e na bacia do Orinoco, estendendo-se

desde as costas do Caribe até o sul da América do Sul (DE WET *et al.*, 1981). São conhecidas cinco espécies de *Tripsacum* na América do Sul (*Tripsacum dactyloides*, *Tripsacum australe*, *Tripsacum andersonii*, *Tripsacum cundinamarce* e *Tripsacum peruvianum*). A espécie sul-americana mais comum é *Tripsacum dactyloides*, que é morfológicamente distinta dos tipos norte-americanos desta espécie. Esta espécie distribui-se de forma extensa e cresce nas bordas de montes úmidos, rochosos acidentados e ao longo de estradas. O *Tripsacum australe* se encontra nos montes úmidos abertos e ribeiras com pouca luz na Venezuela, Colômbia, Bolívia e Brasil. O nome comum do *Tripsacum andersonii* é capim-guatemala, que é cultivado como forrageira na América Central e na América do Sul. Essa espécie é quase estéril e cresce ao longo de rios nas montanhas desde Venezuela até o Peru. O *Tripsacum andersonii* se propaga por estolões e é disseminado por humanos e ao longo de canais aquíferos. Até o momento, o *Tripsacum cundinamarce* somente foi encontrado na Colômbia e prefere *habitats* com boa drenagem. Correntes de água em locais com pouca luz e outros lugares úmidos constituem o *habitat* do *Tripsacum peruvianum* no Peru e no sudeste do Equador.

Na América do Sul, não ocorre espécies de teosinte naturalmente, sendo encontrados representantes do gênero *Tripsacum*, inclusive no Brasil, sem sinais de introgressão natural ou retrocruzamento existente entre *Tripsacum* e o milho (DE WET *et al.*, 1981). O cruzamento natural entre o milho e *Tripsacum* é muito raro de ocorrer e, se viável, produz frequentemente descendentes estéreis. Embora algumas espécies de *Tripsacum* possam cruzar-se com o milho por meio de polinização artificial em condições de laboratório, casa de vegetação ou de campo, é altamente improvável, se não impossível, que se produza cruzamentos entre as duas espécies por meio de fertilização natural (BEADLE, 1980). Os híbridos produzidos sob condições controladas são estéreis ou sua progênie apresenta fertilidade significativamente reduzida (SPRAGUE; DUDLEY, 1988).

As espécies mais estreitamente relacionadas com o milho são os teosintes (*Zea mays ssp.*, *Zea luxurians* e *Zea diploperennis*), que são gramíneas silvestres que se encontram em algumas regiões do México e da Guatemala e se cruzam naturalmente com o milho produzindo descendentes férteis. No Brasil, não se observa a ocorrência natural de espécies de teosinte, existindo apenas espécies do gênero *Tripsacum*, parente mais distante do milho. O cruzamento natural entre o milho e *Tripsacum* é muito raro de ocorrer e, se viável, produz frequentemente descendentes estéreis. Embora algumas espécies de *Tripsacum* possam cruzar-se com o milho por meio de polinização artificial em condições de laboratório, de estufa ou de campo, é altamente improvável, se não impossível, que se produza cruzamentos entre elas por meio de fertilização natural (BEADLE, 1980). Os híbridos produzidos sob condições controladas são estéreis ou sua progênie apresenta fertilidade significativamente reduzida (SPRAGUE; DUDLEY, 1988). Além disso, não existem provas sobre a possibilidade de introgressão natural existente entre *Tripsacum* e o milho (DE WET et al., 1981).

2.3 Centros de origem e de diversidade genética

As regiões tropicais do México e da Guatemala são consideradas os centros de origem do milho (*Zea mays* L. *ssp. mays*) onde foi domesticado e se espalhou pela América, tendo sido cultivado por milhares de anos. A espécie mais estreitamente relacionada com o milho é o teosinte (*Zea mays mexicana*), uma gramínea selvagem, que se encontra em algumas regiões do México e da Guatemala e se cruza facilmente com o milho produzindo descendentes férteis. Tem sido aceito pelos pesquisadores que o teosinte (*Zea mays mexicana*) seja o ancestral do milho embora haja divergências sobre os passos intermediários que ocorreram entre as duas espécies (SPRAGUE; DUDLEY, 1988). Por ter várias

espécies, distribuição geográfica distinta e plantas com diferenças fenotípicas a parte taxonômica tem sido muito discutida. Os teosintes anuais são classificados nas espécies *Zea mays* e *Zea luxurians*. A espécie *Zea mays* é dividida nas subespécies *Zea mays mexicana* e *Zea mays parviglumis*, a última classificada nas duas variedades *Zea mays parviglumis parviglumis* e *Zea mays parviglumis huehuetenangensis*. Os teosintes perenes são divididos nas espécies *Zea perennis* (tetraploide) e *Zea diploperennis* (diploide) (DOEBLEY;ILTIS 1983). Um estudo de variabilidade genética mediante a análise de aloenzimas em acessos do banco de germoplasma de milho e de teosinte não encontrou evidências para demonstrar recente introgressão entre milho e teosinte (SMITH; GOODMAN; STUBER, 1985). Ao contrário do teosinte que ocorre naturalmente, as modificações incorporadas às plantas de milho durante seu processo de domesticação tornaram o milho altamente dependente do homem para sobreviver e conseqüentemente chegar até seu estágio reprodutivo, o que o impede de dispersar livremente suas sementes no meio ambiente em condições de cultivo.

Têm sido realizados ao longo de um século estudos citológicos e citogenéticos em etapas chaves da meiose, bem como trabalhos de morfologia e histologia (ESAU, 1977) e também muitos trabalhos em taxonomia e evolução da espécie (DOEBLEY; ILTIS, 1983; ILTIS; DOEBLEY, 1980). Estudos moleculares efetuados nos últimos 20 anos avançaram a tal ponto que permitiram que muitos genes fossem clonados e várias partes do genoma de milho caracterizadas ou sequenciadas em detalhe (WALBOT; MESSING, 1988). Os fatores que afetam a estabilidade genética foram caracterizados adequadamente e o milho tem sofrido modificações contínuas por parte dos melhoristas com o propósito de obter melhor qualidade e comportamento agrônômico do produto. A espécie domesticada *Zea mays* L. *spp. mays* não parece ser um híbrido de formas silvestres e cultivadas de *Zea* como se havia

postulado anteriormente. Portanto, não parece existir uma ponte genética facilmente disponível entre *Zea mays* cultivado e os representantes silvestres de *Zea* (DOEBLEY, 1984).

2.4 Dispersão e propagação

A dispersão do milho é feita exclusivamente por sementes, uma vez que não se observa regeneração natural a partir de tecidos vegetativos. A dispersão das sementes do milho somente ocorre por meio da intervenção do homem, pois precisam ser retiradas dos sabugos (debulha) e introduzidas no solo, em pequenas quantidades, para poder desenvolver toda sua estrutura reprodutiva. As sementes de milho não apresentam dormência e estão aptas para germinação logo após o momento da maturação fisiológica (32% a 35% de umidade). Em condições de campo, perdem rapidamente o poder germinativo quando expostas na superfície do solo, à umidade e alta temperatura.

O milho é uma planta alógama com taxa de cruzamento entre as plantas da mesma espécie de aproximadamente 90%. A polinização é feita pela ação dos ventos, embora ocorra a presença de insetos polinizadores na época da antese, principalmente abelhas e vespas, que não tem participação nesse processo.

A dispersão de pólen em milho tem sido um assunto muito bem estudado desde a década de 1940 até os dias de hoje. Num estudo comparativo de monocotiledôneas, o autor concluiu que o milho floresce em média ao longo de uma semana, com variação de até 14 dias dependendo, principalmente, da temperatura e umidade relativa do ar. A viabilidade do grão de pólen é de 24 horas em média, mas pode também variar dependendo das condições ambientais (PURSEGLOVE, 1972).

Um estudo de controle do pólen durante o desenvolvimento de milho híbrido transgênico conduzido no México obteve completo isolamento do

organismo geneticamente modificado em distâncias acima de 184 metros (GARCIA et al., 1998). Por meio de outro estudo (TOWNSEND; SCHOPER, 2001), concluiu-se que o controle do pólen de milho para isolamento reprodutivo pode ser conseguido em campos de produção de sementes com distâncias de 185 a 200 metros. Em um estudo de dispersão de pólen de milho transgênico com evento que confere resistência a um herbicida foi avaliado o fluxo gênico entre as plantas geneticamente modificadas e as plantas de milho comum, em dois anos consecutivos (JEMISON; VAYDA, 2001). Em seu estudo de 1999, os autores concluíram que em distâncias acima de 300 metros o fluxo gênico foi nulo. No estudo conduzido no ano 2000, os mesmos autores concluíram que em até 110 metros de distância, as plantas geneticamente modificadas foram capazes de dispersar pólen e produzir cerca de 1,38% de cruzamentos com plantas convencionais. Um estudo de fluxo gênico de milho *Bt* para milho comum foi conduzido durante três anos para estimar as distâncias que pudessem promover o isolamento genético do organismo geneticamente modificado e a conclusão foi que a taxa de dispersão depende da distância da fonte de pólen, da direção do vento e da sincronização entre a antese e a emissão dos estileto-estigmas. A porcentagem de cruzamento foi menor que 1% dentro de uma distância de 28 m, na direção do vento e de 10 metros em direção oposta do vento (MA; SUBEDI; REID, 2004).

Para o isolamento de linhagens, populações, híbridos de milho e seus parentes selvagens, vários autores concluíram ser adequada e suficiente a distância de 200 metros entre os materiais (GARCIA;1998; JEMISON; VAYDA, 2001; MA; SUBEDI; REID, 2004; PURSEGLOVE, 1972; TOWNSEND; SCHOPER, 2001).

No Brasil, a legislação de sementes exige uma distância igual ou maior que 400 metros para produção de sementes híbridas de materiais geneticamente modificados. Em países como o Brasil, na faixa tropical e subtropical, temos a

vantagem de impedir o fluxo gênico usando tanto o isolamento espacial como o isolamento temporal, pelo fato do milho ser cultivado durante praticamente 6 a 8 meses do ano. Nessas latitudes, tem-se usado como isolamento temporal um mínimo de 40 dias da época de plantio de um campo em relação ao outro.

2.5 Descrição do milho TC1507 x DAS-59122-7 e de seus parentais milho TC1507 e milho DAS-59122-7

O milho TC1507 x DAS-59122-7 foi desenvolvido por meio de hibridação, sendo resultado do cruzamento entre o milho DAS-59122-7 e o milho TC1507 e a descrição de cada híbrido é apresentada a seguir.

2.5.1 Descrição do milho TC1507

O milho TC1507 é portador do gene *cry1F* que codifica a proteína CRY1F a qual confere resistência aos lepidópteros pragas e do gene *pat* que codifica a proteína PAT a qual confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio e foi aprovado pela CTNBio para uso comercial no Brasil (Extrato de Parecer Técnico N°1679/2008, publicado no Diário Oficial da União em 15/12/2008).

A linhagem de milho que contém o evento TC1507 foi obtida por transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* com a inserção de um fragmento de restrição do plasmídeo PHP8999 (Figura 1). Este fragmento, conhecido por inserto, possui uma construção gênica que contém o gene *cry1F* (Tabela 1 e Figura 2), de *Bacillus thuringiensis var. aizawai* e o gene *pat* oriundo do micro-organismo *Streptomyces viridochromogenes*. A expressão destes dois genes é controlada por promotores específicos, que regulam a transcrição do mRNA codificador das proteínas CRY1F e PAT.

O gene *cryIF* original de *Bacillus thuringiensis* foi otimizado para expressão em células vegetais. Essa otimização se fez necessária devido à propriedade do código genético de ser “degenerado”, o que significa que mais de um códon (trinca de bases) codifica um mesmo aminoácido. Sabe-se que a utilização dos códons pelos diferentes grupos de organismos na natureza varia com relação à utilização dos respectivos RNAs transportadores. Por este motivo, o gene *cryIF* passou por uma otimização para aumentar a relação de bases A-T/C-G, sem alterar a codificação dos aminoácidos, mas tornando-se mais semelhante em composição de bases aos genes de plantas. Essa otimização garantiu maior nível de expressão da proteína nas células vegetais. A proteína CRY1F é uma proteína cristal, também conhecida por delta-endotoxina, produzida pelo micro-organismo de solo *Bacillus thuringiensis* durante a fase de esporulação. A proteína expressa no milho TC1507 é uma versão truncada de 606 aminoácidos, que contém o núcleo ativo idêntico à proteína CRY1F original (Figura 5). A proteína CRY1F, quando expressa, confere às plantas de milho proteção contra o ataque de determinados insetos da ordem Lepidoptera considerados importantes pragas do milho. Entre estes insetos pragas estão a lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*) e a broca da cana (*Diatraea saccharalis*).

O gene *pat* expresso no milho TC1507 codifica a proteína fosfinotricina acetiltransferase (PAT). Este gene foi inicialmente isolado do micro-organismo *Streptomyces viridochromogenes* e, assim como os genes *cry*, passou por um processo de otimização da sequência gênica sem alteração da sequência proteica codificada. Esta otimização garante à célula vegetal uma melhor utilização de seus RNAs transportadores e por consequência, maior expressão da proteína. Esse gene está presente em uma série de eventos aprovados e amplamente cultivados em países do mundo todo.

Tabela 1 Sequências de DNA, organismos doadores e função dos elementos presentes na construção gênica do evento TC1507

Elemento Genético	Organismo doador	Função
<i>ubiZM 1PRO</i>	<i>Zea mays</i>	Promotor da ubiquitina de milho adicionado do íntron da ubiquitina e uma região 5' não traduzida. Sequência que regula a expressão do gene <i>cryIF</i> .
<i>cryIF</i> (trunc)	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i>	Versão sintética do gene truncado <i>cryIF</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> (otimizado para expressão em plantas).
ORF25 PolyA	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Sequência terminadora da transcrição de <i>cryIF</i> , obtida de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> pTi15955.
Promotor <i>CaMV 35S</i>	Vírus do Mosaico da Couve-flor	Promotor 35S do Vírus do Mosaico da Couve-flor, que controla a expressão do gene <i>pat</i> .
<i>pat</i>	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Gene que confere tolerância ao glufosinato de amônio otimizado para expressão em plantas, baseado no gene codificador da fosfinotricina acetiltransferase de <i>S. viridochromogenes</i> .
Terminador <i>CaMV 35S</i>	Vírus do Mosaico da Couve-flor	Sequência terminadora da transcrição 35S do Vírus do Mosaico da Couve-flor.

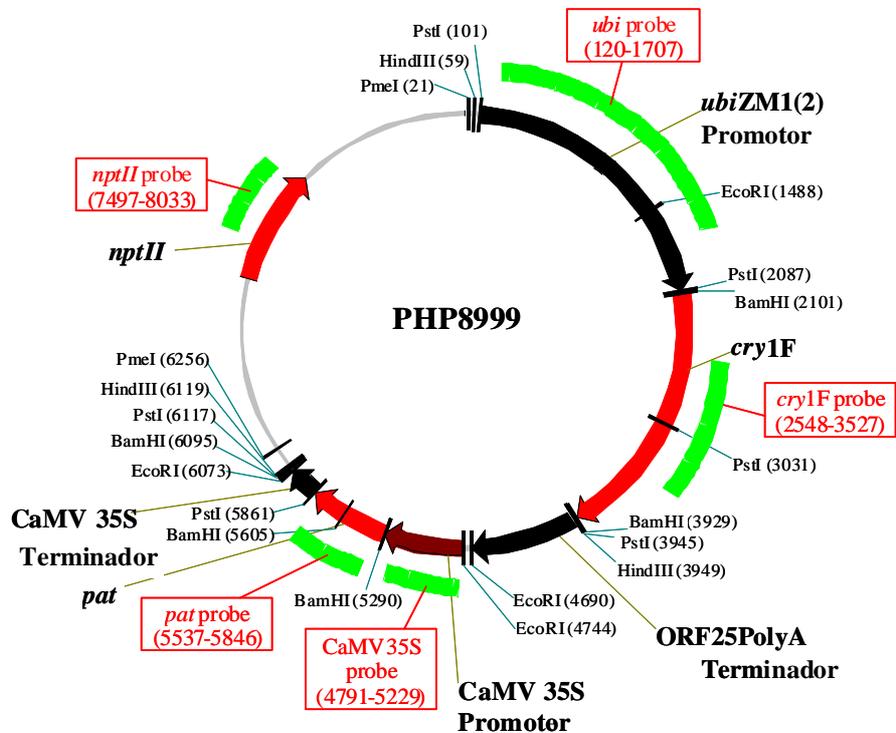


Figura 1 Mapa do plasmídeo PHP8999

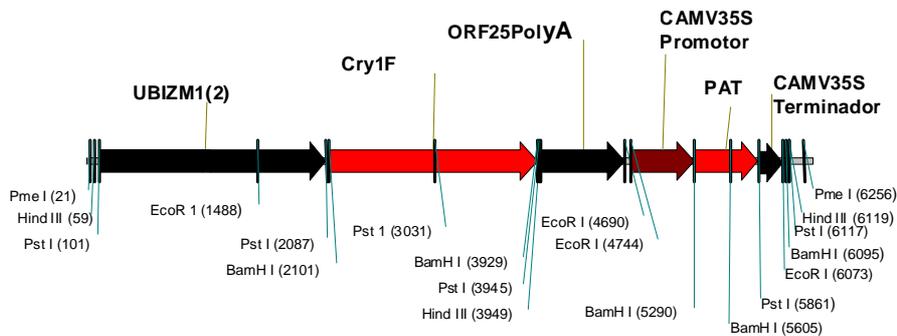


Figura 2 Construção gênica do evento TC1507

2.5.2 Descrição do milho DAS-59122-7

O milho DAS-59122-7 é portador do gene *cry34Ab1* que codifica a proteína CRY34AB1 que confere resistência aos lepidópteros pragas, do gene *cry35Ab1* que codifica a proteína CRY35AB1 que confere resistência aos coleópteros pragas da raiz e do gene *pat* que codifica a proteína PAT que confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio. Esse produto foi aprovado pela CTNBio para uso comercial no Brasil na data de 20 de junho de 2013 (Extrato de Parecer Técnico nº 3674/2013).

O milho DAS-59122-7 foi obtido por transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Neste processo, a construção gênica compreendida entre as bordas L e R do plasmídeo PHP17662 (Figura 3) foi transferida para o genoma da célula vegetal PHP17662 (ZUPAN; ZAMBRYSKI, 1995; ZUPAN; ZAMBRYSKI; CITOVSKEY, 2011). A construção gênica do evento DAS-59122-7 é constituída pelos genes *cry34Ab1*, *cry35Ab1* e *pat* (Tabela 2 e Figura 4).

Os embriões imaturos de milho e culturas de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa LBA4404) contendo o vetor de interesse foram manipulados em condições assépticas e em seguida dispostos em meio de cultura sólido formando uma cocultura. Após o cocultivo com a agrobactéria, os tecidos vegetais foram transferidos para um novo meio de cultura contendo antibióticos específicos e herbicida à base de glufosinato de amônio. Os antibióticos têm a finalidade de eliminar as agrobactérias que, num primeiro momento, são transferidas junto com o tecido vegetal para o novo meio de cultura e o herbicida tem ação seletiva para as células que receberam a construção gênica de interesse. O meio de cultura empregado permitiu a regeneração de plântulas originadas de células transformadas. Em determinado estágio de desenvolvimento, estas plântulas foram retiradas do meio de cultivo e levadas à casa de vegetação para

aclimação. As plantas obtidas nesse processo representam os eventos de transformação.

Os genes *cry34Ab1* e *cry35Ab1* foram isolados do micro-organismo *Bacillus thuringiensis*, estirpe PS149B1. As proteínas CRY34AB1 e CRY35AB1, codificadas por estes genes, apresentam tamanhos de 14 e 44 kDa, respectivamente (Figura 6 e Figura 7). Estas proteínas foram identificadas como heterodímeros, na qual se percebeu que a interação entre elas formava uma toxina binária que oferece às plantas de milho a proteção específica contra determinadas espécies de insetos pragas de raiz do gênero *Diabrotica*.

O gene *pat* codifica a proteína fosfinotricina acetiltransferase (PAT). Este gene foi inicialmente isolado do micro-organismo *Streptomyces viridochromogenes* e, assim como os genes *cry*, passou por um processo de otimização da sequência gênica sem alteração da sequência proteica codificada. Esta otimização garante à célula vegetal uma melhor utilização de seus RNAs transportadores e por consequência, maior expressão da proteína. Este gene está presente em uma série de eventos aprovados e amplamente cultivados em países do mundo todo. Apesar desta grande exposição e utilização, nunca se identificou qualquer efeito indesejado associado à presença desse gene ou de sua proteína.

Tabela 2 Sequências de DNA, organismos doadores e função dos elementos presentes na construção gênica do evento TC1507

Elemento Genético	Organismo doador	Função
RB (Right Border)	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Borda direita
ZmUb1 PRO	<i>Zea mays</i>	Promotor da ubiquitina de milho adicionado do íntron da ubiquitina e uma região 5' não traduzida.
<i>cry34Ab1</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Versão do gene <i>cry34Ab1</i> otimizada para expressão em plantas. Expressa a delta-endotoxina CRY34AB1 derivada da cepa PS149B1 de <i>Bacillus thuringiensis</i> .
PINII TERM	<i>Solanum tuberosum</i>	Sequência terminadora do inibidor de proteinase II de batata.
TA Peroxidase	<i>Triticum aestivum</i>	Promotor da peroxidase de raiz de trigo.
<i>cry35Ab1</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Versão do gene <i>cry35Ab1</i> otimizada para expressão em plantas. Expressa a delta-endotoxina CRY35AB1 derivada da cepa PS149B1 de <i>Bacillus thuringiensis</i> .
PINII	<i>Solanum tuberosum</i>	Sequência terminadora do inibidor de proteinase II de batata.
Promotor CAMV35S	Vírus do Mosaico da Couve-flor	Promotor 35S que controla a expressão do gene <i>pat</i> .
<i>pat</i>	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Versão otimizada para expressão em plantas do gene que codifica a fosfinotricina acetiltransferase (PAT), conferindo tolerância ao glufosinato de amônio.
Terminador CAMV35S	Vírus do Mosaico da Couve-flor	Sequência terminadora da transcrição do gene <i>pat</i> .
LB (Left Border)		Borda esquerda.

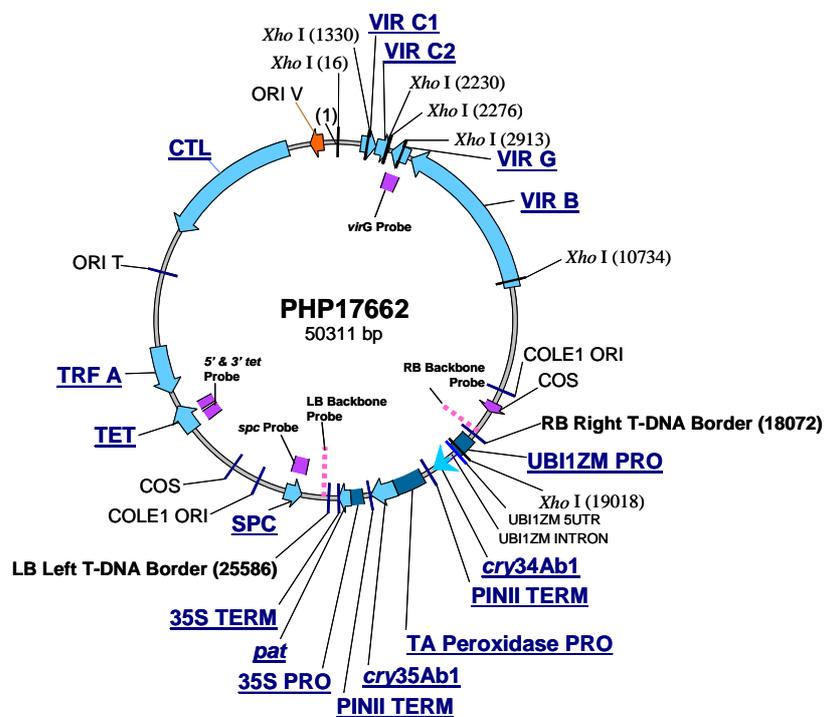


Figura 3 Mapa do plasmídeo PHP17662

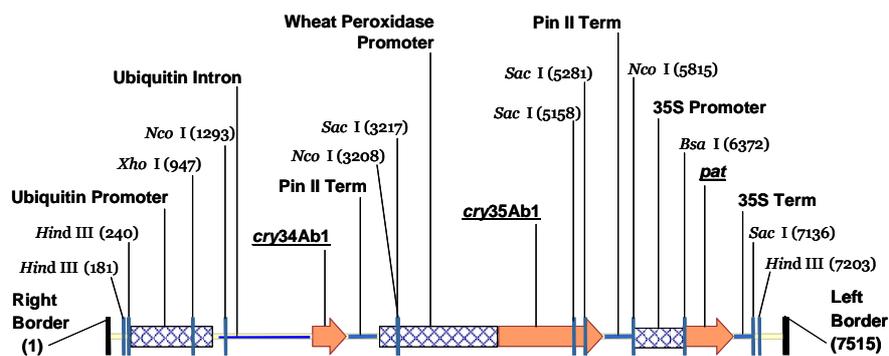


Figura 4 Construção gênica do evento DAS-59122-7

2.5.3 Descrição do milho TC1507 x DAS-59122-7

O milho TC1507 x DAS-59122-7 foi desenvolvido por meio de hibridação, sendo resultado do cruzamento entre o milho DAS-59122-7 portador dos genes *cry34Ab1*, *cry35Ab1* e *pat* que codificam as proteínas CRY34AB1, CRY35AB1 e PAT e milho TC1507 portador dos genes *cry1F* e *pat* que codificam as proteínas CRY1F e PAT, de forma que os insertos presentes nos parentais são herdados pelo milho TC1507 x DAS-59122-7.

Este produto foi aprovado pela CTNBio para uso comercial no Brasil na data de 20 de junho de 2013 (Extrato de Parecer Técnico nº 3674/2013).

Os genes *cry34Ab1*, *cry35Ab1* e *cry1F* codificam as proteínas CRY34AB1, CRY35AB1 e CRY1F respectivamente e foram identificados no micro-organismo de solo *Bacillus thuringiensis*. As proteínas CRY34AB1 e CRY35AB1 são específicas para a defesa das plantas contra determinados insetos pragas de raiz, da ordem Coleoptera. A proteína CRY1F, presente no evento TC1507, tem ação específica contra certos insetos pragas da ordem Lepidoptera.

O gene *pat* codifica a enzima fosfinotricina acetiltransferase (PAT) isolada do micro-organismo não patogênico *Streptomyces viridochromogenes*. A expressão desta enzima permite que a planta seja tolerante aos herbicidas à base de glufosinato de amônio.

Este milho combinado possui duas cópias do gene *pat*, cada uma oriunda de um dos eventos que compõe o produto combinado TC1507 x DAS-59122-7.

2.6 Os produtos de expressão dos genes inseridos no milho TC1507 x DAS-59122-7

O milho TC1507 x DAS-59122-7 é portador dos genes *cryIF*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1* e *pat* que codificam as proteínas CRY1F, CRY34AB1, CRY35AB1 e PAT. A descrição de cada proteína é apresentada a seguir.

2.6.1 Descrição das proteínas CRY

O *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria de solo gram positiva bastante comum e capaz de produzir esporos. Quando se encontra em condições de limitação de recursos, esta bactéria esporula, produzindo cristais proteicos. As proteínas presentes nestes cristais são chamadas de endotoxinas CRY e vêm sendo utilizadas na agricultura por décadas como bioinseticidas contra grupos específicos de insetos (ROMEIS; MEISSLE; BIGLER, 2006).

Este bacilo ocorre na natureza e sua associação com determinados insetos resulta de uma interessante e intensa relação biótica. Naturalmente patogênico aos insetos, o *Bacillus thuringiensis* infecta e se desenvolve nos indivíduos hospedeiros. No momento de sua reprodução, o bacilo produz cristais de inclusão compostos por toxinas específicas aos insetos. Após a morte do inseto por ação das toxinas, os esporos germinam e o micro-organismo pode desenvolver-se (PIGOTT; ELLAR, 2007). A coexistência destes dois organismos permitiu que *Bacillus thuringiensis* desenvolvesse uma série de toxinas altamente específicas a determinados insetos. Esta especificidade é garantida tanto pela sequência específica de aminoácidos da toxina, quanto pelo seu modo de ação. De modo semelhante às interações hormônio-receptor, as várias toxinas CRY possuem receptores específicos na superfície das células do intestino dos insetos, sendo seletivo até em relação aos insetos de uma mesma

ordem. Além disso, a proteína precursora produzida pelo micro-organismo apresenta inicialmente conformação inativa e inerte, sendo dependente do ambiente intestinal do inseto para desempenhar sua atividade (PIGOTT; ELLAR, 2007; SOBERÓN, 2007).

Em plantas geneticamente modificadas, as proteínas CRY possuem um comportamento bastante peculiar no que se refere à sua atividade. Após ser sintetizada na célula vegetal, a proteína CRY é montada de forma a bloquear seus domínios de interação, apresentando-se inerte e não suscetível às modificações por enzimas. Para desempenhar sua atividade é necessário que a proteína precursora seja solubilizada em pH alcalino e processada (clivada) em uma forma ativa, passando a expor os domínios de interação com o receptor, o que ocorre apenas no fluido intestinal do inseto suscetível. Após processada no intestino do inseto, a proteína CRY ativa se liga a receptores da família das aminopeptidases N e das caderinas na superfície das células intestinais do inseto alvo, de modo e especificidade mencionados anteriormente (GAHAN; GOULD; HECKEL, 2001; RAJAGOPAL, 2003). Esta interação culmina com a ativação da via de sinalização celular da apoptose (morte celular programada) nas células do inseto. Além da morte celular por apoptose, ocorre a formação de oligômeros entre as moléculas, que penetram a membrana da célula promovendo a formação de poros, causando alteração osmótica e lise celular, ocasionando a morte do inseto (ROMEIS; MEISSLE; BIGLER, 2006).

Não há evidências de agravos à saúde humana e animal decorrente da exposição ao *Bacillus thuringiensis* ou às proteínas CRY. As proteínas CRY de ação inseticida são conhecidas por apresentar um elevado grau de especificidade em sua toxicidade para pequenos grupos de insetos relacionados, geralmente dentro de uma ou duas ordens taxonômicas.

Estudos de toxicidade aguda e subcrônica foram conduzidos nos últimos 40 anos e demonstraram a segurança dos produtos à base de esporos de *Bacillus*

thuringiensis utilizados para o controle de insetos pragas que causam danos em várias culturas. Outros estudos com plantas geneticamente modificadas contendo genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* têm demonstrado que as proteínas CRY não são tóxicas para os seres humanos e não apresentam potencial alergênico significativo. Alimentos derivados das plantas geneticamente modificadas contendo genes *cry* já foram objetos de aprovação de agências reguladoras internacionais e foram considerados equivalentes aos produtos convencionais. A alta especificidade das proteínas CRY e sua rápida degradação no solo são fatores importantes para o aspecto ambiental e sua segurança tem sido comprovada pelo longo histórico de uso dessa tecnologia (DELANEY, 2008; ROMEIS; MEISSELE; BIGLER, 2006). Estudos de acúmulo e degradação dessas proteínas CRY no solo confirmam a sua rápida degradação, o que é mais um aspecto positivo em termos de segurança ambiental (HERMAN, 2002; WANG et al., 2006).

A proteína CRY1F expressa no milho TC1507 e as proteínas CRY34AB1 e CRY35AB1, expressas no milho DAS-59122-7, são ativas contra um grupo limitado de insetos lepidópteros e coleópteros pragas, respectivamente, que possuem receptores específicos na membrana celular intestinal, como a lagarta do cartucho, a broca do colmo, a lagarta da espiga e a broca da raiz e não são tóxicas para outros insetos ou organismos não alvos. Não existem evidências de que as proteínas inseticidas do tipo CRY tenham efeitos prejudiciais à saúde do homem ou de animais. A segurança do consumo de vegetais geneticamente modificados é suportada por uma abordagem multidisciplinar empregada durante a fase de testes de segurança alimentar (COCKBURN, 2002).

2.6.1.1 Descrição da proteína CRY1F

O gene *cry1F* otimizado para expressão em células vegetais codifica uma proteína CRY1F truncada que é idêntica ao núcleo ativo da delta endotoxina CRY1F de *Bacillus thuringiensis var. aizawai* e também da CRY1F microbiana derivada MR872. Essas três proteínas CRY1F são idênticas em seus primeiros 605 aminoácidos, com exceção de uma fenilalanina substituída por uma leucina na posição 604 (*F604L*). Esta alteração foi feita para a introdução de um sítio de restrição *Xho* I utilizado para fusão com a porção C-terminal na proteína. A sequência de aminoácidos da proteína CRY1F é apresentada na Figura 5.

```

1  MENNIQNQCV PYNCLNNPEV EILNEERSTG RLPDISLSL TRFLLSEFVP
51  GVGVAFLFD LIWGFITPSD WSLFLLQIEQ LIEQRIETLE RNRAITTLRG
101 LADSYEIIYIE ALREWEANPN NAQLREDVRI RFANTDDALI TAINNFTLTS
151 FEIPLLSVYV QANLHLSLL RDAVSFGQGW GLDIATVNNH YNRLINLIHR
201 YTKHCLDTYN QGLENLRGTN TRQWARFNQF RRDLTLTVLD IVALFPNYDV
251 RTYPIQTSSQ LTREIYTSSV IEDSPVSANI PNGFNRAEFG VRPPHLMDFM
301 NSLFVTAETV RSQTVWGGHL VSSRNTAGNR INFPSYGVFN PGGAIWIAD
351 DPRPFYRTLS DPVFVRGGFG NPHYVLGLRG VAFQQTGTNH TRTFRNSGTI
401 DSLDEIPPQD NSGAPWWDYS HVLNHVTFVR WPGEISGSDS WRAPMFSWTH
451 RSATPTNTID PERITQIPLV KAHTLQSGTT VVRGPGFTGG DILRRTSGGP
501 FAYTIVNING QLPQRYRARI RYASTTNLRI YVTVAGERIF AGQFNKMTMT
551 GDPLTFQSFS YATINTAFTF PMSQSSFTVG ADTFSSGNEV YIDRFELIPV
601 TATFEAEYDL ERAQKAVNAL FTSINQIGIK TDVTDYHIDR VSNLVECLSD
651 EFCLDEKKEL SEKVKHAKRL SDERNLLQDP NFRGINRQLD RGWRGSTDIT
701 IQGGDDVFKE NYVTLLGTFD ECYLTLYLYQK IDESKLKAYT RYQLRGYIED
751 SQDLEIYLIR YNAKHETVNV PGTGSLWRLS APSPI.....
801 ..... .GKCAHSHH FSLDIDVGCT DLNEDLGVVV IFKIKTQDGH
851 ARLGNLEFLE EKPLVGEALA RVKRAEKKWR DKREKLEWET NIVYKEAKES
901 VDALFVNSQY DRLQADTNIA MIHAADKRVH SIREAYLPEL SVIPGVNAAI

```

Figura 5 Sequência de aminoácidos da proteína CRY1F

Nota: Em vermelho está representada a fenilalanina que é substituída por uma leucina na sequência da proteína expressa pelo milho geneticamente modificado

2.6.1.2 Descrição das proteínas CRY34AB1 e CRY35AB1

Diversas estirpes de *Bacillus thuringiensis* são atualmente conhecidas por produzir uma variedade de proteínas inseticidas. Dentre estas proteínas, as delta-endotoxinas constituem a classe com mais representantes conhecidos. As proteínas precursoras das delta-endotoxinas possuem peso molecular médio que varia entre 125 e 140 kDa e após solubilização e processamento proteolítico no intestino do inseto, dão origem à proteína ativa de 55 a 75 kDa.

Trabalhos com a cepa PS149B1 de *Bacillus thuringiensis* identificaram proteínas cristais que mostraram toxicidade oral em larvas de raiz do milho em experimentos *in vitro*. Analisando-se os corpos de inclusão durante a esporulação desta cepa de *Bacillus thuringiensis*, os pesquisadores identificaram duas proteínas cujos pesos moleculares eram de aproximadamente 14 kDa (CRY34AB1) e 44 kDa (CRY35AB1). A clonagem e sequenciamento destes genes mostraram que ambos estão presentes em um mesmo operon, sendo, portanto expressos de forma conjunta (MOELLENBECK, 2001).

Utilizando as proteínas CRY34AB1 e CRY35AB1 produzidas em sistema heterólogo bacteriano, os pesquisadores conduziram bioensaios, nos quais observaram a necessidade de ambas as proteínas para a expressão da característica inseticida contra larvas de raiz do gênero *Diabrotica*.

Um trabalho foi realizado com o intuito de investigar o mecanismo de ação destas proteínas utilizando sistemas de lipossomos de bicamadas lipídicas. Nestes sistemas foi avaliado o efluxo de calceína ($C_{30}H_{26}N_2O_{13}$) e a atividade de canais iônicos, respectivamente. A calceína é um fluoróforo cujos comprimentos de onda de excitação e emissão são muito próximos, de modo que a emissão de uma molécula pode causar a excitação de outra próxima. Este fenômeno denomina-se “auto supressão”. Devido a esse fenômeno, altas concentrações presentes no interior dos lipossomos mostram baixa emissão de fluorescência.

Entretanto, ao ser liberada no exterior aquoso devido à danificação da membrana lipídica do lipossomo, a concentração é diluída, passando a emitir fluorescência até 10 vezes maior (MASSON, 2004). Os pesquisadores observaram que tanto a proteína binária CRY34AB1/CRY35AB1 nativa de *Bacillus thuringiensis* PS149B1, quanto às proteínas recombinantes CRY34AB1 e CRY35AB1 têm a capacidade de permeabilizar as camadas lipídicas. Sob pH alcalino, típico do observado no ambiente intestinal de insetos lepidópteros, observou-se somente a desestabilização da bicamada lipídica pela ação das proteínas. Entretanto, em pH ácido (~5,5) as proteínas CRY34AB1/CRY35AB1, recombinantes ou nativas, levaram à formação de canais iônicos nas bicamadas lipídicas. Esta observação é particularmente interessante, pois diferente dos lepidópteros, o ambiente intestinal das larvas de insetos coleópteros, como a *Diabrotica*, é também ácido. Esta característica, aliada à descoberta dos pesquisadores sobre a atividade das proteínas, mais uma vez corrobora com a alta especificidade tipicamente observada em proteínas do tipo CRY. Ao final do estudo, MASSON et al. (2004) concluem que as proteínas CRY34AB1/CRY35AB1, atuando de forma dimérica, apresentam mecanismos de ação semelhantes e equivalentes às demais proteínas CRY melhor caracterizadas.

As plantas de milho contendo o evento DAS-59122-7 expressam as proteínas CRY34AB1 e CRY35AB1, que apresentam peso molecular de 14 kDa e 44 kDa, respectivamente. Assim como os genes *cryIF* e *pat*, os genes que codificam estas duas proteínas CRY também foram otimizados para expressão em células vegetais. As sequências de aminoácidos dessas proteínas são idênticas às sequências das proteínas originais de *Bacillus thuringiensis*.

Os genes codificadores das proteínas CRY34AB1 e CRY35AB1 estão presentes na mesma construção gênica, sendo regulados por promotores específicos (Figura 4). A proteína CRY34AB1 otimizada é constituída por 123

aminoácidos (Figura 6) e a proteína CRY35AB1 possui 383 aminoácidos (Figura 7).

```

1   MSAREVHIDV NNKTGHTLQL EDKTKLDGGR WRTSPTNVAN DQIKTFVAES
51  NGFMTGTEGT IYYSINGEAE ISLYFDNPFA GSNKYDGHSN KSQYEIITQG
101 GSGNQSHVTY TIQTTSSRYG HKS*

```

Figura 6 Sequência de aminoácidos da proteína CRY34AB1

```

1   MLDTNKVYEI SNHANGLYAA TYLSLDDSGV SLMNKNDDDI DDYNLKWFLF
51  PIDDDQYIIT SYAANNCKVW NVNNDKINVS TYSSTNSIQK WQIKANGSSY
101 VIQSDNGKVL TAGTGQALGL IRLTDESSNN PNQQWNLTSV QTIQLPQKPI
151 IDTKLKDYPK YSPTGNIDNG TSPQLMGWTL VPCIMVNDPN IDKNTQIKTT
201 PYYILKKYQY WQRAVGSNVA LRPHEKKSYP YEWGTEIDQK TTIINTLGFQ
251 INIDSGMKFD IPEVGGGTDE IKTQLNEELK IEYSHETKIM EKYQEQSEID
301 NPTDQSMNSI GFLTITSLEL YRYNGSEIRI MQIQTSNDNT YNVTSPYNHQ
351 QALLLLTNHS YEEVEEITNI PKSTLKKLKK YYF*

```

Figura 7 Sequência de aminoácidos da proteína CRY35AB1

2.6.2 Descrição da proteína PAT

Os milhos TC1507, DAS-59122-7 e TC1507 x DAS-59122-7 expressam a proteína fosfinotricina acetiltransferase (PAT), que é codificada pelo gene *pat*. A proteína PAT é responsável por conferir às plantas a tolerância ao herbicida glufosinato de amônio.

Durante os processos de fotorrespiração e assimilação inorgânica de nitrogênio pelos vegetais, observa-se a formação expressiva de amônia, que é tóxica às plantas. Por meio da ação da enzima glutamina sintetase, a amônia gerada é incorporada na posição amida do aminoácido glutamato, dando origem ao aminoácido glutamina. Esta reação é responsável pela síntese de glutamina, além da importante função de detoxificação da amônia que é gerada na célula vegetal pelos processos de fotorrespiração e assimilação de nitrogênio.

O glufosinato de amônio constitui um análogo do glutamato e, portanto, da mesma forma apresenta afinidade à enzima glutamina sintetase. A ligação do herbicida à enzima determina a interrupção do processo de assimilação de amônia, que acaba por acumular na célula vegetal. Este acúmulo compromete o sistema de transporte de elétrons nos cloroplastos e mitocôndrias, também levando à síntese de radicais livres. Os radicais livres são capazes de promover a peroxidação de lipídeos de membrana e causar danos em componentes da célula, culminando com a morte celular. Por este motivo, o glufosinato de amônio é considerado um herbicida pró-oxidativo.

A enzima PAT tem ação sobre o glufosinato de amônio, sendo capaz de modificá-lo tornando o herbicida inativo e promove a acetilação do ingrediente ativo fosfinotricina (glufosinato de amônio) em seu grupamento amina livre. Esta forma acetilada do herbicida não mais possui afinidade pela enzima glutamina sintetase, que passa a desempenhar normalmente sua função. A enzima PAT é altamente específica ao ingrediente ativo do herbicida, não sendo capaz de acetilar qualquer outra proteína celular (THOMPSON, 1987).

Por meio de análises *in silico*, alguns pesquisadores determinaram que a proteína PAT não apresenta similaridade significativa de sequência com nenhuma proteína alergênica conhecida (HÉROUET, 2004). Conforme esperado, esta enzima apenas se assemelha a outras acetiltransferases devido a seu domínio funcional, grupo este de enzimas jamais relacionado à alergenicidade ou efeitos adversos à saúde humana e animal. Além disso, buscas em bancos de dados e ensaios bioquímicos determinaram que esta enzima não é modificada por glicosilação. Esta informação torna-se relevante uma vez que boa parte das proteínas alergênicas conhecidas sofre essa modificação pós-traducional. Ensaios com fluidos digestivos mostraram que a proteína PAT é rapidamente degradada. Em apenas alguns segundos, as enzimas pepstatina e

pancreatina foram suficientes para degradar a proteína PAT completamente (HÉROUET, 2004).

A proteína PAT foi degradada em níveis não detectáveis dentro dos cinco segundos posteriores a introdução em fluido gástrico simulado que continha pepsina, minimizando o potencial da proteína de ser absorvida pela mucosa intestinal ao ser consumida. Esses resultados no milho geneticamente modificado confirmaram dados de estudos anteriores de toxicidade da proteína PAT em outros eventos de milho tolerante ao glufosinato de amônio, em que foi evidenciado que a proteína PAT é rapidamente desnaturada pelo calor ou por pH ácido.

A enzima fosfinotricina acetiltransferase (PAT) tem um mecanismo de ação bastante específico e suas características bioquímicas garantem baixa estabilidade no sistema digestivo e baixo potencial alergênico.

O gene *pat* otimizado para expressão em plantas codifica uma proteína de 183 aminoácidos (Figura 8). A sequência de aminoácidos da proteína PAT expressa em plantas contendo o evento TC1507 é idêntica à sequência da proteína original isolada de *Streptomyces viridochromogenes*.

```
1  MSPERRPVEI  RPATAADMAA  VCDIVNHYIE  TSTVNFRTPEP  QTPQEWIDDL
51  ERLQDRYPWL  VAEVEGVVAG  IAYAGPWKAR  NAYDWTVEST  VYVSHRHQRL
101 GLGSTLYTHL  LKSMEAQGFK  SVVAVIGLPN  DPSVRLHEAL  GYTARGTLRA
151 AGYKHGGWHD  VGFWQRDFEL  PAPPRPVRPV  TQI
```

Figura 8 Sequência de aminoácidos da proteína PAT

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Híbridos de milho testados

Neste trabalho, foram testados os híbridos geneticamente modificados TC1507, DAS-59122-7 e TC1507 x DAS-59122-7 e seus respectivos iso-híbridos (Tabela 3).

Tabela 3 Descrição dos híbridos testados

Híbrido	Evento	Genes	Proteínas	Características
8480Hx	TC1507	<i>cry1F</i> e <i>pat</i>	CRY1F e PAT	Resistência a alguns lepidópteros e tolerância a glufosinato de amônio.
2A120RW	DAS-59122-7	<i>cry34Ab1</i> , <i>cry35Ab1</i> e <i>pat</i>	CRY34AB1, CRY35AB1 e PAT	Resistência a alguns coleópteros e tolerância a glufosinato de amônio
2A120XTRA	TC1507 x DAS-59122-7	<i>cry1F</i> , <i>cry34Ab1</i> , <i>cry35Ab1</i> e <i>pat</i>	CRY1F, CRY34AB1, CRY35AB1 e PAT	Resistência a alguns lepidópteros e coleópteros e tolerância a glufosinato de amônio
8480	---	---	---	Iso-híbrido
2A120	---	---	---	Iso-híbrido

3.2 Desenho experimental

Para a determinação da composição química e nutricional, as características agrônômicas e a expressão das proteínas do evento combinado TC1507 x DAS-59122-7 e de seus parentais TC1507 e DAS-59122-7, foram conduzidos 3 estudos totalizando 6 experimentos, sendo 3 experimentos na estação experimental da Dow AgroSciences em Indianópolis (MG) e 3 experimentos na estação experimental da Dow AgroSciences em Mogi Mirim

(SP). O delineamento utilizado foi de blocos casualizados, com 2 tratamentos e 4 repetições. As parcelas experimentais foram constituídas de 36 linhas de plantio com 40 metros de comprimento, com espaçamento de 0,76 metro entre linhas e densidade de 5 plantas por metro linear (Tabela 4). As parcelas experimentais receberam os insumos necessários e adequados às boas práticas agrônômicas, assegurando o bom desenvolvimento, sanidade e produtividade das plantas.

Tabela 4 Desenho experimental utilizado nos estudos de determinação da composição nutricional, das características agrônômicas e da expressão de proteínas

Parâmetros	Estudo 1	Estudo 2	Estudo 3
Delineamento	Blocos casualizados	Blocos casualizados	Blocos casualizados
Repetições	4	4	4
Tratamentos	8480Hx e 8480	2A120RW e 2A120	2A120XTRA e 2A120
Eventos	TC1507	DAS-59122-7	TC150-7 x DAS-59122-7
Parcelas	36 linhas de 40 metros	36 linhas de 40 metros	36 linhas de 40 metros
Espaçamento	0,76 m entre linhas	0,76 m entre linhas	0,76 m entre linhas
Densidade	5 plantas por metro linear	5 plantas por metro linear	5 plantas por metro linear
Locais	Indianópolis e Mogi Mirim	Indianópolis e Mogi Mirim	Indianópolis e Mogi Mirim
Data do Plantio	10/03/2007 e 05/03/2007	18/03/2010 e 10/03/2010	22/12/2009 e 09/03/2010
Data da Colheita	15/08/2007 e 24/07/2007	21/08/2010 e 30/07/2010	10/05/2010 e 07/08/2010
LPMA	01200.000440/2005-96	01200.001583/2008-68	01200.006006/2007-81

3.3 Condições climáticas observadas durante a condução dos experimentos

A precipitação pluviométrica e as temperaturas mínima, média e máxima foram medidas durante a condução dos estudos por estações climatológicas posicionadas nas estações experimentais da Dow AgroSciences em Indianópolis (MG) e em Mogi Mirim (SP) e as médias históricas para esses parâmetros tiveram como fonte os dados da Rede do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), do período de 1977 a 2010, registrados em estações meteorológicas próximas aos locais dos experimentos, em São Carlos (SP) e em Uberaba (MG).

A precipitação pluviométrica foi expressa em milímetros de lâmina de água (mm) e as temperaturas mínima, média e máxima são apresentadas em graus Celsius (°C).

Os parâmetros climáticos medidos nos locais de condução dos experimentos do Estudo 1, para determinação da composição química e nutricional, características agronômicas e expressão das proteínas do milho TC1507 mostraram que, em Indianópolis (MG), as médias de temperaturas observadas ficaram próximas às médias históricas para o período de condução do experimento, enquanto que as médias de precipitação pluviométrica observadas ficaram abaixo das médias históricas (171,7 mm e 381,5 mm respectivamente), conforme apresentado no Gráfico 1, indicando períodos de escassez hídrica em momentos críticos do desenvolvimento das plantas e do enchimento de grãos. Em Mogi Mirim (SP), os parâmetros climáticos medidos mostram que as médias de temperaturas e de precipitação pluviométrica foram semelhantes às médias históricas do período de condução do experimento, com disponibilidade hídrica em momento e quantidade adequada ao bom desenvolvimento das plantas e ao enchimento de grãos (Gráfico 2).

Os parâmetros climáticos medidos nos locais de condução dos experimentos do Estudo 2 para determinação da composição química e nutricional, características agronômicas e expressão das proteínas do milho DAS-59122-7 mostraram que, em Indianópolis (MG), as médias de temperaturas e de precipitação pluviométrica observadas ficaram próximas às médias históricas para o período de condução do experimento (Gráfico 3) com período de deficiência hídrica no período de enchimento de grãos, de maio a junho, como é típico nesta região. Em Mogi Mirim (SP), os parâmetros climáticos medidos mostram que as médias de temperaturas e de precipitação pluviométrica foram semelhantes às médias históricas do período de condução do experimento, com disponibilidade hídrica em momento e quantidade adequada ao bom desenvolvimento das plantas e ao enchimento de grãos (Gráfico 4).

Os parâmetros climáticos medidos nos locais de condução dos experimentos do Estudo 3 para determinação da composição química e nutricional, características agronômicas e expressão das proteínas do milho TC1507 x DAS-59122-7 mostraram que, em Indianópolis (MG) e em Mogi Mirim (SP), as médias de temperaturas observadas ficaram próximas às médias históricas para o período de condução do experimento, com disponibilidade hídrica em momento e quantidade adequada ao bom desenvolvimento das plantas e ao enchimento de grãos (Gráfico 5 e Gráfico 6 respectivamente).

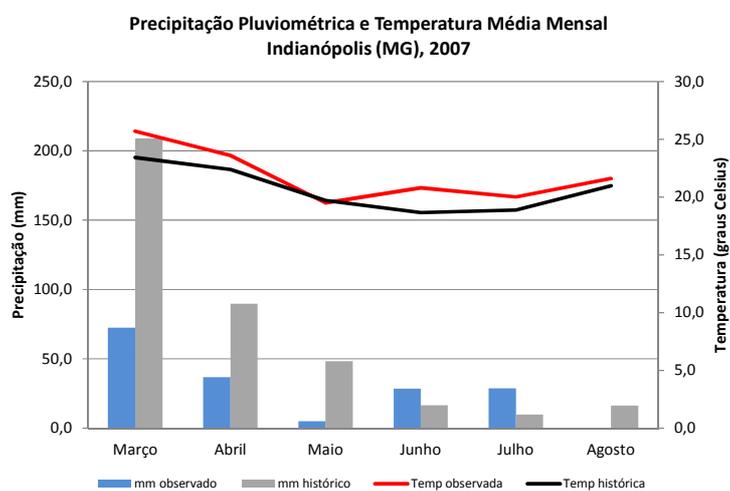


Gráfico 1 Precipitação pluviométrica e temperatura média mensal observadas em Indianópolis (MG) no período de condução dos experimentos do Estudo 1, ano de 2007

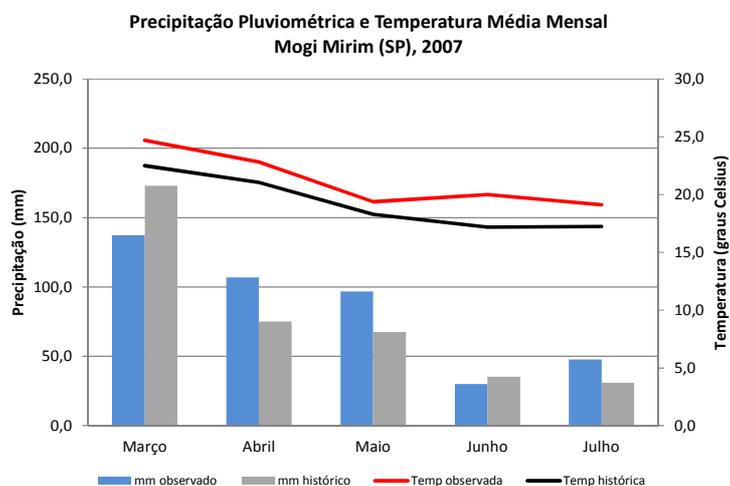


Gráfico 2 Precipitação pluviométrica e temperatura média mensal observadas em Mogi Mirim (SP) no período de condução dos experimentos do Estudo 1, ano de 2007

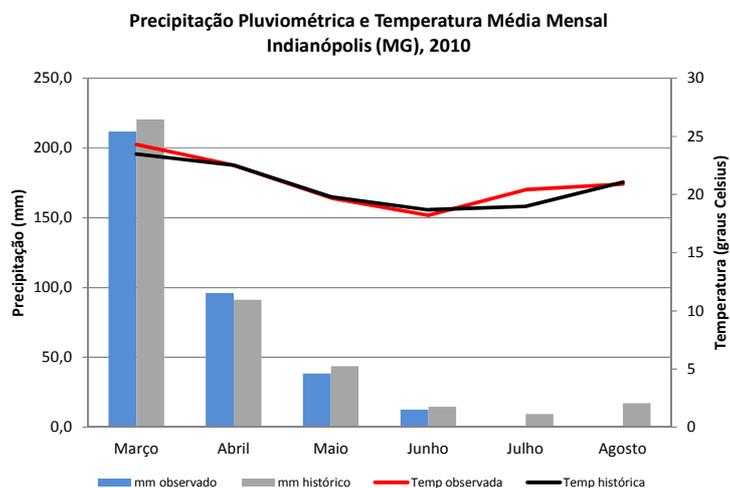


Gráfico 3 Precipitação pluviométrica e temperatura média mensal observadas em Indianópolis (MG) no período de condução dos experimentos do Estudo 2, ano de 2010

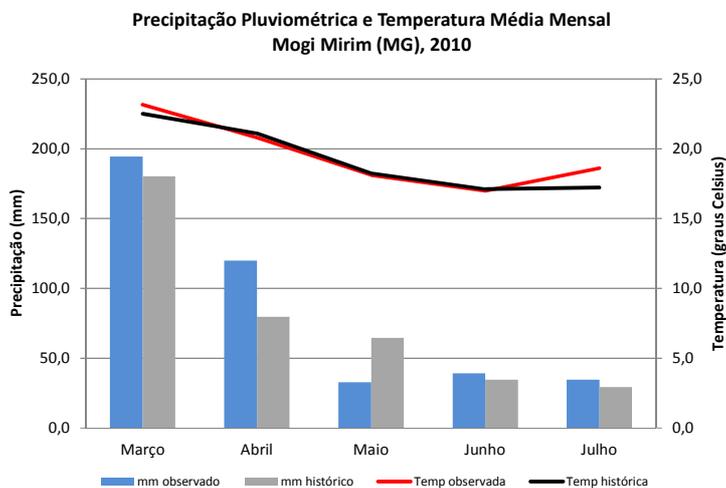


Gráfico 4 Precipitação pluviométrica e temperatura média mensal observadas em Mogi Mirim (SP) no período de condução dos experimentos do Estudo 2, ano de 2010

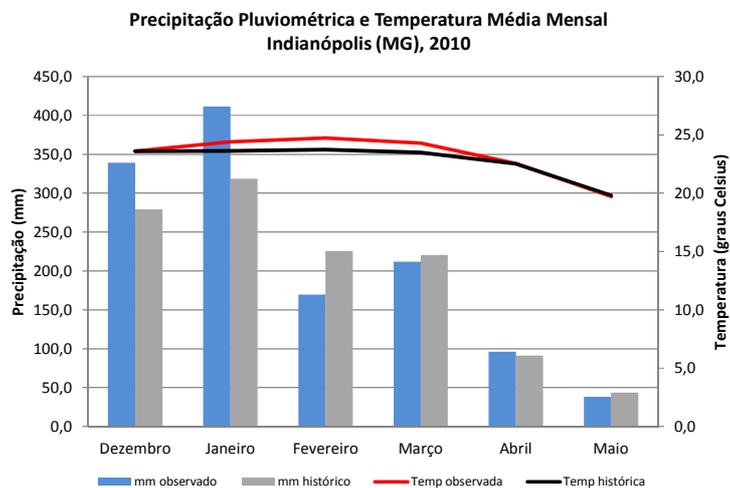


Gráfico 5 Precipitação pluviométrica e temperatura média mensal observadas em Indianópolis (MG) no período de condução dos experimentos do Estudo 3, anos de 2009 e 2010

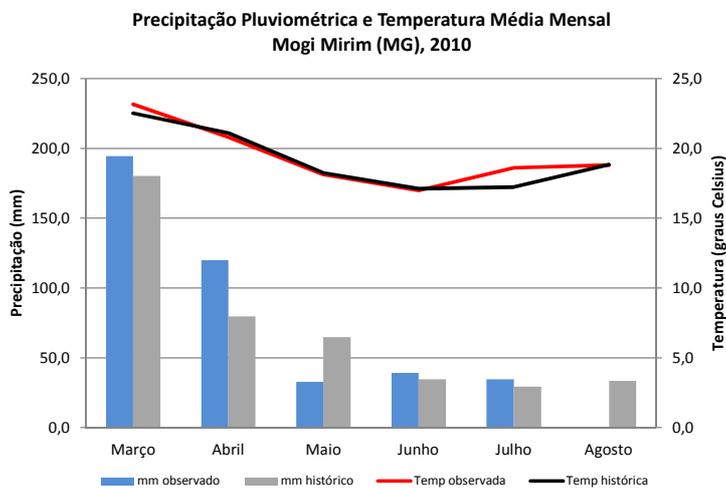


Gráfico 6 Precipitação pluviométrica e temperatura média mensal observadas em Mogi Mirim (SP) no período de condução dos experimentos do Estudo 3, ano de 2010

3.4 Determinação da composição química e nutricional do milho geneticamente modificado comparativamente ao iso-híbrido convencional

Foram amostrados tecidos de forragem no estádio R4 com grãos pastosos (6 amostras por repetição e 3 plantas por amostra) e de grãos no estádio R6 na maturação fisiológica (6 amostras por repetição, 3 espigas por amostra). Os grãos foram produzidos por meio de polinização artificial, por autofecundação, para eliminar o efeito de xênia de pólen estranho que poderia alterar a sua composição química e nutricional.

Os estádios fenológicos das plantas no momento da avaliação foram determinados através da escala apresentada na Tabela 5 (MAGALHÃES; DURÃES, 2006).

As amostras de grãos e de forragem de milho TC1507 foram analisadas no Laboratório da EMBRAPA Agroindústria de Alimentos (CTAA, CQB 0126/00, RJ, Brasil), para a determinação de sua composição química e nutricional e as amostras de grãos e de forragem dos milhos DAS-59122-7 e TC1507 x DAS-59122-7 foram analisadas no laboratório EPL BIO Analytical Services dos EUA para análise de sua composição nutricional.

Nas amostras de grãos, foram quantificados os teores de proteína bruta, extrato etéreo, cinzas, umidade, carboidrato, fibra bruta, fibra em detergente ácido (FDA), fibra em detergente neutro (FDN), minerais (cálcio, cobre, ferro, manganês, fósforo, potássio, sódio e zinco), aminoácidos (ácido aspártico, prolina, glicina, alanina, valina, tirosina, fenilalanina e histidina), ácidos graxos (palmítico (16:0), palmitoleico (16:1), heptadecanoico (17:0), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2), linolênico (18:3), araquídico (20:0), eicosenoico (20:1), behênico (22:0) e lignocérico (24:0)), vitaminas (tiamina, riboflavina, β -

caroteno, α -tocoferol, niacina, ácido fólico e piridoxina) e antinutrientes (ácido fítico e inibidor de tripsina).

Nas amostras de forragem, foram quantificados os teores de cinzas, extrato etéreo, umidade, proteína, carboidrato, fibra bruta, fibra em detergente ácido (FDA), fibra em detergente neutro (FDN) e minerais (cálcio, fósforo, cobre, ferro, manganês, potássio, sódio e zinco).

Os dados foram analisados por meio do programa SAS Versão 9.1 (SAS, 2004). As diferenças significativas foram estimadas com intervalo de 95% de confiança. Os dados não foram arredondados para análise estatística. O nível de significância para efeito de tratamento foi estimado usando o Teste F. Os contrastes pareados foram feitos entre o híbrido de milho geneticamente modificado e o iso-híbrido usando o Teste t. Diferenças significativas nos contrastes de médias foram consideradas nos casos do valor de P ser menor que 0,05.

Tabela 5 Estádios fenológicos do milho

Estádio	Descrição
VE	Germinação e emergência
V2	Duas folhas completamente desenvolvidas
V4	Quatro folhas completamente desenvolvidas
V9	Nove folhas completamente desenvolvidas
Vn	Última folha emitida antes do pendoamento
Vt	Pendoamento
R1	Embonecamento e polinização
R2	Grão “bolha d’água”
R3	Grão leitoso
R4	Grão pastoso
R5	Formação de dente
R6	Maturidade fisiológica

Fonte: (MAGALHÃES; DURÃES, 2006).

Os resultados gerados a partir de grãos e de forragem dos híbridos de milho portadores dos eventos transgênicos e de seu iso-híbrido foram comparados com os valores de referência citados na literatura (WATSON, 1982; 1987; ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, OECD, 2002; ILSI, 2010), conforme apresentado na Tabela 6 até a Tabela 12.

Tabela 6 Variações descritas na literatura para análise centesimal e fibras de grãos

Componente (% de peso seco)	Watson (1982)	Watson (1987)	OECD (2002)	ILSI versão 4.1 (2010)	Médias combinadas
Proteína Bruta	8,00-14,00	6,00-12,00	6,00-12,70	6,15-17,30	6,00-17,30
Extrato Etéreo	1,20-18,8	NR	NR	2,47-5,90	1,20-18,80
Cinzas	1,10-3,90	1,10-3,90	1,10-3,90	0,62-6,28	0,62-6,28
Umidade (% peso fresco)	7,00-23,00	7,00-23,00	7,00-23,00	6,10-40,50	6,10-40,50
Carboidratos ^a	63,30- 89,70	78,40- 89,80	82,20- 82,90	77,4-89,50	63,30- 89,80
Fibra Bruta	NR	NR	NR	0,49-3,26	0,49-3,26
Fibra em Detergente Ácido	3,00-4,30	3,30-4,30	3,00-4,30	1,82-11,30	1,82-11,30
Fibra em Detergente Neutro	8,30-11,90	8,30-11,90	8,30-11,90	5,59-22,60	5,59-22,60

^a Carboidratos são calculados como porcentagem de peso seco = 100% peso seco total - % proteína - % gordura - % cinzas.

Tabela 7 Variações descritas na literatura para análise de minerais em grãos

Componente (mg/100g de peso seco)	Watson (1982)	Watson (1987)	OECD (2002)	ILSI versão 4.1 (2010)	Médias combinadas
Cálcio	10,00- 100,00	10,00- 100,00	3,00-100,00	1,27-20,80	1,27-100,00
Cobre	0,09-1,00	0,09-1,00	0,09-1,00	0,07-1,85	0,07-1,85
Ferro	0,10-10,00	0,10-10,00	0,10-10,00	1,04-4,91	0,10-10,00
Manganês	0,07-5,40	0,07-5,40	NR	0,17-1,43	0,07-5,40
Fósforo	260,00- 750,00	260,00- 750,00	234,00- 750,00	147,00- 533,00	147,00- 750,00
Potássio	320,00- 720,00	320,00- 720,00	320,00- 720,00	181,00- 603,00	181,00- 720,00
Sódio	0,00-150,00	0,00-150,00	0,00-150,00	0,02-73,2	0,00-150,00
Zinco	1,20-3,00	1,20-3,00	1,20-3,00	0,65-3,72	0,65-3,72

Tabela 8 Variações descritas na literatura para análise de aminoácidos em grãos

Componente (% de peso seco)	Watson (1982)	OECD (2002)	ILSI versão 4.1 (2010)	Médias combinadas
Ácido Aspártico	0,58-0,72	0,48-0,85	0,33-1,21	0,33-1,21
Prolina	0,66-1,03	0,63-1,36	0,46-1,63	0,46-1,63
Glicina	0,26-0,47	0,26-0,49	0,18-0,54	0,18-0,54
Alanina	0,64-0,99	0,56-1,04	0,44-1,39	0,44-1,39
Valina	0,21-0,52	0,21-0,85	0,27-0,86	0,21-0,86
Tirosina	0,29-0,47	0,12-0,79	0,10-0,64	0,10-0,79
Fenilalanina	0,29-0,57	0,29-0,64	0,24-0,93	0,24-0,93
Histidina	0,20-0,28	0,15-0,38	0,14-0,43	0,14-0,43

Tabela 9 Variações descritas na literatura para análise de ácidos graxos em grãos

Componente (% ácidos graxos totais)	Watson (1982)	OECD (2002)	ILSI versão 4.1 (2010)	Médias combinadas
16:0 Palmítico	7,00-19,00	8,60-16,5	7,94-20,70	7,00-20,70
16:1 Palmitoleico	1,00	ND-0,50	0,09-0,45	ND-1,00
17:0 Heptadecanoico	NR	ND-0,10	0,08-0,11	ND-0,11
18:0 Esteárico	1,00-3,00	ND-3,30	1,02-3,4	ND-3,40
18:1 Oleico	20,00-46,00	20,00-42,20	17,4-40,2	17,4-46,00
18:2 Linoleico	35,00-70,00	34,00-65,60	36,2-66,5	34,00-70,00
18:3 Linolênico	NR	NR	2,25	2,25
20:0 Araquídico	0,10-2,00	0,30-1,00	0,10-2,00	0,1-2,00
20:1 Eicosenoico	NR	NR	1,92	1,92
22:0 Behênico	NR	ND-0,50	0,11-0,35	ND-0,50
24:0 Lignocérico	NR	ND-0,50	0,14-0,23	0,14-0,53

Tabela 10 Variações descritas na literatura para análise de vitaminas em grãos

Componente (mg/Kg peso seco)	Watson (1982)	Watson (1987)	OECD (2002)	ILSI versão 4.1 (2010)	Médias combinadas
Tiamina	3,00-8,60	3,00-8,60	2,30-8,60	1,30-40,00	1,30-40,00
Riboflavina	0,25-5,60	0,25-5,60	NR	0,45-2,16	0,25-5,60
β -Caroteno	0,30-5,40	0,50-2,50	0,49-2,18	0,19-46,8	0,19-46,80
α -Tocoferol (IU/kg)	3,00-12,10	17,00-47,00	NR	1,50-68,70	1,50-68,70
Niacina	9,30-70,00	9,30-70,00	9,30-70,00	10,40-46,90	9,30-70,00
Ácido Fólico	10,00-68,30	0,10-0,30	0,17-0,46	0,15-1,46	0,15-68,30
Piridoxina	9,60	5,30	4,60-9,60	3,68-11,30	3,68-11,30

Nota: ^a IU/Kg significa Unidades Internacionais por quilograma.

Tabela 11 Variações descritas na literatura para análise de antinutrientes em grãos

Componente (% de peso seco)	OECD (2002)	ILSI versão 4.1 (2010)	Médias combinadas
Ácido fítico	0,45-1,00	1,00-1,57	0,45-1,57
Inibidor de Tripsina (TIU/mg)	NR	0,00-7,18	0,00-7,18

^a TIU= unidades de inibir de tripsina.

^b NR= não relatado em literatura.

Tabela 12 Variações descritas na literatura para análise centesimal, fibras e minerais de forragem

Componente (% de peso seco)	Watson (1982)	ILSI versão 4.1 (2010)	Médias combinadas
Proteína Bruta	3,50-15,90	3,14-11,6	3,14-15,90
Extrato Etéreo	0,70-6,70	0,29-4,57	0,29-6,70
Cinzas	1,30-10,50	1,53-9,64	1,30-10,50
Umidade (% peso fresco)	53,30-87,50	49,10-81,30	49,10-87,50
Carboidratos ^a	66,90-94,50	76,40-92,10	66,90-94,50
Fibra Bruta	19,00-42,00	NR	19,00-42,00
Fibra em Detergente Ácido	30,00 (média)	16,10-47,40	16,10-47,40
Fibra em Detergente Neutro	51,00 (média)	20,30-63,70	20,30-63,70
Cálcio	200,00-600,00	71,40-576,80	71,00-600,00
Fósforo	150,00-550,00	93,60-370,40	94,00-550,00

^a Carboidratos são calculados como porcentagem de peso seco = 100% peso seco total - % proteína - % gordura - % cinzas.

3.5 Avaliação das características agrônômicas do milho geneticamente modificado comparativamente ao iso-híbrido convencional

Para a determinação das características agrônômicas do milho TC1507 x DAS-59122-7 e de seus parentais TC1507 e DAS-59122-7, foram conduzidos 6 estudos, sendo 3 estudos realizados na estação experimental da Dow AgroSciences em Indianópolis (MG) e 3 estudos na estação experimental da Dow AgroSciences em Mogi Mirim (SP).

Os resultados agronômicos avaliados no híbrido geneticamente modificado e no iso-híbrido foram comparados em análise conjunta das localidades.

Os dados foram analisados por meio do programa SAS Versão 9.1 (SAS INSTITUTE, 2004).

As diferenças significativas entre os tratamentos foram estimadas pelo Teste F com 95% de confiança.

As médias do milho TC1507 foram comparadas com as médias do iso-híbrido pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os contrastes pareados entre o milho DAS-59122-7 e seu iso-híbrido, assim como os contrastes entre o milho TC1507 x DAS-59122-7 e o seu iso-híbrido, foram feitos por meio do Teste t a 5% de probabilidade. Diferenças significativas nos contrastes de médias foram consideradas nos casos do valor de P ser menor que 0,05.

Foram quantificados parâmetros agronômicos de vigor de plântula, florescimento feminino, florescimento masculino, altura de planta, altura da espiga principal, tombamento, incidência de doenças R6, dano de inseto R4 e produtividade de grãos (Tabela 13).

Os estádios fenológicos das plantas no momento da avaliação foram determinados através da escala apresentada na Tabela 5 (MAGALHÃES; DURÃES, 2006).

Tabela 13 Descrição das características agrônômicas avaliadas nos estudos para o milho geneticamente modificado e o iso-híbrido

Característica	Estádio de Desenvolvimento	Descrição do Dado
Vigor de plântula	V2-V4 (2ª a 4ª folha expandida)	Estimativa visual média de vigor de plantas emergidas por parcela
Florescimento feminino	Aproximadamente 50% das plantas com estilo-estigmas expostos	Número de dias após o plantio com aproximadamente 50% das plantas em florescimento
Florescimento masculino	Aproximadamente 50% das plantas estão em antese	Número de dias após o plantio com aproximadamente 50% das plantas em florescimento.
Altura da planta	R6 (maturação fisiológica)	Altura até a extremidade do pendão
Altura da espiga	R6 (maturação fisiológica)	Altura do nó da espiga primária
Tombamento	R6 (maturação fisiológica)	Estimativa visual da porcentagem de plantas tombadas na parcela.
Incidência de doenças	R6 (maturação fisiológica)	Estimativa visual, escala de 1-9, sendo 1 com alta incidência
Danos por insetos	R4 (grão pastoso)	Estimativa visual, escala de 1-9, sendo 1 com alto dano
Produtividade de Grãos	Grãos em ponto de colheita	Kg/hectare a 13% de umidade

3.6 Quantificação da expressão das proteínas transgênicas do milho portador dos eventos combinados comparativamente aos parentais contendo os eventos singulares

Para a determinação da expressão das proteínas transgênicas do milho TC1507 x DAS-59122-7 e de seus parentais milho TC1507 e milho DAS-59122-7, foram conduzidos 6 estudos, sendo 3 estudos realizados na estação

experimental da Dow AgroSciences em Indianópolis (MG) e 3 estudos na estação experimental da Dow AgroSciences em Mogi Mirim (SP).

Foram amostrados tecidos de folhas nos estádios V9 e R1 (6 amostras por repetição, 20 folhas por amostra), de raízes nos estádios V9 e R1 (6 amostras por repetição, 3 raízes por amostra), de forragem no estádio R4 (6 amostras por repetição, 3 plantas sem raízes por amostra), de grãos no estádio R6 (6 amostras por repetição, 3 espigas por amostra) e de planta inteira nos estádios V9 e R6 (6 amostras por repetição, 3 plantas com raízes por amostra). As amostras dos tecidos foram preparadas para a análise de expressão das proteínas por meio de uma moagem em peneiras grossas, liofilização e moagem fina, quando necessário, usando-se o moinho Geno/Grinder. Todas as amostras foram armazenadas com temperatura monitorada para aproximadamente -80 °C, sendo removidas para preparo das amostras e análises.

Os estádios fenológicos das plantas no momento da avaliação foram determinados através da escala apresentada na Tabela 5 (MAGALHÃES; DURÃES, 2006).

As análises para determinação das proteínas CRY1F, CRY34AB1, CRY35AB1 e PAT, em tecidos de milho, foram realizadas no Laboratório de Ciências Regulatórias da Dow AgroSciences em Mogi Mirim (SP).

Para a determinação da concentração da proteína CRY1F em tecidos de milho, foi utilizado o método analítico GRM 02.30 (SHAN; EMBREY, 2003b); para a proteína PAT, foi utilizado o método GRM 07.25 (LYON; THOMAS, 2010); para a proteína CRY34AB1, foi utilizado o método PHI2003 (SHAN; EMBREY, 2003c) e para a proteína CRY35AB1, foi utilizado o método GRM 03.13 (SHAN; EMBREY, 2003a).

As concentrações das proteína nas amostras (ng/mg) são expressas em base de peso seco de tecido e concentrações foram consideradas como não

detectáveis quando os resultados das amostras foram menores que o limite de detecção ($< \text{LOD}$) do método.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição química e nutricional do milho TC1507 x DAS-59122-7 e de seus componentes singulares milho TC1507 e milho DAS-59122-7

Os resultados das análises dos parâmetros de composição química e nutricional dos milhos TC1507, DAS-59122-7 e TC1507 x DAS-59122-7 foram comparados com os resultados avaliados nos respectivos iso-híbridos.

4.1.1 Composição química e nutricional do milho TC1507 comparativamente ao iso-híbrido

A composição química e nutricional do milho TC1507 foi comparada com composição do iso-híbrido, conforme apresentado a seguir.

4.1.1.1 Análise centesimal e fibras em grãos

Os teores detectados de cinzas, umidade, fibra bruta e fibra em detergente neutro situaram-se dentro dos limites dos valores de referência citados em literatura apresentados na Tabela 6 (WATSON, 1982; 1987; OECD, 2002; INTERNATIONAL LIFE SCIENCES INSTITUTE, ILSI, 2010) e foram estatisticamente semelhantes entre o milho TC1507 e o iso-híbrido (Tabela 14). Os valores determinados para carboidratos e fibra em detergente neutro ficaram ligeiramente abaixo dos valores de referência citados em literatura, porém foram estatisticamente semelhantes entre o híbrido TC1507 e o híbrido convencional, o que sugere que a diminuição na média deste analito tenha sido causado por condições de escassez hídrica observada em Indianópolis (MG) no momento do enchimento dos grãos, conforme mostrado no Gráfico 1. O teor de extrato

etéreo, determinado no milho TC1507, mostrou-se estatisticamente diferente quanto comparado ao iso-híbrido, mas ficou dentro dos limites dos valores de referência citados em literatura, o que pode indicar diferenças na síntese deste analito pelo híbrido geneticamente modificado comparativo ao iso-híbrido, mas em níveis cuja variação pode ser considerada aceitável por estar compreendida entre os limites de literatura.

Tabela 14 Resultados de composição centesimal e fibras em grãos do milho TC1507 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 1 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Análise Centesimal e Fibras (% de peso seco)	Milho TC1507	Milho Iso-híbrido	valor de P
Proteína Bruta	6,75	6,78	0,96 ns
Extrato Etéreo	2,15	2,46	0,03 s
Cinzas	0,80	0,80	0,96 ns
Umidade (% base úmida)	35,57	33,66	0,50 ns
Carboidrato	54,74	56,31	0,40 ns
Fibra Bruta	1,73	1,78	0,90 ns
Fibra em Detergente Ácido (FDA)	1,38	1,40	0,80 ns
Fibra em Detergente Neutro (FDN)	8,51	8,90	0,80 ns

4.1.1.2 Análise de minerais em grãos

Os teores detectados de cálcio, ferro, manganês, potássio e zinco situaram-se dentro dos limites dos valores de referência citados em literatura apresentados na Tabela 7 (WATSON, 1982; 1987; OECD, 2002; ILSI, 2010) e foram estatisticamente semelhantes entre o milho TC1507 e o iso-híbrido (Tabela 15). Os teores de cobre e sódio ficaram abaixo do limite de detecção do

método. Os valores de fósforo quantificados em ambos os tipos de híbridos ficaram ligeiramente abaixo dos valores de referência citados em literatura, porém foram estatisticamente semelhantes entre o híbrido TC1507 e o híbrido convencional, o que sugere que a diminuição da média deste analito tenha sido causado por condições de escassez hídrica observada em Indianópolis (MG) no momento do enchimento dos grãos, conforme mostrado no Gráfico 1.

Tabela 15 Resultados de composição de minerais em grãos do milho TC1507 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 1 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Minerais (mg/100g peso seco)	Milho TC1507	Milho Iso-híbrido	valor de P
Cálcio	2,28	1,99	0,57 ns
Cobre	< LOD	< LOD	
Ferro	1,11	1,23	0,36 ns
Manganês	0,17	0,19	0,60 ns
Fósforo	141,70	142,30	0,96 ns
Potássio	214,40	210,30	0,64 ns
Sódio	< LOD	< LOD	
Zinco	1,08	1,25	0,20 ns

4.1.1.3 Análise de aminoácidos em grãos

Os teores dos aminoácidos prolina, glicina, alanina, valina, tirosina, fenilalanina e histidina ficaram dentro dos limites dos valores de referência citados em literatura apresentados na Tabela 8 (WATSON, 1982; OECD, 2002; ILSI, 2010) e foram estatisticamente semelhantes entre o milho DAS-59122-7 e o iso-híbrido (Tabela 16). O teor de ácido aspártico do milho TC1507 foi

estatisticamente inferior ao do iso-híbrido, mas ficou dentro dos limites citados em literatura, o que pode indicar diferenças na síntese deste analito pelo híbrido geneticamente modificado comparativo ao iso-híbrido, mas em níveis cuja variação pode ser considerada aceitável por estar compreendida entre os limites de literatura.

Tabela 16 Resultados da composição de aminoácidos em grãos do milho TC1507 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 1 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Aminoácidos (% de peso seco)	Milho TC1507	Milho Iso-híbrido	valor de P
Ácido Aspártico	0,35	0,51	0,03 s
Prolina	0,66	0,62	0,65 ns
Glicina	0,29	0,26	0,52 ns
Alanina	0,59	0,58	0,97 ns
Valina	0,38	0,36	0,59 ns
Tirosina	0,41	0,39	0,52 ns
Fenilalanina	0,44	0,40	0,53 ns
Histidina	0,24	0,23	0,68 ns

4.1.1.4 Análise de ácidos graxos em grãos

Os teores detectados dos ácidos graxos palmítico (16:0), palmitoleico (16:1), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2), linolênico (18:3), araquídico (20:0), eicosenoico (20:1) e behênico (22:0) situaram-se dentro dos limites dos valores de referência citados em literatura apresentados na Tabela 9 (WATSON, 1982; OECD, 2002; ILSI, 2010) e foram estatisticamente semelhantes entre o milho TC1507 e o iso-híbrido (Tabela 17). Os valores determinados para os ácidos graxos heptadecanoico (17:0) e lignocérico (24:0),

nas amostras de grãos do milho TC1507 e de seu iso-híbrido, ficaram ligeiramente acima dos valores de referência citados em literatura, entretanto foram estatisticamente semelhantes em ambos os híbridos, o que sugere que o aumento nos níveis desses dois ácidos graxos tenha acontecido devido às condições climáticas ocorridas no período de condução dos experimentos na localidade e devido também à baixa concentração desses analitos naturalmente observável em grãos de milho, o que pode ter levado ao maior erro experimental dos resultados das análises.

Tabela 17 Resultados de composição de ácidos graxos em grãos do milho TC1507 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 1 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Ácidos graxos (% total ácidos graxos)	Milho TC1507	Milho Iso-híbrido	valor de P
Palmítico (16:0)	16,69	16,43	0,64 ns
Palmitoleico (16:1)	0,18	0,18	0,52 ns
Heptadecanoico (17:0)	0,13	0,15	0,54 ns
Esteárico (18:0)	2,38	2,51	0,09 ns
Oleico (18:1)	30,83	32,47	0,26 ns
Linoleico (18:2)	46,09	43,70	0,50 ns
Linolênico (18:3)	1,05	0,93	0,33 ns
Araquídico (20:0)	0,51	0,53	0,34 ns
Eicosenoico (20:1)	0,28	0,28	0,64 ns
Behênico (22:0)	0,29	0,27	0,40 ns
Lignocérico (24:0)	0,27	0,29	0,47 ns

4.1.1.5 Análise de vitaminas em grãos

Os teores detectados das vitaminas tiamina e riboflavina situaram-se dentro dos limites dos valores de referência citados em literatura apresentados na Tabela 10 (WATSON, 1982; 1987; OECD, 2002; ILSI, 2010) e foram estatisticamente semelhantes entre o milho TC1507 e o iso-híbrido (Tabela 18).

Esses resultados mostram a equivalência entre os teores de vitaminas presentes nos grãos do híbrido geneticamente modificado TC1507 e nos do iso-híbrido, indicando não haver diferença substancial entre eles, para os analitos avaliados.

Tabela 18 Resultados de composição de vitaminas em grãos do milho TC1507 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 1 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Vitamina (ppm peso seco)	Milho TC1507	Milho Iso-híbrido	valor de P
Tiamina	2,80	2,91	0,69 ns
Riboflavina	1,37	1,40	0,72 ns

4.1.1.6 Análise de antinutrientes em grãos

Os teores detectados de ácido fítico e inibidor de tripsina situaram-se dentro dos limites dos valores de referência citados em literatura apresentados na Tabela 11 (OECD, 2002; ILSI, 2010) e foram estatisticamente semelhantes entre o milho TC1507 e o iso-híbrido (Tabela 19).

Esses resultados mostram a equivalência entre os teores de antinutrientes presentes nos grãos do híbrido geneticamente modificado TC1507 e nos do iso-híbrido, indicando não haver diferença substancial entre eles, para os analitos avaliados.

Tabela 19 Resultados de composição de antinutrientes em grãos do milho TC1507 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 1 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Antinutrientes	Milho TC1507	Milho Iso-híbrido	valor de P
Ácido Fítico (% de peso seco)	0,33	0,36	0,68 ns
Inibidor de Tripsina (TIU/mg)	1,70	1,31	0,23 ns

4.1.1.7 Análise centesimal, fibras e minerais em forragem

Os teores detectados de extrato etéreo, umidade, fibra bruta, fibra em detergente ácido (FDA) e fibra em detergente neutro (FDN) situaram-se dentro dos limites dos valores de referência citados em literatura apresentados na Tabela 12 (WATSON, 1982; ILSI, 2010) e foram estatisticamente semelhantes entre o milho TC1507 e o iso-híbrido (Tabela 20).

Os valores determinados para cinzas, proteína, carboidrato, cálcio e fósforo ficaram abaixo dos valores de referência citados em literatura, porém

foram estatisticamente semelhantes entre o híbrido TC1507 e o híbrido convencional, o que sugere que a diminuição deste analito tenha sido causado por condições de escassez hídrica observada em Indianópolis (MG) no momento do enchimento dos grãos, conforme mostrado no Gráfico 1, que afetou o valor da média dos analitos. O teor de sódio ficou abaixo do limite de detecção do método.

Tabela 20 Resultados de composição centesimal aproximada e fibras em forragem do milho TC1507 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 1 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Análise Centesimal e Fibras (% de peso seco)	Milho TC1507	Milho Iso-híbrido	valor de P
Proteína Bruta	2,48	2,39	0,37 ns
Extrato Etéreo	0,59	0,59	0,87 ns
Cinzas	1,15	1,12	0,71 ns
Umidade (% base úmida)	71,81	70,97	0,33 ns
Carboidrato	23,96	24,94	0,20 ns
Fibra Bruta	19,70	19,93	0,81 ns
Fibra em detergente ácido	24,12	24,05	0,95 ns
Fibra em detergente neutro	60,82	60,32	0,84 ns
Cálcio	47,31	48,37	0,80 ns
Fósforo	39,92	40,37	0,94 ns

4.1.2 Composição química e nutricional do milho DAS-59122-7 comparativamente ao Iso-híbrido

A composição química e nutricional do milho DAS-59122-7 foi comparada com composição do iso-híbrido, conforme apresentado a seguir.

4.1.2.1 Análise centesimal e fibras em grãos

Os teores detectados de proteína bruta, extrato etéreo, cinzas, umidade, carboidrato, fibra em detergente ácido (FDA) e fibra em detergente neutro (FDN) situaram-se dentro dos limites dos valores de referência citados em literatura apresentados na Tabela 6 (WATSON, 1982; 1987; OECD, 2002; ILSI, 2010) e foram estatisticamente semelhantes entre o milho DAS-59122-7 e o iso-híbrido (Tabela 21).

Apesar da escassez hídrica observada em Indianópolis (MG), as médias combinadas dos teores dos analitos desta localidade com os teores medidos em Mogi Mirim (SP) mostram a equivalência entre os teores de proteínas, extrato etéreo, cinzas, umidade, carboidrato e fibras presentes nos grãos do híbrido geneticamente modificado DAS-59122-7 e nos do iso-híbrido, indicando não haver diferença substancial entre eles, para os analitos avaliados.

Tabela 21 Resultados de composição centesimal e fibras em grãos do milho DAS-59122-7 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 2 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Análise Centesimal e Fibras (% de peso seco)	Milho DAS-59122-7	Milho Iso-híbrido	valor de P
Proteína Bruta	12,10	12,10	0,97 ns
Extrato Etéreo	5,37	5,40	0,92 ns
Cinzas	1,310	1,30	0,85 ns
Umidade (% base úmida)	32,10	32,60	0,66 ns
Carboidrato	81,10	81,10	0,97 ns
Fibra Bruta	1,82	1,79	0,87 ns
Fibra em Detergente Ácido	4,18	3,89	0,29 ns
Fibra em Detergente Neutro	9,42	8,76	0,30 ns

4.1.2.2 Análise de minerais em grãos

Os teores detectados de cálcio, cobre, ferro, manganês, fósforo, potássio, sódio e zinco situaram-se dentro dos limites dos valores de referência citados em literatura apresentados na Tabela 7 (WATSON, 1982; 1987; OECD, 2002; ILSI, 2010) e foram estatisticamente semelhantes entre o milho DAS-59122-7 e o iso-híbrido (Tabela 22).

Esses resultados mostram a equivalência entre os teores de minerais presentes nos grãos do híbrido geneticamente modificado DAS-59122-7 e nos do iso-híbrido, indicando não haver diferença substancial entre eles, para os analitos avaliados.

Tabela 22 Resultados de composição de minerais em grãos do milho DAS-59122-7 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 2 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Minerais (mg/100g peso seco)	Milho DAS-59122-7	Milho Iso-híbrido	valor de P
Cálcio	3,67	3,74	0,69 ns
Cobre	0,24	0,25	0,66 ns
Ferro	1,94	1,94	0,98 ns
Manganês	0,67	0,68	0,72 ns
Fósforo	273,00	264,00	0,59 ns
Potássio	396,00	386,00	0,63 ns
Sódio	0,18	0,14	0,25 ns
Zinco	2,68	2,75	0,68 ns

4.1.2.3 Análise de aminoácidos em grãos

Os teores dos aminoácidos ácido aspártico, prolina, glicina, alanina, valina, tirosina, fenilalanina e histidina ficaram dentro dos limites dos valores de referência citados em literatura apresentados na Tabela 8 (WATSON, 1982; OECD, 2002; ILSI, 2010) e foram estatisticamente semelhantes entre o milho DAS-59122-7 e o iso-híbrido (Tabela 23).

Esses resultados mostram a equivalência entre os teores de aminoácidos presentes nos grãos do híbrido geneticamente modificado TC1507 e nos do iso-híbrido, indicando não haver diferença substancial entre eles, para os analitos avaliados.

Tabela 23 Resultados da composição de aminoácidos em grãos do milho DAS-59122-7 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 2 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Aminoácidos (% de peso seco)	Milho DAS-59122-7	Milho Iso-híbrido	valor de P
Ácido Aspártico	0,74	0,73	0,81 ns
Prolina	1,08	1,06	0,84 ns
Glicina	0,44	0,44	0,68 ns
Alanina	0,94	0,92	0,70 ns
Valina	0,56	0,55	0,55 ns
Tirosina	0,42	0,60	0,60 ns
Fenilalanina	0,70	0,62	0,62 ns
Histidina	0,36	0,99	0,99 ns

4.1.2.4 Análise de ácidos graxos em grãos

Os teores detectados dos ácidos graxos palmítico (16:0), palmitoleico (16:1), heptadecanoico (17:0), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2), linolênico (18:3), araquídico (20:0), eicosenoico (20:1) e behênico (22:0) situaram-se dentro dos limites dos valores de referência citados em literatura apresentados na Tabela 9 (WATSON, 1982; OECD, 2002; ILSI, 2010) e foram estatisticamente semelhantes entre o milho DAS-59122-7 e o iso-híbrido. O ácido graxo lignocérico (24:0) não foi avaliado neste estudo (Tabela 24).

Esses resultados mostram a equivalência entre os teores de ácidos graxos presentes nos grãos do híbrido geneticamente modificado DAS-59122-7 e nos do iso-híbrido, indicando não haver diferença substancial entre eles, para os analitos avaliados.

Tabela 24 Resultados de composição de ácidos graxos em grãos do milho DAS-59122-7 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 2 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Ácidos graxos (% total ácidos graxos)	Milho DAS-59122-7	Milho Iso-híbrido	valor de P
Palmítico (16:0)	14,1	14,80	0,57 ns
Palmitoleico (16:1)	0,16	0,18	0,39 ns
Heptadecanoico (17:0)	0,09	0,10	0,40 ns
Esteárico (18:0)	1,91	2,02	0,58 ns
Oleico (18:1)	32,10	34,00	0,32 ns
Linoleico (18:2)	48,7	46,20	0,44 ns
Linolênico (18:3)	1,12	1,02	0,43 ns
Araquídico (20:0)	0,46	0,48	0,69 ns
Eicosenoico (20:1)	0,25	0,26	0,69 ns
Behênico (22:0)	0,26	0,27	0,71 ns
Lignocérico (24:0)	NA	NA	---

4.1.2.5 Análise de vitaminas em grãos

Os teores detectados das vitaminas β -caroteno, α -tocoferol, ácido fólico e piridoxina situaram-se dentro dos limites dos valores de referência citados em literatura apresentados na Tabela 10 (WATSON, 1982; 1987; OECD, 2002; ILSI, 2010) e foram estatisticamente semelhantes entre o milho DAS-59122-7 e o iso-híbrido. As vitaminas tiamina, riboflavina e niacina não foram avaliadas neste estudo (Tabela 25).

Esses resultados mostram a equivalência entre os teores de vitaminas presentes nos grãos do híbrido geneticamente modificado DAS-59122-7 e nos do iso-híbrido, indicando não haver diferença substancial entre eles, para os analitos avaliados.

Tabela 25 Resultados de composição de vitaminas em grãos do milho DAS-59122-7 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 2 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Vitamina (ppm peso seco)	Milho DAS-59122-7	Milho Iso-híbrido	valor de P
Tiamina	NA	NA	---
Riboflavina	NA	NA	---
β -Caroteno	30,80	31,70	0,69 ns
α -Tocoferol	4,13	3,74	0,13 ns
Niacina	NA	NA	---
Ácido Fólico	1,37	1,35	0,92 ns
Piridoxina	4,28	4,77	0,58 ns

4.1.2.6 Análise de antinutrientes em grãos

Os teores detectados de ácido fítico e inibidor de tripsina situaram-se dentro dos limites dos valores de referência citados em literatura apresentados na Tabela 11 (OECD, 2002; ILSI, 2010) e foram estatisticamente semelhantes entre o milho DAS-59122-7 e o iso-híbrido (Tabela 26).

Esses resultados mostram a equivalência entre os teores de antinutrientes presentes nos grãos do híbrido geneticamente modificado DAS-59122-7 e nos do iso-híbrido, indicando não haver diferença substancial entre eles, para os analitos avaliados.

Tabela 26 Resultados de composição de antinutrientes em grãos do milho DAS-59122-7 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 2 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Antinutrientes	Milho DAS-59122-7	Milho Iso-híbrido	valor de P
Ácido Fítico (% de peso seco)	0,83	0,81	0,56 ns
Inibidor de Tripsina (TIU/mg)	3,70	4,20	0,11 ns

4.1.2.7 Análise centesimal, fibras e minerais em forragem

Os teores detectados de extrato etéreo, umidade, fibra bruta, fibra em detergente ácido e fibra em detergente neutro situaram-se dentro dos limites dos valores de referência citados em literatura apresentados na Tabela 12 (WATSON, 1982; ILSI, 2010) e foram estatisticamente semelhantes entre o milho DAS-59122-7 e o iso-híbrido. Os teores detectados de cálcio e fósforo ficaram dentro dos limites dos valores de referência citados em literatura e foram

estatisticamente semelhantes entre o milho DAS-59122-7 e o iso-híbrido (Tabela 27).

Esses resultados mostram a equivalência entre os teores de proteínas, extrato etéreo, cinzas, umidade, carboidrato e fibras presentes na forragem do híbrido geneticamente modificado DAS-59122-7 e na do iso-híbrido, indicando não haver diferença substancial entre eles, para os analitos avaliados.

Tabela 27 Resultados de composição centesimal aproximada e fibras em forragem do milho DAS-59122-7 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 2 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Análise Centesimal e Fibras (% de peso seco)	Milho DAS-59122-7	Milho Iso-híbrido	valor de P
Proteína Bruta	9,47	8,71	0,63 ns
Extrato Etéreo	2,25	1,86	0,32 ns
Cinzas	3,14	2,94	0,74 ns
Umidade (% base úmida)	76,83	74,53	0,21 ns
Carboidrato	85,11	86,46	0,58 ns
Fibra Bruta	31,51	27,81	0,22 ns
Fibra em detergente ácido (FDA)	33,45	31,10	0,38 ns
Fibra em detergente neutro (FDN)	60,98	55,64	0,22 ns
Cálcio	198,33	180,66	0,56 ns
Fósforo	157,30	133,66	0,64 ns

4.1.3 Composição química e nutricional do milho TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente ao iso-híbrido

A composição química e nutricional do milho TC1507 x DAS-59122-7 foi comparada com composição do iso-híbrido, conforme apresentado a seguir.

4.1.3.1 Análise centesimal e fibras em grãos

Os teores detectados de proteína bruta, extrato etéreo, cinzas, umidade, carboidrato, fibra bruta, fibra em detergente ácido (FDA) e fibra em detergente neutro (FDN) situaram-se dentro dos limites dos valores de referência citados em literatura apresentados na Tabela 6 (WATSON, 1982; WATSON, 1987; OECD, 2002; ILSI, 2010) e foram estatisticamente semelhantes entre o milho TC1507 x DAS-59122-7 e o iso-híbrido (Tabela 28).

Esses resultados mostram a equivalência entre os teores de proteínas, extrato etéreo, cinzas, umidade, carboidrato e fibras presentes nos grãos do híbrido geneticamente modificado TC1507 x DAS-59122-7 e nos do iso-híbrido, indicando não haver diferença substancial entre eles, para os analitos avaliados.

Tabela 28 Resultados de composição centesimal e fibras em grãos do milho TC1507 x DAS-59122-7 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 3 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Análise Centesimal e Fibras (% de peso seco)	Milho TC1507 x DAS-59122-7	Milho Iso-híbrido	valor de P
Proteína Bruta	10,94	10,77	0,69 ns
Extrato Etéreo	3,57	3,73	0,54 ns
Cinzas	1,39	1,93	0,25 ns
Umidade (% base úmida)	27,60	27,05	0,65 ns
Carboidrato	84,10	84,58	0,37 ns
Fibra Bruta	2,57	2,66	0,71 ns
Fibra em Detergente Ácido (FDA)	3,99	4,05	0,90 ns
Fibra em Detergente Neutro (FDN)	8,12	8,37	0,57 ns

4.1.3.2 Análise de minerais em grãos

Os teores detectados de cálcio, cobre, ferro, manganês, fósforo, potássio, sódio e zinco situaram-se dentro dos limites dos valores de referência citados em literatura apresentados na Tabela 7 (WATSON, 1982; 1987; OECD, 2002; ILSI, 2010) e foram estatisticamente semelhantes entre o milho TC1507 x DAS-59122-7 e o iso-híbrido (Tabela 29).

Esses resultados mostram a equivalência entre os teores de minerais presentes nos grãos do híbrido geneticamente modificado TC1507 x DAS-59122-7 e nos do iso-híbrido, indicando não haver diferença substancial entre eles, para os analitos avaliados.

Tabela 29 Resultados de composição de minerais em grãos do milho TC1507 x DAS-59122-7 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 3 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Minerais (mg/100g peso seco)	Milho TC1507 x DAS 59122-7	Milho Iso-híbrido	valor de P
Cálcio	89,00	82,00	0,59 ns
Cobre	0,00	0,00	0,79 ns
Ferro	2,00	2,00	0,81 ns
Manganês	0,00	0,00	0,69 ns
Fósforo	277,00	233,00	0,32 ns
Potássio	367,00	331,00	0,42 ns
Sódio	0,00	0,00	0,26 ns
Zinco	2,00	2,00	0,99 ns

4.1.3.3 Análise de aminoácidos em grãos

Os teores de aminoácidos ácido aspártico, prolina, glicina, alanina, valina, tirosina, fenilalanina e histidina ficaram dentro dos limites dos valores de referência citados em literatura apresentados na Tabela 8 (WATSON, 1982; OECD, 2002; ILSI, 2010) e foram estatisticamente semelhantes entre o milho TC1507 x DAS-59122-7 e o iso-híbrido (Tabela 30).

Esses resultados mostram a equivalência entre os teores de aminoácidos presentes nos grãos do híbrido geneticamente modificado TC1507 x DAS-59122-7 e nos do iso-híbrido, indicando não haver diferença substancial entre eles, para os analitos avaliados.

Tabela 30 Resultados da composição de aminoácidos em grãos do milho TC1507 x DAS-59122-7 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 3 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Aminoácidos (% de peso seco)	Milho TC1507 x DAS-59122-7	Milho Iso-híbrido	valor de P
Ácido Aspártico	0,69	0,76	0,62 ns
Prolina	0,96	0,94	0,68 ns
Glicina	0,36	0,37	0,57 ns
Alanina	0,86	0,85	0,92 ns
Valina	0,49	0,48	0,95 ns
Tirosina	0,33	0,31	0,61 ns
Fenilalanina	0,63	0,62	0,82 ns
Histidina	0,29	0,29	0,83 ns

4.1.3.4 Análise de ácidos graxos em grãos

Os teores detectados dos ácidos graxos palmítico (16:0), palmitoleico (16:1), heptadecanoico (17:0), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2), linolênico (18:3), araquídico (20:0), eicosenoico (20:1) e behênico (22:0) situaram-se dentro dos limites dos valores de referência citados em literatura apresentados na Tabela 9 (WATSON, 1982; OECD, 2002; ILSI, 2010) e foram estatisticamente semelhantes entre o milho TC1507 x DAS-59122-7 e o iso-híbrido (Tabela 31).

O teor do ácido lignocérico ficou ligeiramente acima dos limites citados em literatura, para o milho TC1507 x DAS-59122-7 e o para iso-híbrido, o que sugere que o aumento nos níveis desses dois ácidos graxos tenha ocorrido devido às condições climáticas ocorridas no período de condução dos experimentos nas localidades e devido também à baixa concentração desses analitos naturalmente observável em grãos de milho, o que pode ter levado ao maior erro experimental dos resultados das análises.

Tabela 31 Resultados de composição de ácidos graxos em grãos do milho TC1507 x DAS-59122-7 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 3 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Ácidos graxos (% total ácidos graxos)	Milho TC1507 x DAS-59122-7	Milho Iso-híbrido	valor de P
Palmítico (16:0)	13,08	13,30	0,31 ns
Palmitoleico (16:1)	0,15	0,16	0,78 ns
Heptadecanoico (17:0)	0,09	0,09	0,82 ns
Estearico (18:0)	1,72	1,78	0,59 ns
Oleico (18:1)	31,90	32,45	0,18 ns
Linoleico (18:2)	50,90	50,00	0,14 ns
Linolênico (18:3)	1,02	1,03	0,63 ns
Araquídico (20:0)	0,43	0,44	0,74 ns
Eicosenoico (20:1)	0,29	0,29	0,80 ns
Behênico (22:0)	0,16	0,17	0,29 ns
Lignocérico (24:0)	0,22	0,23	0,31 ns

4.1.3.5 Análise de vitaminas em grãos

Os teores detectados das vitaminas tiamina, β -caroteno, α -tocoferol, niacina, ácido fólico e piridoxina situaram-se dentro dos limites dos valores de referência citados em literatura apresentados na Tabela 10 (WATSON, 1982; 1987; OECD, 2002; ILSI, 2010) e foram estatisticamente semelhantes entre o milho TC1507 x DAS-59122-7 e o iso-híbrido (Tabela 32). O aminoácido riboflavina não foi avaliado neste estudo.

Esses resultados mostram a equivalência entre os teores de vitaminas presentes nos grãos do híbrido geneticamente modificado TC1507 x DAS-

59122-7 e nos do iso-híbrido, indicando não haver diferença substancial entre eles, para os analitos avaliados.

Tabela 32 Resultados de composição de vitaminas em grãos do milho TC1507 x DAS-59122-7 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 3 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Vitamina (ppm peso seco)	Milho TC1507 x DAS-59122-7	Milho Iso-híbrido	valor de P
Tiamina	3,26	3,41	0,53 ns
Riboflavina	NA	NA	---
β -Caroteno	29,20	23,88	0,28 ns
α -Tocoferol	5,50	5,71	0,38 ns
Niacina	17,55	20,18	0,16 ns
Ácido Fólico	1,38	8,89	0,32 ns
Piridoxina	5,50	5,72	0,69 ns

4.1.3.6 Análise de antinutrientes em grãos

Os teores detectados de ácido fítico e inibidor de tripsina situaram-se dentro dos limites dos valores de referência citados em literatura apresentados na Tabela 11 (OECD, 2002; ILSI, 2010) e foram estatisticamente semelhantes entre o milho TC1507 x DAS-59122-7 e o iso-híbrido (Tabela 33).

Esses resultados mostram a equivalência entre os teores de antinutrientes presentes nos grãos do híbrido geneticamente modificado TC1507 x DAS-59122-7 e nos do iso-híbrido, indicando não haver diferença substancial entre eles, para os analitos avaliados.

Tabela 33 Resultados de composição de antinutrientes em grãos do milho TC1507 x DAS-59122-7 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 3 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Antinutrientes	Milho TC1507 x DAS-59122-7	Milho Iso-híbrido	valor de P
Ácido Fítico (% de peso seco)	0,86	0,75	0,22 ns
Inibidor de Tripsina (TIU/mg)	3,41	2,46	0,39 ns

4.1.3.7 Análise centesimal, fibras e minerais em forragem

Os teores detectados de proteína bruta, extrato etéreo, cinzas, umidade, carboidrato, fibra bruta, fibra em detergente ácido (FDA), fibra em detergente neutro (FDN), cálcio e fósforo situaram-se dentro dos limites dos valores de referência citados em literatura apresentados na Tabela 12 (WATSON, 1982; ILSI, 2010) e foram estatisticamente semelhantes entre o milho TC1507 x DAS-59122-7 e o iso-híbrido (Tabela 34).

Esses resultados mostram a equivalência entre o híbrido geneticamente modificado TC1507 x DAS-59122-7 e o iso-híbrido dos analitos avaliados, indicando não haver diferença substancial entre eles.

Tabela 34 Resultados de composição centesimal aproximada e fibras em forragem do milho TC1507 x DAS-59122-7 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos resultados dos experimentos do Estudo 3 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Análise Centesimal e Fibras (% de peso seco)	Milho TC1507 x DAS-59122-7	Milho Iso-híbrido	valor de P
Proteína Bruta	7,84	7,45	0,18 ns
Extrato Etéreo	1,98	1,76	0,27 ns
Cinzas	2,91	3,15	0,30 ns
Umidade (% base úmida)	72,68	72,35	0,78 ns
Carboidrato	87,25	87,63	0,32 ns
Fibra Bruta	26,07	26,78	0,62 ns
Fibra em detergente ácido (FDA)	29,43	31,25	0,45 ns
Fibra em detergente neutro (FDN)	48,87	50,58	0,51 ns
Cálcio	125,00	129,00	0,89 ns
Fósforo	186,00	146,00	0,11 ns

4.1.4 Comparação entre a composição química e nutricional do milho TC1507 x DAS-59122-7 e de seus componentes singulares milho TC1507 e milho DAS-59122-7

A análise comparativa dos teores de proteína bruta, extrato etéreo, cinzas, umidade, carboidrato, fibra bruta, fibra em detergente ácido (FDA) e fibra em detergente neutro avaliados em amostras de grãos de milho TC1507, milho DAS-59122-7 e milho TC1507 x DAS-59122-7 (Tabela 35 e Gráfico 7) mostra não haver diferenças estatísticas significativas quando cada um desses híbridos é comparado com o iso-híbrido correspondente e com os valores de referência para cada analito citados em literatura apresentados na Tabela 13 (WATSON, 1982; 1987; OECD, 2002; ILSI, 2010), exceto para extrato etéreo

no milho TC1507 que foi diferente do iso-híbrido, mas dentro dos limites dos valores de referência citados em literatura e dos teores de carboidrato e fibra em detergente ácido no milho TC1507 que ficou abaixo dos limites dos valores de literatura devido, provavelmente, pelas condições de escassez hídrica observada em Indianópolis (MG) no momento do enchimento dos grãos, conforme mostrado no Gráfico 1.

Os dados experimentais mostram que os híbridos geneticamente modificados não diferem de seus iso-híbridos em 23 de 24 comparações realizadas para os 8 analitos avaliados e que os resultados obtidos estão dentro dos limites dos valores de referência citados em literatura em 22 dos 24 resultados das avaliações desses analitos.

Tabela 35 Resultados médios das avaliações de composição centesimal e fibras em grãos dos milhos TC1507, DAS59122-7 e TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente aos respectivos iso-híbridos, em análise combinada dos dados dos experimentos conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Análise Centesimal e Fibras (% de peso seco)	Milho TC1507 x□ (valor de P)	Milho DAS-59122-7 x□ (valor de P)	Milho TC1507 x DAS 59122-7 x□ (valor de P)
Proteína Bruta	6,75 (0,96 ns)	12,10 (0,97 ns)	10,94 (0,69 ns)
Extrato Etéreo	2,15 (0,03 s)	5,37 (0,92 ns)	3,57 (0,54 ns)
Cinzas	0,80 (0,96 ns)	1,31 (0,85 ns)	1,39 (0,25 ns)
Umidade (% base úmida)	35,57 (0,50 ns)	32,10 (0,66 ns)	27,60 (0,65 ns)
Carboidrato	54,74 (0,49 ns)	81,10 (0,97 ns)	84,10 (0,37 ns)
Fibra Bruta	1,73 (0,90 ns)	1,82 (0,87 ns)	2,58 (0,71 ns)
Fibra em Detergente Ácido (FDA)	1,38 (0,89 ns)	4,18 (0,29 ns)	3,99 (0,90 ns)
Fibra em Detergente Neutro (FDN)	8,51 (0,84 ns)	9,42 (0,30 ns)	8,12 (0,59 ns)

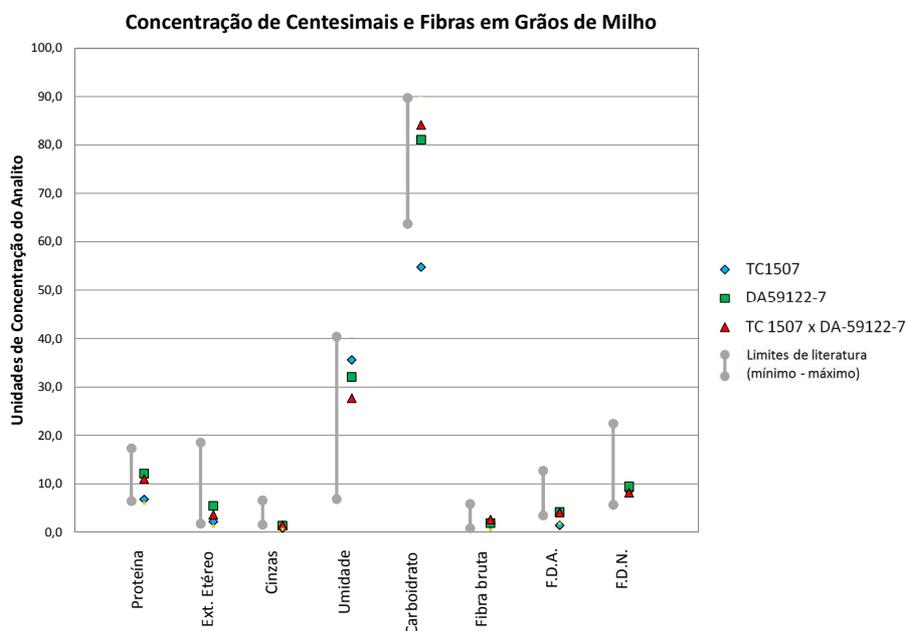


Gráfico 7 Resultados médios das avaliações de composição centesimal e fibras em grãos dos milhos TC1507, DAS59122-7 e TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente aos respectivos iso-híbridos, em análise combinada dos dados dos experimentos do Estudo 3 conduzidos em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

A comparação dos teores comparativos de cálcio, cobre, ferro, manganês, fósforo, potássio, sódio e zinco avaliados em amostras de grãos de milho TC1507, milho DAS-59122-7 e milho TC1507 x DAS-59122-7 (Tabela 36 e Gráfico 8) mostra não haver diferenças estatísticas significativas quando cada um destes híbridos é comparado com o iso-híbrido correspondente e com os valores de referência para cada analito citados em literatura apresentados na Tabela 7 (WATSON, 1982;- 1987; OECD, 2002; ILSI, 2010), exceto para cobre e sódio no milho TC1507 que ficaram abaixo dos limites de detecção do método

analítico e para o teor de fósforo no milho TC1507 que foi semelhante ao iso-híbrido mas ficou abaixo dos limites de literatura.

Os dados experimentais mostram que os híbridos geneticamente modificados não diferem de seus iso-híbridos em todas as 22 comparações realizadas e que os resultados avaliados estão dentro dos limites dos valores de referência citados em literatura em 21 dos 22 resultados das avaliações desses analitos.

Tabela 36 Resultados médios das avaliações de composição de minerais em grãos dos milhos TC1507, DAS59122-7 e TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente aos respectivos iso-híbridos, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Minerais (mg/100g peso seco)	Milho TC1507 x□ (valor de P)	Milho DAS-59122-7 x□ (valor de P)	Milho TC1507 x DAS 59122-7 x□ (valor de P)
Cálcio	2,28 (0,57 ns)	3,67 (0,69 ns)	89,00 (0,59 ns)
Cobre	< LOD	0,24 (0,66 ns)	0,00 (0,79 ns)
Ferro	1,11 (0,36 ns)	1,94 (0,98 ns)	2,00 (0,81 ns)
Manganês	0,17 (0,60 ns)	0,67 (0,72 ns)	0,00 (0,69 ns)
Fósforo	141,70 (0,96 ns)	273,00 (0,59 ns)	277,00 (0,32 ns)
Potássio	214,40 (0,64 ns)	396,00 (0,63 ns)	367,00 (0,42 ns)
Sódio	< LOD	0,18 (0,25 ns)	0,00 (0,26 ns)
Zinco	1,08 (0,20 ns)	2,68 (0,68 ns)	2,00 (0,99 ns)

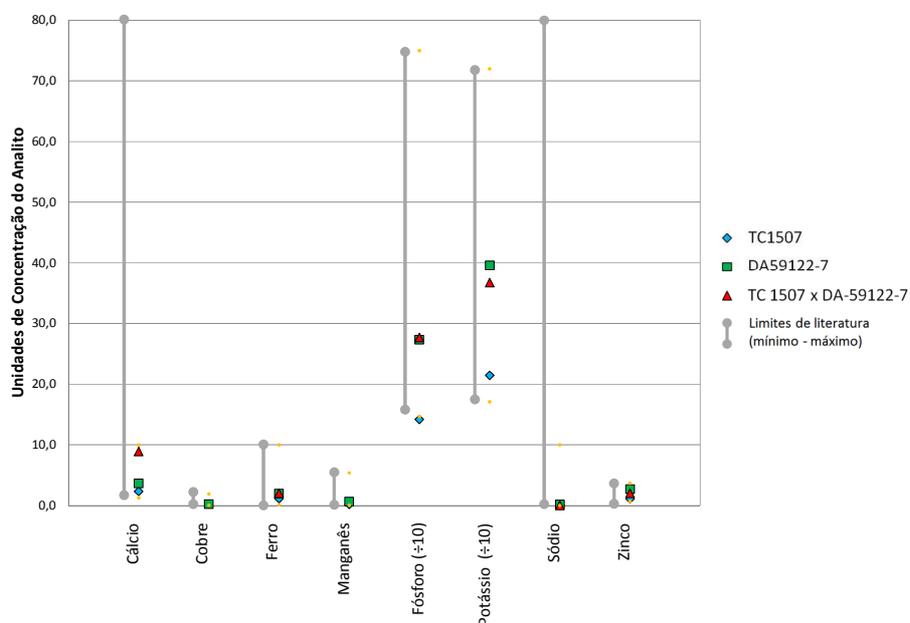


Gráfico 8 Resultados médios das avaliações de composição de minerais em grãos dos milhos TC1507, DAS59122-7 e TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente aos respectivos iso-híbridos, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Os teores dos aminoácidos ácido aspártico, prolina, glicina, alanina, valina, tirosina, fenilalanina e histidina avaliados em amostras de grãos de milho TC1507, milho DAS-59122-7 e milho TC1507 x DAS-59122-7 (Tabela 37 e Gráfico 9) não diferem estatisticamente quando cada um destes híbridos é comparado com o iso-híbrido correspondente e com os valores de referência para cada analito citados em literatura apresentados na Tabela 8 (WATSON, 1982; OECD, 2002; ILSI, 2010), exceto para o ácido aspártico no milho TC1507 cuja concentração foi diferente da do iso-híbrido, mas ficou dentro dos limites dos valores de referência citados em literatura.

Os dados experimentais mostram que os híbridos geneticamente modificados não diferem de seus iso-híbridos em 23 de 24 comparações realizadas para os 8 aminoácidos avaliados e que todos os resultados obtidos estão dentro dos limites dos valores de referência citados em literatura.

Tabela 37 Resultados médios das avaliações da composição de aminoácidos em grãos dos milhos TC1507, DAS59122-7 e TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente aos respectivos iso-híbridos, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Aminoácidos (% de peso seco)	Milho TC1507 x□ (valor de P)	Milho DAS-59122-7 x□ (valor de P)	Milho TC1507 x DAS 59122-7 x□ (valor de P)
Ácido Aspártico	0,35 (0,03 s)	0,74 (0,81 ns)	0,69 (0,62 ns)
Prolina	0,66 (0,65 ns)	1,08 (0,84 ns)	0,96 (0,68 ns)
Glicina	0,29 (0,52 ns)	0,44 (0,68 ns)	0,36 (0,57 ns)
Alanina	0,59 (0,97 ns)	0,94 (0,70 ns)	0,86 (0,92 ns)
Valina	0,38 (0,59 ns)	0,56 (0,55 ns)	0,49 (0,95 ns)
Tirosina	0,41 (0,52 ns)	0,42 (0,60 ns)	0,33 (0,61 ns)
Fenilalanina	0,44 (0,53 ns)	0,70 (0,62 ns)	0,63 (0,82 ns)
Histidina	0,24 (0,68 ns)	0,36 (0,99 ns)	0,29 (0,83 ns)

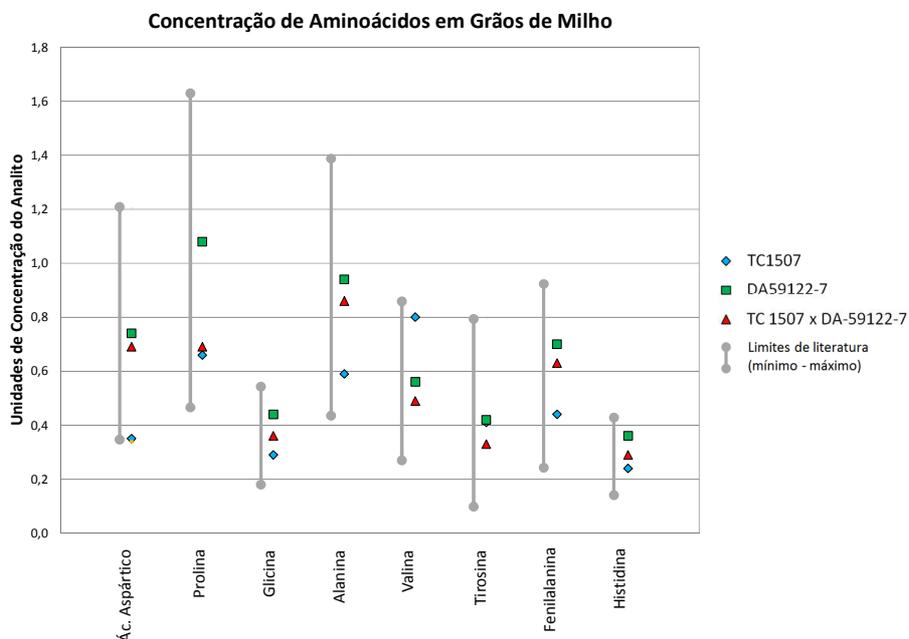


Gráfico 9 Resultados médios das avaliações da composição de aminoácidos em grãos dos milhos TC1507, DAS59122-7 e TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente aos respectivos iso-híbridos, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

A análise comparativa dos teores dos ácidos graxos palmítico (16:0), palmitoleico (16:1), heptadecanoico (17:0), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2), linolênico (18:3), araquídico (20:0), eicosenoico (20:1), behênico (22:0) e lignocérico (24:0) avaliados em amostras de grãos de milho TC1507, milho DAS-59122-7 e milho TC1507 x DAS-59122-7 (Tabela 39 e Gráfico 11) mostra não haver diferenças estatísticas significativas quando cada um destes híbridos é comparado com o iso-híbrido correspondente e com os valores de referência para cada analito citados em literatura apresentados na Tabela 10 (WATSON, 1982; OECD, 2002; ILSI, 2010), exceto com relação aos

teores do ácido lignocérico avaliados no milho TC1507 e no milho TC1507 x DAS-59122-7 que ficaram ligeiramente acima dos limites citados em literatura, mas foram equivalentes aos teores avaliados no iso-híbrido correspondente.

Os dados experimentais mostram que os híbridos geneticamente modificados não diferem de seus iso-híbridos em todas as 32 comparações realizadas para os 11 ácidos graxos avaliados e que os resultados obtidos estão dentro dos limites dos valores de referência citados em literatura em 30 dos 32 resultados das avaliações desses analitos.

Tabela 38 Resultados médios das avaliações de composição de ácidos graxos em grãos dos milhos TC1507, DAS59122-7 e TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente aos respectivos iso-híbridos, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Ácidos graxos (% total ácidos graxos)	Milho TC1507 x□ (valor de P)	Milho DAS-59122-7 x□ (valor de P)	Milho TC1507 x DAS 59122-7 x□ (valor de P)
Palmitico (16:0)	16,69 (0,64 ns)	14,10 (0,57 ns)	13,08 (0,31 ns)
Palmitoleico (16:1)	0,18 (0,52 ns)	0,16 (0,39 ns)	0,15 (0,78 ns)
Heptadecanoico (17:0)	0,13 (0,54 ns)	0,09 (0,40 ns)	0,09 (0,82 ns)
Esteárico (18:0)	2,38 (0,09 ns)	1,91 (0,58 ns)	1,72 (0,59 ns)
Oleico (18:1)	30,83 (0,26 ns)	32,10 (0,32 ns)	31,90 (0,18 ns)
Linoleico (18:2)	46,09 (0,50 ns)	48,70 (0,44 ns)	50,90 (0,14 ns)
Linolênico (18:3)	1,05 (0,33 ns)	1,12 (0,42 ns)	1,02 (0,63 ns)
Araquídico (20:0)	0,51 (0,34 ns)	0,46 (0,69 ns)	0,43 (0,74 ns)
Eicosenoico (20:1)	0,28 (0,64 ns)	0,25 (0,69 ns)	0,29 (0,80 ns)
Behênico (22:0)	0,29 (0,40 ns)	0,26 (0,71 ns)	0,16 (0,29 ns)
Lignocérico (24:0)	0,27 (0,47 ns)	NA	0,22 (0,31 ns)

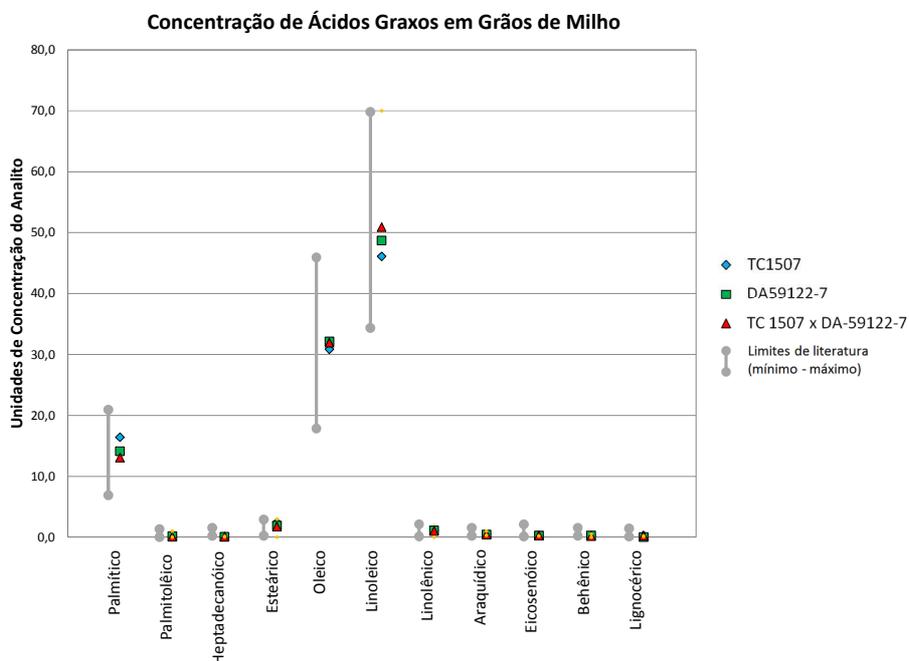


Gráfico 10 Resultados médios das avaliações de composição de ácidos graxos em grãos dos milhos TC1507, DAS59122-7 e TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente aos respectivos iso-híbridos, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

A comparação entre os teores da vitamina tiamina avaliados em amostras de grãos de milho TC1507 e milho TC1507 x DAS-59122-7 mostra não haver diferenças estatísticas significativas quando cada um destes híbridos é comparado com o iso-híbrido correspondente e com os valores de referência para cada analito citados em literatura apresentados na Tabela 10 (WATSON, 1982; 1987; OECD, 2002; ILSI, 2010). A análise comparativa dos teores de β -caroteno, α -tocoferol, ácido fólico e piridoxina avaliados em amostras de grãos de milho DAS-59122-7 e milho TC1507 x DAS-59122-7 (Tabela 39 e Gráfico

11) mostrou não haver diferenças significativas entre os milhos transgênicos e respectivos os iso-híbridos.

Os dados experimentais mostram que os híbridos geneticamente modificados não diferem de seus iso-híbridos em todas as 12 comparações realizadas para as vitaminas avaliadas e que os resultados obtidos estão dentro dos limites dos valores de referência citados em literatura em todos os 12 resultados das avaliações desses analitos.

Tabela 39 Resultados médios das avaliações de composição de vitaminas em grãos dos milhos TC1507, DAS59122-7 e TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente aos respectivos iso-híbridos, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Vitamina (ppm peso seco)	Milho TC1507 x□ (valor de P)	Milho DAS-59122-7 x□ (valor de P)	Milho TC1507 x DAS 59122-7 x□ (valor de P)
Tiamina	2,80 (0,69 ns)	NA	3,26 (0,53 ns)
Riboflavina	1,37 (0,72 ns)	NA	NA
β-Caroteno	NA	30,8 (0,69 ns)	29,20 (0,28 ns)
α-Tocoferol	NA	4,13 (0,13 ns)	5,50 (0,38 ns)
Niacina	NA	NA	17,6 (0,16 ns)
Ácido Fólico	NA	1,37 (0,92 ns)	1,38 (0,32 ns)
Piridoxina	NA	4,28 (0,58 ns)	5,50 (0,69 ns)

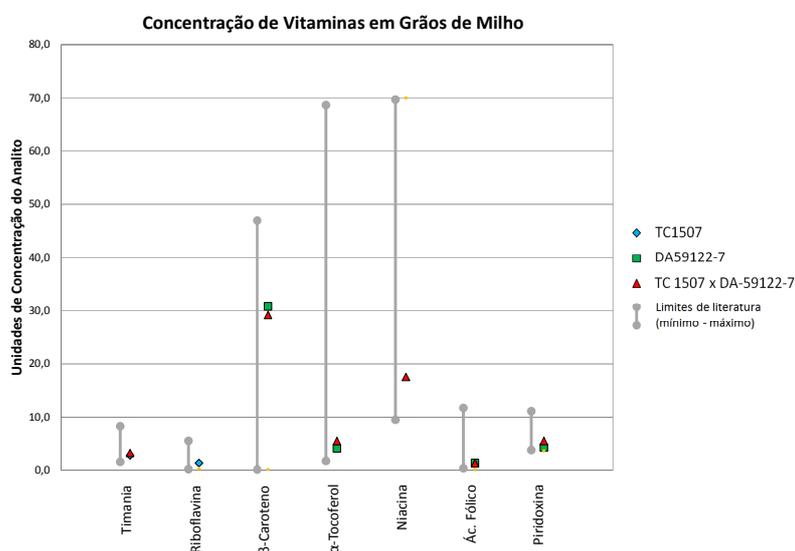


Gráfico 11 Resultados médios das avaliações de composição de vitaminas em grãos dos milhos TC1507, DAS59122-7 e TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente aos respectivos iso-híbridos, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Os teores dos antinutrientes ácido fítico e inibidor da tripsina avaliados em amostras de grãos de milho TC1507, milho DAS-59122-7 e milho TC1507 x DAS-59122-7 (Tabela 40 e Gráfico 12) não diferem estatisticamente quando cada um destes híbridos é comparado com o iso-híbrido correspondente e com os valores de referência para cada analito citados em literatura apresentados na Tabela 11 (OECD, 2002; ILSI, 2010).

Os dados experimentais mostram que os híbridos geneticamente modificados não diferem de seus iso-híbridos nas 6 comparações realizadas para os 2 antinutrientes avaliados e que os resultados obtidos estão dentro dos limites dos valores de referência citados em literatura em todos os 6 resultados das avaliações desses analitos.

Tabela 40 Resultados médios das avaliações de composição de antinutrientes em grãos dos milhos TC1507, DAS59122-7 e TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente aos respectivos iso-híbridos, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Antinutrientes	Milho TC1507 x□ (valor de P)	Milho DAS-59122-7 x□ (valor de P)	Milho TC1507 x DAS 59122-7 x□ (valor de P)
Ácido Fítico (% de peso seco)	0,33 (0,68 ns)	0,83 (0,56 ns)	0,86 (0,22 ns)
Inibidor de Tripsina (TIU/mg)	1,70 (0,23 ns)	3,70 (0,11 ns)	3,41 (0,39 ns)

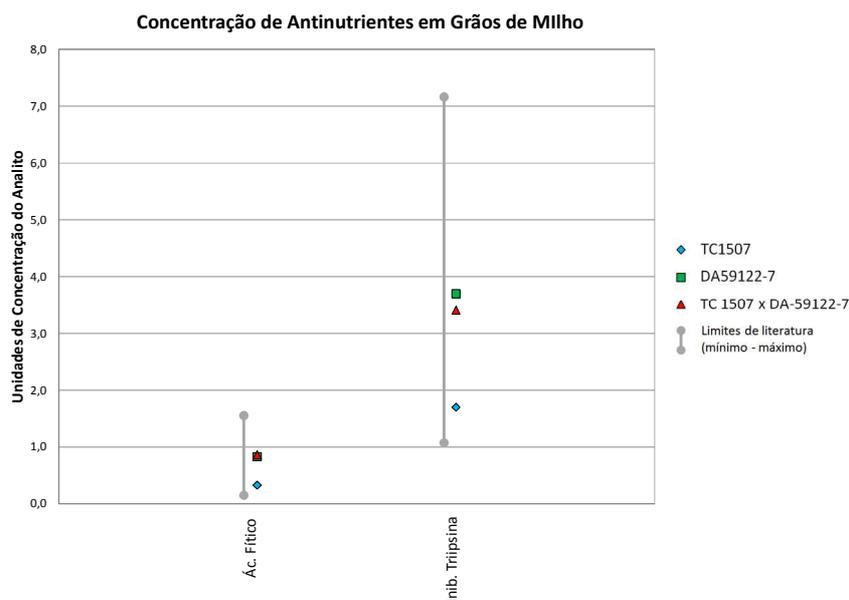


Gráfico 12 Resultados médios das avaliações de composição de antinutrientes em grãos dos milhos TC1507, DAS59122-7 e TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente aos respectivos iso-híbridos, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

A análise comparativa dos teores de proteína bruta, extrato etéreo, cinzas, umidade, carboidrato, fibra bruta, fibra em detergente ácido (FDA), fibra em detergente neutro (FDN), cálcio e fósforo avaliados em amostras de forragem de milho TC1507, milho DAS-59122-7 e milho TC1507 x DAS-59122-7 (Tabela 41 e Gráfico 13) mostra não haver diferenças estatísticas significativas quando cada um destes híbridos é comparado com o iso-híbrido correspondente e com os valores de referência para cada analito citados em literatura apresentados na Tabela 12 (WATSON, 1982; ILSI, 2010), exceto para os teores de cinzas, carboidrato, cálcio e fósforo no milho TC1507 que foram inferiores aos limites dos valores de referência citados em literatura, mas que foram semelhantes aos teores dos mesmo analitos avaliados no iso-híbrido e que foi explicado pelo período de estiagem ocorrido em Indianópolis (MG) no período de condução do experimento com o milho TC1507 (no Gráfico 1). Os dados experimentais mostram que os híbridos geneticamente modificados não diferem de seus iso-híbridos em todas as 30 comparações realizadas para os 10 analitos avaliados e que os resultados obtidos estão dentro dos limites dos valores de referência citados em literatura em 26 dos 30 resultados das avaliações desses analitos.

Tabela 41 Resultados médios das avaliações de composição centesimal, fibras e minerais em forragem dos milhos TC1507, DAS59122-7 e TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente aos respectivos iso-híbridos, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Análise Centesimal e Fibras (% de peso seco)	Milho	Milho	Milho TC1507 x
	TC1507	DAS-59122-7	DAS 59122-7
	x□ (valor de P)	x□ (valor de P)	x□ (valor de P)
Cinzas	1,15 (0,71 ns)	3,14 (0,74 ns)	2,91 (0,30 ns)
Extrato Etéreo	0,59 (0,87 ns)	2,25 (0,32 ns)	1,98 (0,27 ns)
Umidade (% base úmida)	71,81 (0,33 ns)	76,83 (0,21 ns)	72,68 (0,78 ns)
Proteína	2,48 (0,37 ns)	9,47 (0,63 ns)	7,84 (0,18 ns)
Carboidrato	23,96 (0,20 ns)	85,11 (0,58 ns)	87,25 (0,32 ns)
Fibra Bruta	19,70 (0,81 ns)	31,51 (0,22 ns)	26,07 (0,62 ns)
Fibra em Detergente ácido	24,12 (0,95 ns)	33,45 (0,38 ns)	29,43 (0,45 ns)
Fibra em Detergente neutro	60,82 (0,84 ns)	60,98 (0,22 ns)	48,87 (0,51 ns)
Cálcio	47,31 (0,80 ns)	198,33 (0,56 ns)	125,00 (0,89 ns)
Fósforo	39,92 (0,94 ns)	157,30 (0,64 ns)	186,00 (0,11 ns)

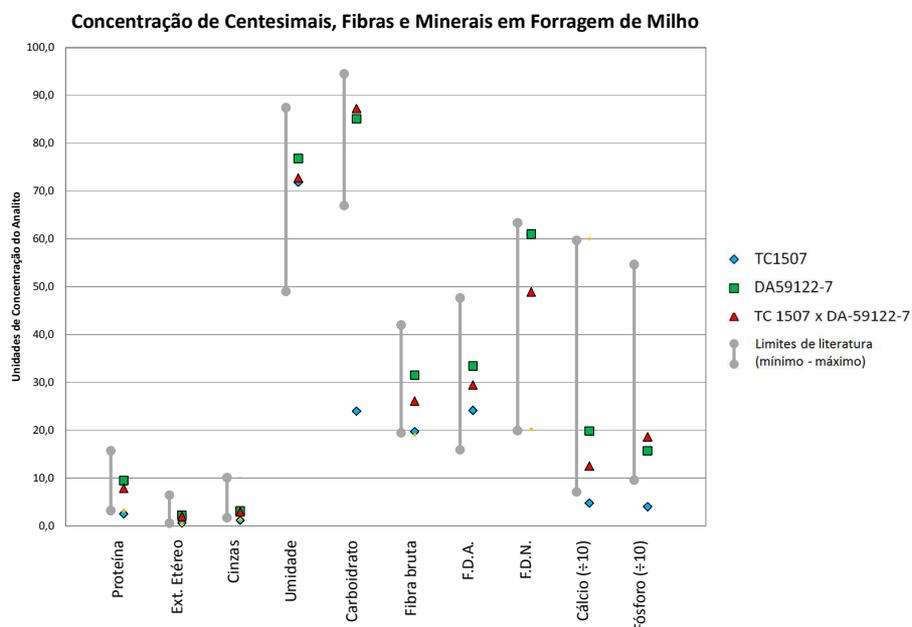


Gráfico 13 Resultados médios das avaliações de composição centesimal, fibras e minerais em forragem dos milhos TC1507, DAS59122-7 e TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente aos respectivos iso-híbridos, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

4.2 Características agrônômicas do milho TC1507 x DAS-59122-7 e de seus componentes singulares milho TC1507 e milho DAS-59122-7

Os resultados das avaliações dos parâmetros de características agrônômicas dos milhos TC1507, DAS-59122-7 e TC1507 x DAS-59122-7 foram comparados com os resultados avaliados nos respectivos iso-híbridos, conforme apresentado a seguir.

4.2.1 Características agronômicas do milho TC1507 comparativamente ao iso-híbrido

Os valores de florescimento feminino, florescimento masculino, altura de planta, altura da espiga principal, tombamento e produtividade de grãos foram estatisticamente semelhantes entre o milho TC1507 e o milho iso-híbrido, conforme apresentado na Tabela 42. Parâmetros agronômicos de vigor de plântula, incidência de doenças e dano por insetos não foram avaliados neste estudo. Os resultados demonstram que o milho TC1507 foi semelhante ao iso-híbrido com relação aos parâmetros de características agronômicas.

Tabela 42 Resultados das avaliações das características agronômicas do milho TC1507 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Característica Agronômica	Milho TC1507	Milho iso-híbrido
Vigor de plântula (escala 1 a 9)	NA	NA
Florescimento feminino (dias)	62,7 a ^a	63,2 a
Florescimento masculino (dias)	62,2 a	62,7 a
Altura de planta (cm)	205,0 a	207,0 a
Altura da espiga principal (cm)	105,0 a	108,0 a
Tombamento (%)	2,9 a	1,4 a
Incidência doenças R6 (escala 1 a 9)	NA	NA
Dano de inseto R4 (escala 1 a 9)	NA	NA
Produtividade de grãos (Kg/ha) ^b	6.677,0 a	6.447,0 a

^a Médias com letras diferentes na linha mostram diferenças significativas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

^b O peso de grãos em kg/ha foi corrigido para 13% de umidade.

4.2.2 Características agronômicas do milho DAS-59122-7 comparativamente ao iso-híbrido

Os valores de vigor de plântula, florescimento feminino, florescimento masculino, altura de planta, altura da espiga principal, tombamento, incidência doenças, dano de inseto e produtividade de grãos foram estatisticamente semelhantes entre o milho DAS-59122-7 e o milho iso-híbrido, conforme apresentado na Tabela 43. Os resultados demonstram que o milho DAS-59122-7 foi semelhante ao iso-híbrido com relação aos parâmetros de características agronômicas.

Tabela 43 Resultados das avaliações das características agronômicas do milho DAS-59122-7 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Característica Agronômica	Milho DAS-59122-7	Milho iso-híbrido	Valor de P
Vigor de plântula (escala 1 a 9)	8,2	7,8	0,50 ns
Florescimento feminino (dias)	65,8	65,0	0,34 ns
Florescimento masculino (dias)	66,2	65,8	0,66 ns
Altura de planta (cm)	213,8	215,1	0,89 ns
Altura da espiga principal (cm)	107,6	112,0	0,50 ns
Tombamento (%)	9,8	10,5	0,89 ns
Incidência doenças R6 (escala 1 a 9)	5,3	5,0	0,36 ns
Dano de inseto R4 (escala 1 a 9)	6,0	6,2	0,50 ns
Produtividade de grãos (Kg/ha) ^a	9.710,0 a ^b	10.390,0 a	

^a O peso de grãos em Kg/ha foi corrigido para 13% de umidade.

^b As mesmas letras na linha indica não haver diferenças significativas entre o híbrido de milho geneticamente modificado e o iso-híbrido pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.2.3 Características agronômicas do milho TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente ao iso-híbrido

Os valores de vigor de plântula, florescimento feminino, florescimento masculino, altura de planta, altura da espiga principal, tombamento, incidência de doenças, dano de inseto e produtividade de grãos foram estatisticamente semelhantes entre o milho TC1507 x DAS-59122-7 e o milho iso-híbrido, conforme apresentado na Tabela 44. Os resultados demonstram que o milho TC1507 x DAS-59122-7 foi semelhante ao iso-híbrido com relação aos parâmetros de características agronômicas.

Tabela 44 Resultados das avaliações das características agronômicas do milho TC1507 x DAS-59122-7 e de seu iso-híbrido, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Característica Agronômica	Milho TC1507 x DAS-59122-7	Milho iso-híbrido	Valor de P
Vigor de plântula (escala 1 a 9)	8,8	9,0	0,50 ns
Florescimento feminino (dias)	60,2	58,8	0,41 ns
Florescimento masculino (dias)	61,7	61,0	0,50 ns
Altura de planta (cm)	223,2	224,7	0,72 ns
Altura da espiga principal (cm)	114,7	117,3	0,23 ns
Tombamento (%)	8,8	9,0	0,50 ns
Incidência doenças R6 (escala 1 a 9)	4,2	4,5	0,50 ns
Dano de inseto R4 (escala 1 a 9)	4,8	4,8	1,00 ns
Produtividade de grãos (Kg/ha) ^a	7.910,0 a ^b	7.920,0 a	

^a O peso de grãos em Kg/ha foi corrigido para 13% de umidade.

^b As mesmas letras na linha indica não haver diferenças significativas entre o híbrido de milho geneticamente modificado e o iso-híbrido pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.2.4 Comparação entre as características agronômicas do milho TC1507 x DAS-59122-7 e de seus componentes singulares milho TC1507 e milho DAS-59122-7

A análise comparativa dos valores de vigor de plântula, florescimento feminino, florescimento masculino, altura de planta, altura da espiga principal, tombamento, incidência de doenças, dano de inseto e produtividade de grãos dos híbridos de milho TC1507, DAS-59122-7 e TC1507 x DAS-59122-7 (Tabela 45) mostra não haver diferenças estatísticas significativas quando cada um destes híbridos é comparado com o iso-híbrido correspondente, o que significa que os híbridos geneticamente modificados não diferem de seus iso-híbridos, comprovando sua equivalência em características agronômicas, botânicas e reprodutivas.

Tabela 45 Resultados médios das avaliações das características agronômicas em grãos dos milhos TC1507, DAS59122-7 e TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente aos respectivos iso-híbridos, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Característica Agronômica	Milho TC1507	Milho DAS-59122-7 x□ (valor de P)	Milho TC1507 x DAS 59122-7 x□ (valor de P)
Vigor de plântula (escala 1 a 9)	NA	8,2 (0,50 ns)	8,8 (0,50 ns)
Florescimento feminino (dias)	62,7 ns	65,8 (0,34 ns)	60,2 (0,41 ns)
Florescimento masculino (dias)	62,2 ns	66,2 (0,66 ns)	61,7 (0,50 ns)
Altura de planta (cm)	205,0 ns	213,8 (0,89 ns)	223,2 (0,72 ns)
Altura da espiga principal (cm)	105,0 ns	107,6 (0,50 ns)	114,7 (0,23 ns)
Tombamento (%)	2,9 ns	9,8 (0,89 ns)	8,8 (0,50 ns)
Incidência doenças R6 (escala 1 a 9)	NA	5,3 (0,36 ns)	4,2 (0,50 ns)
Dano de inseto R4 (escala 1 a 9)	NA	6,0 (0,50 ns)	4,8 (1,00 ns)
Produtividade de grãos (Kg/ha) ^a	6.677,7 ns	9.710,0 ns	7.910,0 ns

^aO peso de grãos em Kg/ha foi corrigido para 13% de umidade.

4.3 Expressão das proteínas do milho TC1507 x DAS-59122-7 e de seus componentes singulares milho TC1507 e milho DAS-59122-7

Os resultados das análises de expressão das proteínas CRY1F, CRY34AB1, CRY35AB1 e PAT pelo milho TC1507 x DAS-59122-7 foram comparados com os resultados das análises das mesmas proteínas nos milhos TC1507 e DAS-59122-7, conforme apresentado a seguir

4.3.1 Expressão das proteínas CRY1F e PAT do milho TC1507 comparativamente ao iso-híbrido

Foram mensuradas as concentrações das proteínas CRY1F e PAT nos tecidos amostrados em diferentes tecidos do milho TC1507 e de seu iso-híbrido, conforme apresentado na Tabela 46.

Os mais altos níveis de expressão da proteína CRY1F foram encontrados nas folhas do milho TC1507 (15,58 e 21,32 ng/mg) e níveis relativamente baixos desta proteína foram encontrados em tecidos de planta inteira, forragem e grãos (8,52 ng/mg, 7,79 ng/mg e 3,57 ng/mg respectivamente). A proteína PAT foi encontrada em níveis de expressão muito baixos nos tecidos avaliados, variando de 3,55 ng/mg nas folhas até níveis próximos de 0,05 ng/mg em grãos do milho TC1507. As proteínas CRY1F e PAT não foram encontradas nos tecidos do milho iso-híbrido por estarem abaixo do nível de detecção do método (< LOD) ou por estarem ausentes deste híbrido controle.

Tabela 46 Resultados das avaliações de expressão das proteínas CRY1F e PAT no milho TC1507 e em seu iso-híbrido, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Tecido de milho	CRY1F ng/mg de peso seco de tecido		PAT ng/mg de peso seco de tecido	
	Milho TC1507 Média (mín - máx)	Milho Iso-híbrido Média (mín - máx)	Milho TC1507 Média (mín - máx)	Milho Iso-híbrido Média (mín - máx)
Folha V9	15,58 (5,19 - 26,04)	< LOD	3,55 (1,46 - 5,14)	< LOD
Folha R1	21,32 (8,13 - 32,60)	< LOD	1,58 (2,20 - 7,35)	< LOD
Raiz V9	3,74 (2,39 - 5,23)	< LOD	0,10 (0,04 - 0,14)	< LOD
Raiz R1	4,13 (2,94 - 5,41)	< LOD	0,11 (0,09 - 0,12)	< LOD
Planta inteira V9	8,52 (8,16 - 8,88)	< LOD	1,32 (1,30 - 1,33)	< LOD
FORAGEM R4	7,79 (7,34 - 8,24)	< LOD	0,45 (0,31 - 0,59)	< LOD
Planta inteira R6	5,13 (5,09 - 5,17)	< LOD	< LOD	< LOD
Grão R6	3,57 (2,83 - 4,53)	< LOD	0,06 (< LOD - 0,12)	< LOD

4.3.2 Expressão das proteínas CRY34AB1, CRY35AB1 e PAT do milho DAS-59122-7 comparativamente ao iso-híbrido

Foram mensuradas as concentrações das proteínas CRY34AB1, CRY35AB1 e PAT nos tecidos amostrados em diferentes tecidos do milho DAS-59122-7 e de seu iso-híbrido, conforme apresentado na Tabela 47 até a Tabela 49.

Os mais altos níveis de expressão da proteína CRY34AB1 foram encontrados na forragem R4, nas folhas R1 e em planta inteira R6 do milho DAS-59122-7 (197,83 ng/mg, 155,67 ng/mg e 154,64 ng/mg respectivamente), níveis intermediários desta proteína foram encontrados em tecidos de grãos, folhas V9 e planta inteira V9 do milho DAS-59122-7 (126,35 ng/mg, 119,00

ng/mg e 101,58 ng/mg respectivamente) e os níveis mais baixos desta proteína foram encontrados nas raízes do milho DAS-59122-7 (64,25 a 93,35 ng/mg de peso seco), conforme descrito na Tabela 47.

Os mais altos níveis de expressão da proteína CRY35AB1 foram encontrados nas folhas do milho DAS-59122-7 (82,82 a 96,25 ng/mg de peso seco), níveis intermediários desta proteína foram encontrados em tecidos de forragem e planta inteira do milho DAS-59122-7 (17,74 a 33,51 ng/mg) e os níveis mais baixos desta proteína foram encontrados nas raízes do milho DAS-59122-7 (10,40 a 11,65 ng/mg de peso seco) e nos grãos (0,96 ng/mg de peso seco), conforme descrito na Tabela 48.

Os mais altos níveis de expressão da proteína PAT foram encontrados nas folhas do milho DAS-59122-7 (10,76 a 16,20 ng/mg de peso seco), enquanto que os níveis desta proteína nos demais tecidos avaliados foram baixos, variando de 0,02 ng/mg nos grãos até o máximo de 4,65 ng/mg nas amostras de planta inteira V9. A proteína PAT foi encontrada em níveis de expressão muito baixos nos tecidos avaliados, variando de 3,55 ng/mg nas folhas até níveis próximos de 0,05 ng/mg em grãos do milho DAS-59122-7 (Tabela 49).

Tabela 47 Resultados das avaliações de expressão da proteína CRY34AB1 no milho DAS-59122-7 e em seu iso-híbrido, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Tecido de milho	CRY34AB1 ng/mg de peso seco de tecido	
	Milho DAS-59122-7 Média (mín - máx)	Milho Iso-híbrido Média (mín - máx)
Folha V9	119,00 (69,00 - 167,50)	< LOD
Folha R1	155,67 (121,00 - 191,50)	< LOD
Raiz V9	64,25 (44,40 - 79,50)	< LOD
Raiz R1	93,35 (81,00 - 109,80)	< LOD
Planta inteira V9	101,58 (81,00 - 119,50)	< LOD
FORAGEM R4	197,83 (143,00 - 255,50)	< LOD
Planta inteira R6	154,64 (133,50 - 195,85)	< LOD
Grão R6	126,35 (79,75 - 199,31)	< LOD

Tabela 48 Resultados das avaliações de expressão da proteína CRY35AB1 no milho DAS-59122-7 e em seu iso-híbrido, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Tecido de milho	CRY35AB1 ng/mg de peso seco de tecido	
	Milho DAS-59122-7 Média (mín - máx)	Milho Iso-híbrido Média (mín - máx)
Folha V9	82,82 (56,76 - 126,52)	< LOD
Folha R1	96,25 (66,75 - 120,35)	< LOD
Raiz V9	10,40 (4,10 - 16,20)	< LOD
Raiz R1	11,65 (8,30 - 14,90)	< LOD
Planta inteira V9	33,51 (27,59 - 37,45)	< LOD
FORAGEM R4	27,97 (19,6 - 37,0)	< LOD
Planta inteira R6	17,74 (13,80 - 21,68)	< LOD
Grão R6	0,96 (0,75 - 1,38)	< LOD

Tabela 49 Resultados das avaliações de expressão da proteína PAT no milho DAS-59122-7 e em seu iso-híbrido, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Tecido de milho	PAT ng/mg de peso seco de tecido	
	Milho DAS-59122-7 Média (mín - máx)	Milho Iso-híbrido Média (mín - máx)
Folha V9	10,76 (5,12 - 15,71)	< LOD
Folha R1	16,20 (12,11 - 22,71)	< LOD
Raiz V9	0,52 (0,29 - 0,74)	< LOD
Raiz R1	0,96 (0,86 - 1,02)	< LOD
Planta inteira V9	4,65 (3,12 - 7,06)	< LOD
FORAGEM R4	2,37 (1,49 - 3,13)	< LOD
Planta inteira R6	0,06 (< LOD - 0,11)	< LOD
Grão R6	0,02 (< LOD - 0,03)	< LOD

4.3.3 Expressão das proteínas CRY1F, CRY34AB1, CRY35AB1 e PAT do milho TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente ao iso-híbrido

Foram mensuradas as concentrações das proteínas CRY1F, CRY34AB1, CRY35AB1 e PAT nos tecidos amostrados em diferentes tecidos do milho TC1507 e de seu iso-híbrido, conforme apresentado na Tabela 50 até a Tabela 53.

Os mais altos níveis de expressão da proteína CRY1F foram encontrados nas folhas (11,55 a 15,43 ng/mg de peso seco), na planta inteira V9 e na forragem R4 (11,61 a 13,98 ng/mg de peso seco respectivamente) do milho TC1507 x DAS-59122-7 e níveis inferiores de expressão foram detectados nas raízes (3,66 a 6,20 ng/mg de peso seco), na planta inteira R6 (6,51 ng/mg) e nos grãos (4,12 ng/mg) do milho TC1507 x DAS-59122-7 (Tabela 50).

Os mais altos níveis de expressão da proteína CRY34AB1 foram encontrados nas folhas (121,08 a 173,33 ng/mg de peso seco), na planta inteira R6 e na forragem R4 (164,42 e 224,66 ng/mg de peso seco respectivamente) do

milho TC1507 x DAS-59122-7, enquanto que níveis relativamente mais baixos desta proteína foram encontrados nas raízes (68,21 a 111,39 ng/mg de peso seco), na planta inteira V9 (107,58 ng/mg de peso seco) e nos grãos (67,53 ng/mg de peso seco) do milho TC1507 x DAS-59122-7 (Tabela 51).

Os mais altos níveis de expressão da proteína CRY35AB1 foram encontrados nas folhas (48,27 a 57,00 ng/mg de peso seco) e nos tecidos de planta inteira (20,37 a 31,30 ng/mg de peso seco) e na forragem R4 (36,20 ng/mg) do milho TC1507 x DAS-59122-7, enquanto que níveis relativamente mais baixos desta proteína foram encontrados nas raízes (9,31 a 9,56 ng/mg de peso seco) e nos grãos (1,16 ng/mg de peso seco) do milho TC1507 x DAS-59122-7 (Tabela 52).

Os mais altos níveis de expressão da proteína PAT foram encontrados nas folhas do milho TC1507 x DAS-59122-7 (15,33 a 21,31 ng/mg de peso seco) e na planta inteira V9 (8,59 ng/mg) e níveis relativamente mais baixos desta proteína foram encontrados em raízes (0,80 a 1,39 ng/mg de peso seco), planta inteira R6 (0,16 ng/mg), forragem R4 (3,29 ng/mg de peso seco) e em grãos (0,03 ng/mg de peso seco) do milho TC1507 x DAS-59122-7 (Tabela 53).

Tabela 50 Resultados das avaliações de expressão da proteína CRY1F no milho TC1507 x DAS-59122-7 e em seu iso-híbrido, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Tecido de milho	CRY1F ng/mg de peso seco de tecido	
	Milho TC1507 x DAS-59122-7	Milho Iso-híbrido
	Média (mín - máx)	Média (mín - máx)
Folha V9	15,43 (8,07 - 22,48)	< LOD
Folha R1	11,55 (6,52 - 18,25)	< LOD
Raiz V9	3,66 (2,22 - 5,34)	< LOD
Raiz R1	6,20 (4,88 - 7,34)	< LOD
Planta inteira V9	13,98 (11,75 - 16,44)	< LOD
Fragem R4	11,61 (9,16 - 15,02)	< LOD
Planta inteira R6	6,51 (4,70 - 11,61)	< LOD
Grão R6	4,12 (3,07 - 5,09)	< LOD

Tabela 51 Resultados das avaliações de expressão da proteína CRY34AB1 no milho TC1507 x DAS-59122-7 e em seu iso-híbrido, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Tecido de milho	CRY34AB1 ng/mg de peso seco de tecido	
	Milho TC1507 x DAS-59122-7	Milho Iso-híbrido
	Média (mín - máx)	Média (mín - máx)
Folha V9	173,33 (135,00 - 257,50)	< LOD
Folha R1	121,08 (98,50 - 156,50)	< LOD
Raiz V9	68,21 (52,85 - 75,38)	< LOD
Raiz R1	111,39 (98,23 - 132,32)	< LOD
Planta inteira V9	107,58 (52,85 - 75,38)	< LOD
Fragem R4	224,66 (184,57 - 276,01)	< LOD
Planta inteira R6	164,42 (127,50 - 261,50)	< LOD
Grão R6	67,53 (48,40 - 100,00)	< LOD

Tabela 52 Resultados das avaliações de expressão da proteína CRY35AB1 no milho TC1507 x DAS-59122-7 e em seu iso-híbrido, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Tecido de milho	CRY35AB1 ng/mg de peso seco de tecido	
	Milho TC1507 x DAS-59122-7 Média (mín - máx)	Milho Iso-híbrido Média (mín - máx)
Folha V9	57,00 (52,00 - 64,40)	< LOD
Folha R1	48,27 (33,20 - 77,60)	< LOD
Raiz V9	9,31 (7,10 - 13,54)	< LOD
Raiz R1	9,56 (5,11 - 14,75)	< LOD
Planta inteira V9	31,30 (25,20 - 35,60)	< LOD
Forrageira R4	36,20 (32,7 - 41,6)	< LOD
Planta inteira R6	20,37 (14,20 - 30,60)	< LOD
Grão R6	1,16 (1,00 - 1,40)	< LOD

Tabela 53 Resultados das avaliações de expressão da proteína PAT no milho TC1507 x DAS-59122-7 e em seu iso-híbrido, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Tecido de milho	PAT ng/mg de peso seco de tecido	
	Milho TC1507 x DAS-59122-7 Média (mín - máx)	Milho Iso-híbrido Média (mín - máx)
Folha V9	15,33 (7,46 - 20,61)	< LOD
Folha R1	21,31 (14,89 - 29)	< LOD
Raiz V9	0,80 (0,56 - 0,99)	< LOD
Raiz R1	1,39 (0,75 - 2,04)	< LOD
Planta inteira V9	8,59 (7,35 - 10,58)	< LOD
Forrageira R4	3,29 (1,63 - 7,02)	< LOD
Planta inteira R6	0,16 (0,04 - 0,60)	< LOD
Grão R6	0,03 (< LOD - 0,04)	< LOD

4.3.4 Comparação entre a expressão das proteínas CRY1F, CRY34AB1, CRY35AB1 e PAT do milho TC1507 x DAS-59122-7 e de seus componentes singulares milho TC1507 e milho DAS-59122-7

A variação dos níveis de expressão da proteína CRY1F no milho TC1507 x DAS-59122-7 foi equivalente à observada no milho TC1507 em todos os tecidos analisados, exceto em planta V9 e em Forragem R4, que foi menor no milho TC1507, devido aos períodos de escassez hídrica em Indianópolis (MG) no momento de desenvolvimento vegetativo das plantas, conforme mostrado no Gráfico 1.

Os dados experimentais mostram que os híbridos geneticamente modificados não diferem entre si em 6 das 8 comparações realizadas entre os teores da proteína nos tecidos dos diferentes milhos geneticamente modificados (Tabela 54 e Gráfico 14), o que aponta para a equivalência entre o híbrido portador do evento combinado (TC1507 x DAS-59122-7) e seu componente portador do evento singular (TC1507) com relação à expressão da proteína CRY1F.

Tabela 54 Resultados comparativos das médias das avaliações de expressão da proteína CRY1F do milho TC1507 x DAS-59122-7 e do milho TC1507, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Tecido de milho	CRY1F ng/mg peso seco	CRY1F ng/mg peso seco
	Milho TC1507 Média (mín - máx)	Milho TC1507 x DAS-59122-7 Média (mín - máx)
Folha V9	15,58 (5,19 - 26,04)	15,43 (8,07 - 22,48)
Folha R1	21,32 (8,13 - 32,60)	11,55 (6,52 - 18,25)
Raiz V9	3,74 (2,39 - 5,23)	3,66 (2,22 - 5,34)
Raiz R1	4,13 (2,94 - 5,41)	6,20 (4,88 - 7,34)
Planta inteira V9	8,52 (8,16 - 8,88)	13,98 (11,75 - 16,44)
Forragem R4	7,79 (7,34 - 8,24)	11,61 (9,16 - 15,02)
Planta inteira R6	5,13 (5,09 - 5,17)	6,51 (4,70 - 11,61)
Grão R6	3,57 (2,83 - 4,53)	4,12 (3,07 - 5,09)

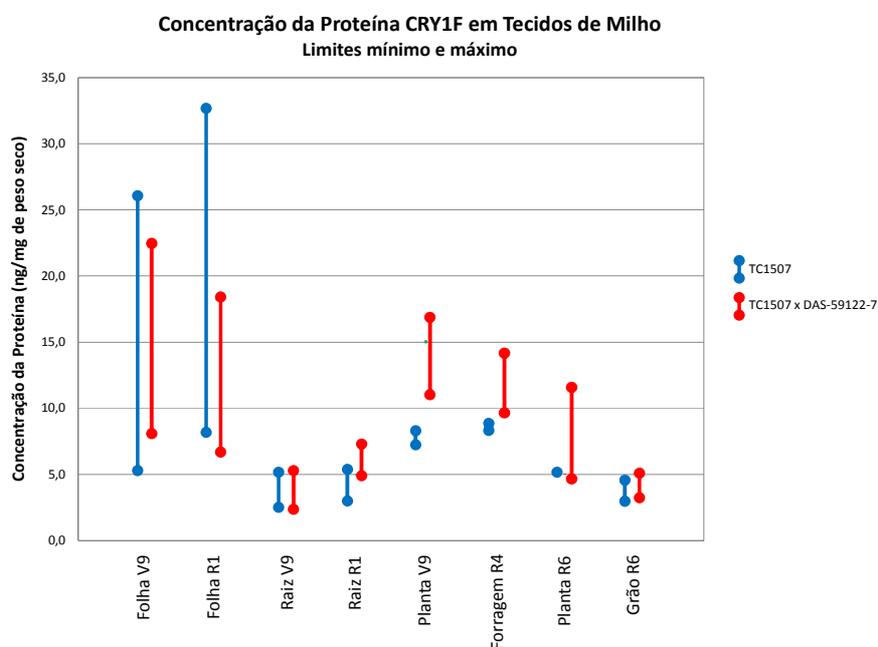


Gráfico 14 Resultados comparativos das médias das avaliações de expressão da proteína CRY1F do milho TC1507 x DAS-59122-7 e do milho TC1507, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Os níveis de expressão da proteína CRY34AB1 no milho TC1507 x DAS-59122-7 variou de forma equivalente à observada no milho DAS-59122-7 em todos os tecidos analisados, conforme apresentado na Tabela 55 e Gráfico 15, exceto em planta V9 do milho TC1507 x DAS-59122-7, que foi levemente inferior aos limites observados no milho DAS-59122-7.

Os dados experimentais mostram que os híbridos geneticamente modificados não diferem entre si em 7 das 8 comparações realizadas entre os teores da proteína CRY34AB1 nos tecidos dos diferentes milhos geneticamente modificados, demonstrando a equivalência entre o híbrido portador do evento

combinado (TC1507 x DAS-59122-7) e seu componente portador do evento singular (DAS-59122-7) com relação à expressão da proteína CRY34AB1.

Tabela 55 Resultados comparativos das médias das avaliações de expressão da proteína CRY34AB1 do milho TC1507 x DAS-59122-7 e do milho DAS-59122-7, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Tecido de milho	CRY34AB1 ng/mg peso seco	CRY34AB1 ng/mg peso seco
	Milho DAS-59122-7	Milho TC1507 x DAS-59122-7
	Média (mín - máx)	Média (mín - máx)
Folha V9	119,00 (69,00 - 167,50)	173,33 (135,00 - 257,50)
Folha R1	155,67 (121,00 - 191,50)	121,08 (98,50 - 156,50)
Raiz V9	64,25 (44,40 - 79,50)	68,21 (52,85 - 75,38)
Raiz R1	93,35 (81,00 - 109,80)	111,39 (98,23 - 132,32)
Planta inteira V9	101,58 (81,00 - 119,50)	107,58 (52,85 - 75,38)
Forragem R4	197,83 (143,00 - 255,50)	224,66 (184,57 - 276,01)
Planta inteira R6	154,64 (133,50 - 195,85)	164,42 (127,50 - 261,50)
Grão R6	126,35 (79,75 - 199,31)	67,53 (48,40 - 100,00)

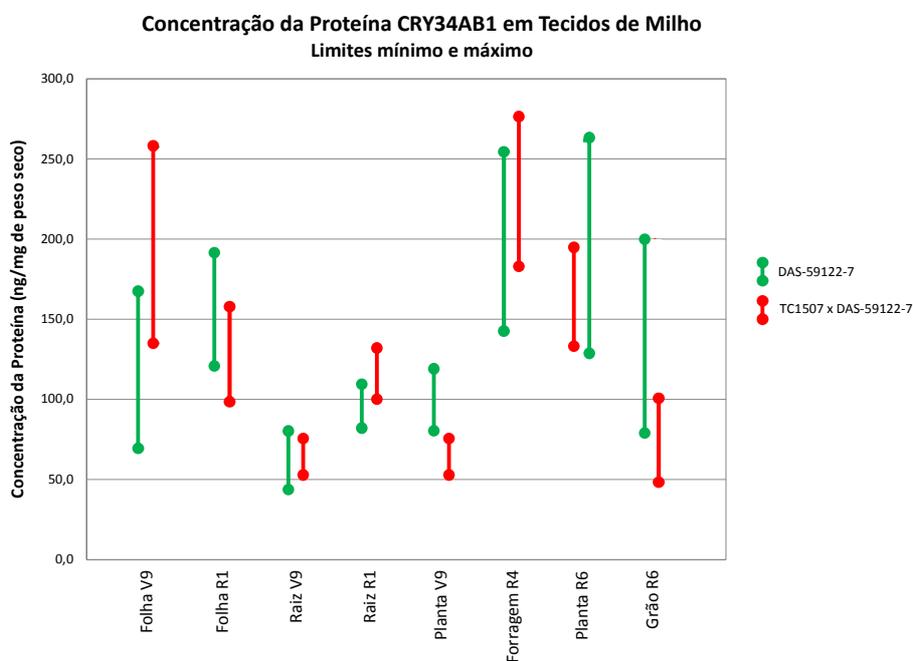


Gráfico 15 Resultados comparativos das médias das avaliações de expressão da proteína CRY34AB1 do milho TC1507 x DAS-59122-7 e do milho DAS-59122-7, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Os níveis de expressão da proteína CRY35AB1 no milho TC1507 x DAS-59122-7 variou de forma equivalente à observada no milho DAS-59122-7 em todos os tecidos analisados, conforme apresentado na Tabela 56 e no Gráfico 16.

Os dados experimentais mostram que os híbridos geneticamente modificados não diferem entre si em todas as 8 comparações realizadas entre os teores da proteína nos tecidos dos diferentes milhos geneticamente modificados, demonstrando a equivalência entre o híbrido portador do evento combinado

(TC1507 x DAS-59122-7) e seu componente portador do evento singular (DAS-59122-7) com relação à expressão das proteínas CRY35AB1.

Tabela 56 Resultados comparativos das médias das avaliações de expressão da proteína CRY35AB1 do milho TC1507 x DAS-59122-7 e do milho DAS-59122-7, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Tecido de milho	CRY35AB1 ng/mg peso seco	CRY35AB1 ng/mg peso seco
	Milho DAS-59122-7 Média (mín - máx)	Milho TC1507 x DAS-59122-7 Média (mín - máx)
Folha V9	82,82 (56,76 - 126,52)	57,00 (52,00 - 64,40)
Folha R1	96,25 (66,75 - 120,35)	48,27 (33,20 - 77,60)
Raiz V9	10,40 (4,10 - 16,20)	9,31 (7,10 - 13,54)
Raiz R1	11,65 (8,30 - 14,90)	9,56 (5,11 - 14,75)
Planta inteira V9	33,51 (27,59 - 37,45)	31,30 (25,20 - 35,60)
Forragem R4	27,97 (19,60 - 37,0)	36,20 (32,70 - 41,60)
Planta inteira R6	17,74 (13,80 - 21,68)	20,37 (14,20 - 30,60)
Grão R6	0,96 (0,75 - 1,38)	1,16 (1,00 - 1,40)

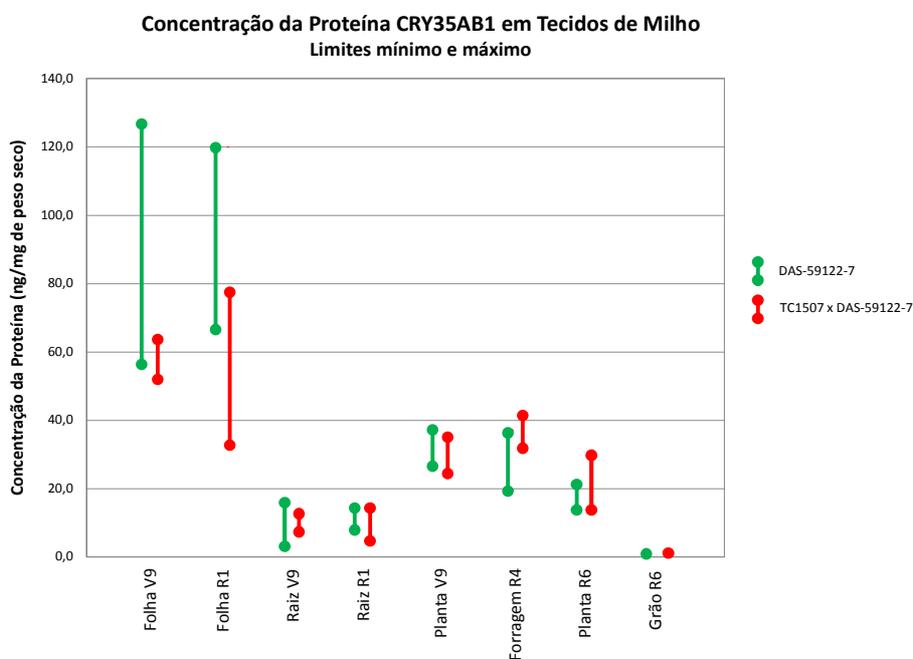


Gráfico 16 Resultados comparativos das médias das avaliações de expressão da proteína CRY35AB1 do milho TC1507 x DAS-59122-7 e do milho DAS-59122-7, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

A variação dos níveis de expressão da proteína PAT no milho TC1507 x DAS-59122-7 foi equivalente à observada no milho TC1507 e no milho DAS-59122-7 em todos os tecidos analisados, exceto em folha R1, planta V9 e em Forragem R4, que foi menor no milho TC1507 devido aos períodos de escassez hídrica em Indianópolis (MG) nos momentos de desenvolvimento vegetativo das plantas, conforme mostrado no Gráfico 1.

Os dados experimentais mostram que o milho TC1507 x DAS-59122-7 não difere do milho TC1507 em 5 das 8 comparações dos níveis de expressão da proteína PAT, e que o TC1507 x DAS-59122-7 não difere do milho DAS-

59122-7 em 7 das 8 comparações dos níveis de expressão desta proteína nos tecidos dos diferentes milhos geneticamente modificados (Tabela 57 e Gráfico 17), o que aponta para a equivalência entre o híbrido portador do evento combinado (TC1507 x DAS-59122-7) e seus componentes portadores dos eventos singulares (TC1507 e DAS-59122-7) com relação à expressão da proteína PAT.

Tabela 57 Resultados comparativos das médias das avaliações de expressão da proteína PAT do milho TC1507 x DAS-59122-7, do milho TC1507 e do milho DAS-59122-7, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

Tecido de milho	PAT ng/mg peso seco	PAT ng/mg peso seco	PAT ng/mg peso seco
	Milho TC1507 Média (mín - máx)	Milho DAS-59122-7 Média (mín - máx)	Milho TC1507 x DAS-59122-7 Média (mín - máx)
Folha V9	3,55 (1,46 - 5,14)	10,76 (5,12 - 15,71)	15,33 (7,46 - 20,61)
Folha R1	1,58 (2,20 - 7,35)	16,20 (12,11 - 22,71)	21,31 (14,89 - 29)
Raiz V9	0,10 (0,04 - 0,14)	0,52 (0,29 - 0,74)	0,80 (0,56 - 0,99)
Raiz R1	0,11 (0,09 - 0,12)	0,96 (0,86 - 1,02)	1,39 (0,75 - 2,04)
Planta inteira V9	1,32 (1,30 - 1,33)	4,65 (3,12 - 7,06)	8,59 (7,35 - 10,58)
Fragem R4	0,45 (0,31 - 0,59)	2,37 (1,49 - 3,13)	3,29 (1,63 - 7,02)
Planta inteira R6	< LOD	0,06 (< LOD - 0,11)	0,16 (0,04 - 0,6)
Grão R6	(0,06) (< LOD - 0,12)	0,02 (< LOD - 0,03)	0,03 (< LOD - 0,04)

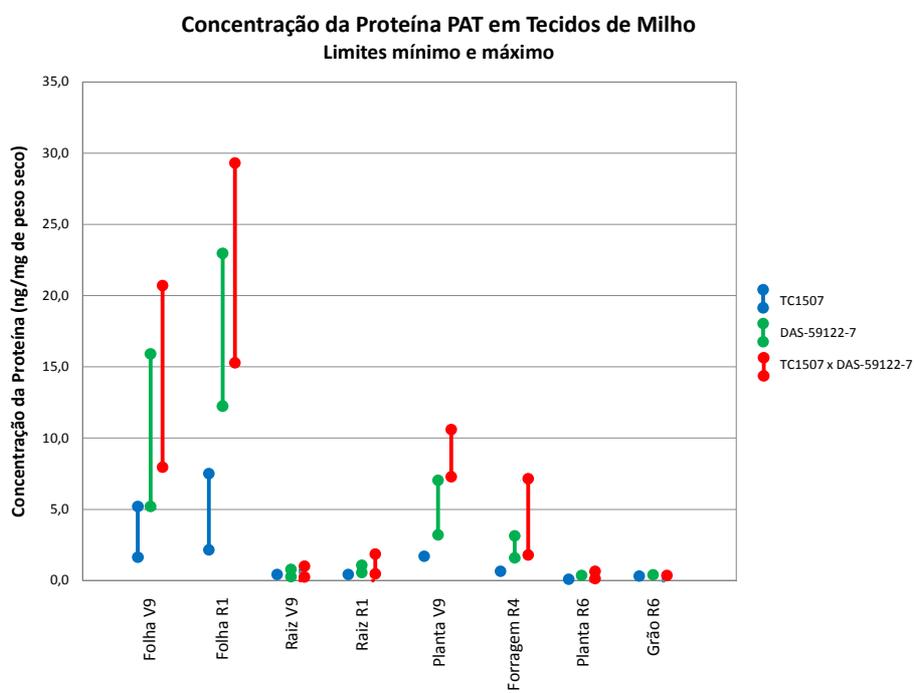


Gráfico 17 Resultados comparativos das médias das avaliações de expressão da proteína PAT do milho TC1507 x DAS-59122-7, do milho TC1507 e do milho DAS-59122-7, em análise combinada dos dados dos experimentos de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG)

5 CONCLUSÃO

O milho TC1507 x DAS-59122-7 portador dos eventos piramidados por hibridação e os milhos parentais TC1507 e DAS-59122-7 foram equivalentes aos respectivos iso-híbridos convencionais, com relação à sua composição nutricional, em 148 das 150 comparações realizadas. Os resultados obtidos estão dentro dos limites dos valores de referência de literatura em 141 dos 150 resultados.

Os híbridos TC1507 x DAS-59122-7, TC1507 e DAS-59122-7 foram equivalentes aos respectivos iso-híbridos convencionais, com relação às suas características agrônômicas, em todas as 24 comparações realizadas.

O híbrido TC1507 x DAS-59122-7 foi equivalente aos seus parentais TC1507 e DAS-59122-7 com relação aos níveis de expressão das proteínas CRY1F, CRY34AB1, CRY35AB1 e PAT em 33 das 40 comparações realizadas.

Os dados deste trabalho comprovam a equivalência entre o milho TC1507 x DAS-59122-7 e seus parentais portadores dos eventos singulares e corroboram a afirmação que a legislação brasileira de biossegurança, mais especificamente a Resolução Normativa 5 da CTNBio deveria ser aprimorada de forma que as plantas transgênicas portadoras de eventos piramidados por hibridação sejam automaticamente autorizadas para cultivo e consumo nas situações em que os parentais portadores dos eventos singulares tenham sido previamente aprovados pela CTNBio.

REFERÊNCIAS

- BEADLE, G. The ancestry of corn. **Scientific American**, New York, v. 242, p. 112, 1980.
- COCKBURN, A. Assuring the safety of genetically modified (GM) foods: the importance of an holistic, integrative approach. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 98, n. 1, p. 79-106, Sept. 2002.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira**. Brasília, 2012. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 15 jan. 2014.
- DE WET, J. M. J. et al. Systematics of South American *Tripsacum* (Gramineae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 68, n. 2, p. 269-276, 1981.
- DELANEY, B. et al. Evaluation of protein safety in the context of agricultural biotechnology. **Food and Chemical Toxicology**: an international journal, Oxford, v. 46, p. S71-97, May 2008. Supplement, 2.
- DOEBLEY, J. F.; ILTIS, H. Taxonomy of *Zea* (Graminae). I. Subspecific classification with key to taxa. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 67, n. 6, p. 982-993, 1980.
- DOEBLEY, J. F. Maize introgression into teosinte: a reappraisal. **Annual Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 71, n. 4, p. 1100-1113, 1984.
- ESAU, K. **Anatomy of seed plants**. 2. ed. [S.l.]: J. Wiley, 1977. 576 p.
- GAHAN, L. J.; GOULD, F.; HECKEL, D. G. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. **Science**, New York, v. 293, n. 5531, p. 857-860, Aug. 2001.
- GARCIA, C. et al. Pollen control during transgenic hybrid maize development in Mexico. **Crop Science**, Madison, v. 38, n. 6, p. 1597-1602, Nov. 1998.
- HERMAN, R. A. et al. Binary insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis*, strain PS149B1: effects of individual protein components and mixtures in laboratory bioassays. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 95, n. 3, p. 635-639, June 2002.

HÉROUET, C. **Selection of the route of exposure and the dose for testing a novel protein in the acute study in mice**. Paris: Bayer CropScience, 2005. (Regulatory Toxicology Position Paper M-236095-02-1).

ILTIS, H.; DOEBLEY, J. F. Taxonomy of *Zea* (Gramineae). II. Subspecific categories in the *Zea mays* complex and a general synopsis. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 67, n. 6, p. 994-1004, 1980.

ILTIS, H. From teosinte to maize. The catastrophic sexual transmutation. **Science**, v. 222, n. 4626, p. 886-894, 1983.

INTERNATIONAL LIFE SCIENCES INSTITUTE. 2010. **ILSI Crop Composition Database**: version 4.0. Disponível em: <www.cropcomposition.org>. Acesso em: 10 dez. 2013.

JEMISON, J. M.; VAYDA, M. E. Cross pollination from genetically engineered corn: wind transport and seed source. **AgBioForum**, v. 4, n. 2, art. 2, p. 87-92, 2001. Disponível em: <<http://agbioforum.org/v4n2/v4n2a02-jemison.htm>>. Acesso em: 10 jan. 2014.

LYONS, D. E.; THOMAS, A. D. Determination of Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT) Protein in Maize Tissues by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, 2010, GRM 07.25, unpublished method of Dow AgroSciences LLC.

MA, B. L.; SUBEDI, K. D.; REID, L. M. Extent of cross-fertilization in maize by pollen from neighboring transgenic hybrids. **Crop Science**, Madison, v. 44, n. 4, p. 1273-1282, Apr. 2004.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M. **Fisiologia da produção do milho**. 1. ed. Sete Lagoas: Embrapa, 2006. (Circular Técnica, 76).

MASSON, L. et al. A novel *Bacillus thuringiensis* (PS149B1 containing a CRY34AB1/CRY35AB1 binary toxin specific for the western corn rootworm *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte forms ion channels in lipid membranes. **Biochemistry**: including biophysical chemistry & molecular biology, Washington, v. 43, n. 38, p. 12349-12357, Sept. 2004.

MOELLENBECK, D. J. et al. Insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* protect corn from corn rootworms. **Nature Biotechnology**, New York, v. 19, n. 7, p. 668-672, July 2001.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Consensus document on compositional considerations for new varieties of maize (*Zea mays*):** key food & feed nutrients, anti-nutrients & secondary plant metabolites. 2002. 42 p. (ENV/JM/MONO, 25). Disponível em: <<http://www.oecd.org/science/biotrack/46815196.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

PATERNIANI, E.; CAMPOS, M. S. **Melhoramento das espécies cultivadas**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2005. p. 491-492.

PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 71, n. 2, p. 255-81, June 2007.

PURSEGLOVE, J. W. **Tropical crops**. London: Longman Group, 1972.

RAJAGOPAL, S. S. Recombinantly expressed isoenzymic aminopeptidases from *Helicoverpa armigera* (American cotton bollworm) midgut display differential interaction with closely related *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. **The Biochemical Journal**, London, v. 978, n. 370, p. 971-978, 2003.

RAMALHO, M. et al. **Aplicações da genética quantitativa no melhoramento de plantas cultivadas**. 1. ed. Lavras. Editora UFLA, 2012. 522 p.

ROMEIS, J.; MEISSE, M.; BIGLER, F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. **Nature Biotechnology**, New York, v. 24, n. 1, p. 63-71, Jan. 2006.

SALVADOR, R. J. Maize. In: WERNER, M. S. (Ed.). **The encyclopedia of Mexico: history, culture and society**. Chicago: Fitzroy Dearborn, 1997.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT® 9.2 user's guide**. 2. ed. Cary, 2004.

SHAN, G. Determination of CRY34AB1 Insecticidal Crystal Protein in Maize Tissues by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”, PHI 2003, unpublished method of Dow AgroSciences LLC. 2003a.

SHAN, G.; EMBREY, S. K. Determination of CRY35AB1 Insecticidal Crystal Protein in Maize Tissues by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, GRM 03.13, unpublished method of Dow AgroSciences LLC. 2003b.

SHAN, G.; EMBREY, S. K. Determination of CRY1F Insecticidal Crystal Protein in Maize Tissues by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, 2003, GRM 02.30, unpublished method of Dow AgroSciences LLC. 2003c.

SHAW, R. H. Climate requirement. In: _____. **Corn and corn improvement**. 3. ed. Madison, WI: ASA-CSSA-SSSA, 1988. p. 609-638.

SMITH, J. S. C.; GOODMAN, C. W.; STUBER, C. W. Relationships between maize and teosinte of Mexico and Guatemala: numerical analysis of alloenzyme data. **Economic Botany**, v. 39, p. 12-24, 1985.

SOBERÓN, M. et al. Mode of action of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* toxins. **Toxicon**: official journal of the International Society on Toxinology, v. 49, n. 5, p. 597-600, Apr. 2007.

SPRAGUE, G. F.; DUDLEY, J. W. The origin of corn. In: _____. **Corn and corn improvement**. Madison: American Society of Agronomy/Crop Science Society of America/Soil Science Society of America, 1988. p. 1-31.

THOMPSON, C. J. et al. *Streptomyces hygroscopicus*. **The EMBO Journal**, v. 6, n. 9, p. 2519-2523, 1987.

TOWNSEND, R.; SCHOPER, J. B. Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control. **Crop Science**, Madison, v. 41, n. 5, p. 1551-1557, Sept. 2001.

WALBOT, V.; MESSING, J. Molecular genetics of corn. In: SPRAGUE, G. F.; DUDLEY, J. W. (Ed.). **Corn and corn improvement**. 3. ed. [S. l.: s. n.], 1988. p. 565-607.

WANG, H. et al. Cry1Ab protein from *Bt* transgenic rice does not residue in rhizosphere soil. **Environmental Pollution (Barking)**, Essex, 1987, v. 143, n. 3, p. 449-55, Oct. 2006.

WATSON, S. A. Maize: amazing maize. In: WOLF, I. A. (Ed.). **CRC handbook of processing & utilization in agriculture**. Florida: CRC, 1982. Part. 1, v. 2, p. 3-29. (Plant Products).

WATSON, S. A. **Structure & composition, Maize**: chemistry & technology. In: WATSON, S. A.; RANSTED, P. E. (Ed.). Minnesota: American Association of Cereal Chemists, 1987. p. 53-82.

ZUPAN, J.; ZAMBRYSKI, P.; CITOVSKY, V. The *Agrobacterium* DNA transfer complex the *Agrobacterium* DNA transfer complex. **Critical Reviews in Plant Sciences**, p. 37-41, Oct. 2011.

ZUPAN, J. R.; ZAMBRYSKI, P. Transfer of T-DNA from. **Plant Physiology**, Washington, n. 107, p. 1041-1047, 1995.