

Kelly Justin da Silva

**INTROGRESSÃO DE HÍBRIDOS TRANSGÊNICOS E
CONVENCIONAL EM MILHO CRIOULO: EFEITOS SOBRE
FUNGOS E BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS**

Tese submetida ao Programa de Pós
Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do Grau
de Doutor em Ciências

Orientador: Prof. Dr.^a Juliana Bernardi
Ogliari

Co-orientador: Prof. Dr. Cláudio
Roberto Fonsêca Sousa Soares

Florianópolis
2015

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

Silva, Kelly Justin
INTROGRESSÃO DE HÍBRIDOS TRANSGÊNICOS E CONVENCIONAL EM
MILHO CRIOULO: EFEITOS SOBRE FUNGOS E BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS
/ Kelly Justin Silva ; orientadora, Juliana Bernardi
Oglirari ; coorientador, Cláudio Roberto Fônsêca Sousa
Soares. - Florianópolis, SC, 2015.
143 p.

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

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Fluxo gênico. 3. Zea
mays L.. 4. PCR-DGGE. 5. Conservação. I. Bernardi
Oglirari, Juliana . II. Roberto Fônsêca Sousa Soares,
Cláudio. III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.
IV. Título.

**Introgessão de híbridos transgênicos e
convencional em milho crioulo: efeitos sobre
fungos e bactérias endofíticas**

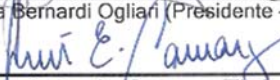
por

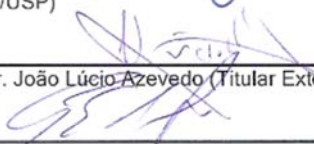
Kelly Justin da Silva

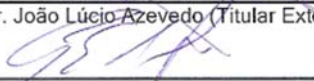
Tese julgada e aprovada em 27/02/2015, em sua forma final, pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

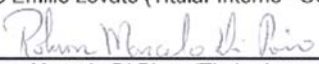
Banca Examinadora:

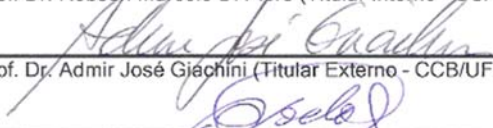

Prof.ª. Dr.ª. Juliana Bernardi Ogliari (Presidente - CCA/UFSC)


Prof. Dr. Luís Eduardo Aranha Camargo (Titular Externo - ESALQ/USP)


Prof. Dr. João Lúcio Azevedo (Titular Externo - ESALQ/USP)


Prof. Dr. Paulo Emilio Lovato (Titular Interno - CCA/UFSC)


Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero (Titular Interno - CCA/UFSC)


Prof. Dr. Admir José Giachini (Titular Externo - CCB/UFSC)


Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari (Coordenador do Programa)

Florianópolis, fevereiro de 2015

Este trabalho é dedicado aos agricultores familiares que conservam variedades crioulas.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e à fé necessária para seguirmos.

Aos meus pais, Carlos Abel e Maria Rosane, pelo amor incondicional, carinho e conselhos de incentivo a esse trabalho.

Ao meu irmão, Abel, pelo amor, carinho e amizade e por ter me ajudado muito no primeiro ano desse doutorado.

Ao meu marido, Rafael Dutra de Armas, pela dedicação, paciência, conselhos e também participação na elaboração deste trabalho.

À Deise Mara Zanini, minha grande amiga.

A todos os meus amigos e amigas da UFRGS de Porto Alegre, em especial à Laize Espíndola, Cliciana Bertoldi, Márcia Ruff, Marta Coutinho e Daiane Lattuada.

A todos os meus amigos e amigas da Esalq de Piracicaba, em especial a Ana Neto, Tiago Barbosa, Adriene Pedroza, Gustavo Portz, Sandra Montenegro, Silvia Barrera e Elisa Matos.

Aos colegas e amigos, André Lohn, Aline Cardozo e Letícia Floriano, pela imensa ajuda e participação nesse trabalho.

Aos agricultores familiares, Jair Coser, Miriam Della Vechia e à EPAGRI do município de Anchieta-SC.

À Prof. Juliana Ogliari, pela orientação e confiança.

Ao Prof. Cláudio Soares, pela orientação e amizade.

À CAPES, pela bolsa concedida.

À Coordenação do PPG-Recursos Genéticos Vegetais e à UFSC, pela oportunidade, em especial à secretária Bernadete Ribas.

A todos os colegas do RGV, em especial a Natália Almeida, Flaviane Costa, Rosa Sousa, Emanuela Pille, Diana Morales, Elaine Santos, Gabriel Moreno, Inês Burg, Betzaida Rojas, Rafael Vidal, Samuel Kamphorst, Tassiane Pinto, Wagner Bastos e Guilherme Osório, pela amizade e alegre convívio.

Aos amigos do laboratório de “Diversidade Microbiana do Solo”, no CCB/UFSC.

A todos aqueles que de alguma forma ajudaram na realização desse trabalho muito obrigada.

É preciso que você trabalhe, estude e se esforce no bem. Para isso você tem que respeitar os três pontos básicos para o serviço: o primeiro: disciplina; o segundo: disciplina; e o terceiro: disciplina.

(Emmanuel, para Chico Xavier)

RESUMO

O milho é a cultura mais amplamente distribuída em todo o mundo e possui um papel chave na segurança alimentar. Muitas pesquisas estão direcionadas ao milho transgênico, pois é amplamente cultivado e ainda gera dúvidas entre os cientistas. Os impactos ambientais das plantas transgênicas têm sido avaliados sobre os organismos não alvo da tecnologia, sobretudo os microrganismos endofíticos, uma vez que estão envolvidos em mecanismos de defesa e adaptação utilizados pelas plantas. Assim, nesse estudo buscou-se avaliar o efeito da inserção de transgenes e do fluxo gênico de transgenes sobre a estrutura de comunidades de microrganismos endofíticos uma variedade crioula de milho. Para isso, foram estudados três híbridos isogênicos, dos quais um deles era não geneticamente modificado (*NGM*), o segundo continha a transgenia Herculex, evento TC1507 (*Hx*) e o terceiro, a transgenia Herculex combinada com Roundup Ready, evento NK603 (*Hxrr*). A variedade crioula de milho utilizada foi a “Rosado” (*RS*) conservada *on farm* por agricultores familiares do Extremo Oeste de Santa Catarina, Brasil. Através de polinizações manuais controladas foram inseridos os pólenes dos híbridos em plantas de milho crioulo, durante duas gerações, a fim de simular a ocorrência de fluxo gênico recorrente, e assim gerar as populações de milho crioulo contendo 25, 50 e 75% da composição genética de cada híbrido, separadamente. Inicialmente avaliou-se bactérias e fungos endofíticos das folhas de plantas de milho, comparando apenas os quatro genótipos iniciais (*RS*, *NGM*, *Hx* e *Hxrr*), em quatro estádios do desenvolvimento das plantas, dois vegetativos (*V3* e *V4*) e dois reprodutivos (*R1* e *R2*). Para isso, em um ensaio a campo foram coletadas as folhas de três plantas de cada genótipo, em cada estádio, totalizando 48 amostras. Dessas amostras foram extraídos DNAs e feitas PCRs para amplificação do rDNA 16S de bactérias e da ssu rDNA de fungos, os quais foram avaliados por DGGE. Após as análises de cluster e ANOSIM, concluiu-se que as bactérias endofíticas variam apenas de acordo com o estádio fenológico, enquanto que os fungos endofíticos sofreram alterações devido ao genótipo das plantas. Com relação a estrutura da comunidade de fungos, *RS* diferiu dos demais genótipos avaliados, nos quatro estádios. Nos estádios vegetativos (*V3* e *V4*), os fungos foram diferentes entre os híbridos com e sem transgenia. No estádio reprodutivo (*R1*) ainda foi possível diferenciar a comunidade de fungos entre os dois transgenes, porém o *NGM* foi semelhante ao *Hx*. Após isso, implantou-se o experimento a campo, com três repetições em blocos casualizados, a fim de comparar os quatro genótipos (*RS*, *NGM*, *Hx* e *Hxrr*) e mais nove populações de milho crioulo geradas, contendo

25, 50 ou 75% do genoma de cada híbrido. Coletou-se 10 plantas de cada tratamento, no estágio reprodutivo (R1) previamente selecionado, totalizando 390 amostras, das quais foi extraído DNA e amplificada a região ssu rDNA de fungos endofíticos para análise por DGGE. Após análises de cluster e ANOSIM, concluiu-se que os fungos endofíticos da variedade *RS* diferiram dos demais tratamentos, assim como observado no ensaio anterior. As populações com introgressão do transgene *Hxrr* foram as que mais sofreram alterações. Os efeitos não intencionais dos transgenes nas plantas ainda são desconhecidos, por outro lado o presente trabalho permite inferir que os transgenes afetam a diversidade estrutural de fungos endofíticos do milho e que os efeitos diretos sobre as plantas ainda devem ser estudados.

Palavras-chave: Fluxo gênico. *Zea mays* L. PCR-DGGE. Conservação. Recurso Genético.

ABSTRACT

Maize is the most widely crop distributed around the world and it has a key role in food safety. Many researches are performed with transgenic maize because it is widely cultivated and still generates doubts among scientists. The environmental impacts of the transgenic plants have been evaluated on non-target organisms of the biotechnology, especially the endophytic microorganisms, since they are involved in defense mechanisms and adaptation used by plants. Thus, this study aimed at assessing the effect of the insertion of transgenes into the plant and gene flow on the structure of endophytic microbial communities of a corn landrace. Thus, we used three isogenic hybrids, of which one was the isogenic form not genetically modified form (*NGM*), the second contained the transgenic Herculex, TC1507 event (*Hx*), and the third, the transgenic Herculex combined with Roundup Ready, NK603 event (*Hxrr*). The corn landrace was "Rosado" (*RS*) conserved *on farm* by small-scale farmers in Western Santa Catarina, Brazil. The pollen of hybrids were used to pollinate *RS* for two generations through controlled pollinations in order to simulate the occurrence of recurrent gene flow and generate populations contain 25, 50 and 75% of the genetic background of each hybrid. Initially, endophytic fungi and bacteria from leaves of plants were evaluated, based on the four genitors genotypes (*RS*, *NGM*, *Hx* and *Hxrr*) in four stages of plant development, two vegetative (V3 and V4) and two reproductive (R1 and R2). Thus, in a field trial was collected leaves from three plants for each genotype and each stage, totaling 48 samples. DNAs were extracted from these samples, following of PCR amplifications with 16S rDNA of bacteria and ssu rDNA of fungi, which were evaluated by DGGE. After cluster analysis and ANOSIM, it may be concluded that endophytic bacteria vary according to the phenological stage, while the endophytic fungi change due to the genotype of plants. Regarding the structure of fungal community, *RS* differed from the other genotypes in the four stages. In the vegetative stages (V3 and V4), the fungi were different among the hybrids with and without genetic modification. In the reproductive stage (R1), the fungal community was different for the two transgenic hybrids (*Hx* and *Hxrr*), but *NGM* was similar to *Hx*. After that, the field experiment was implanted with three replications in a randomized block design, in order to compare the four genotypes (*RS*, *NGM*, *Hx* and *Hxrr*) and nine populations containing 25, 50 or 75% of the genome each hybrid separately. Leaves of 10 plants of each treatment were collected in the reproductive stage (R1) previously selected, totaling 390 samples. DNAs were extracted from these samples and the rDNA ssu region of endophytic fungi was amplified the rDNA

ssu region for analysis through DGGE. After cluster analysis and ANOSIM, it may be concluded that endophytic fungi of *RS* differed from other treatments, such as previous test. Populations with introgression of *Hxrr* transgene suffered more changes. The unintended effects of transgenes in plants is still unknown; on the other hand, we can infer from this work that the transgenes affect the structural diversity of endophytic fungi of corn and the direct effects on plants still need to be studied.

Keywords: Gene Flow. *Zea mays* L. PCR-DGGE. Conservation. Genetic Resource.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema do inserto para o milho transgênico Herculex I (TC1507). Gene inserido: *cry1F* e *pat*, promotor *ubiZM* (oriundo do milho) e P35S, terminador: T35S..... 32
- Figura 2.** Esquema do inserto para o milho transgênico, evento NK603 Roundup Ready. Promotor: P35S, terminador: NOS-t33
- Figura 3.** Imagem da amplificação parcial do gene TC1507 com aproximadamente 279 pb. Onde *RS*, *NGM*, *Hx* e *Hxrr* referem-se aos tratamentos e *C* refere-se ao controle negativo 67
- Figura 4.** Imagem dos géis de DGGE, de bactérias endofíticas, com três repetições de cada tratamento avaliado. Onde *RS* (crioulo) *NGM* (convencional), *Hx* (transgênico TC1507) e *Hxrr* (transgênico TC1507+NK603) referem-se aos genótipos de milho, nos estádios vegetativos V3 e V4 e reprodutivos R1 e R2..... 69
- Figura 5.** Agrupamento hierárquico da estrutura de comunidades de bactérias endofíticas. Onde *RS* (crioulo) *NGM* (convencional), *Hx* (transgênico TC1507) e *Hxrr* (transgênico TC1507+NK603) referem-se aos genótipos de milho, nos estádios vegetativos V3 e V4 e reprodutivos R1 e R2. 70
- Figura 6** Imagem dos géis de DGGE, de fungos endofíticos, com três repetições de cada tratamento avaliado. Onde *RS* (crioulo) *NGM* (convencional), *Hx* (transgênico TC1507) e *Hxrr* (transgênico TC1507+NK603) referem-se aos genótipos de milho, nos estádios vegetativos V3 e V4 e reprodutivos R1 e R2..... 73
- Figura 7.** Agrupamento hierárquico da estrutura de comunidades de fungos endofíticos. Onde *RS* (crioulo) *NGM* (convencional), *Hx* (transgênico TC1507) e *Hxrr* (transgênico TC1507+NK603) referem-se aos genótipos de milho, nos estádios vegetativos V3 e V4 e reprodutivos R1 e R2 74
- Figura 8.** Diagrama de Venn obtido da planilha de presença e ausência da estrutura de comunidades de fungos endofíticos. Onde *RS* (crioulo) *NGM* (convencional), *Hx* (transgênico TC1507) e *Hxrr* (transgênico TC1507+NK603) referem-se aos genótipos de milho, nos estádios vegetativos V3 e V4 e reprodutivos R1 e R2..... 76
- Figura 9.** Imagem da amplificação parcial do gene TC1507 com aproximadamente 279 pb. Onde *RS*, *NGM*, *Hx* e *Hxrr* referem-se aos

tratamentos, representados pelo DNA de amostras compostas, obtidas a partir de 10 plantas distintas. Os números 25, 50 e 75 referem-se a percentagem genética do híbrido, o restante é refere-se ao milho crioulo. C refere-se ao controle negativo 106

Figura 10. Imagem dos géis de DGGE de fungos endofíticos, com três repetições de cada tratamento avaliado. Onde *RS*, *NGM*, *Hx* e *Hxrr* referem-se aos tratamentos, representados pelo DNA de amostras compostas, obtidas a partir de 10 plantas distintas. Os números 25, 50 e 75 referem-se a percentagem genética do híbrido, o restante é refere-se ao milho crioulo 108

Figura 11. Agrupamento hierárquico da estrutura de comunidades de fungos endofíticos de populações de milho contendo diferentes *backgrounds* genéticos de introgressão de genes obtida por PCR-DGGE. Onde *RS*, *NGM*, *Hx* e *Hxrr* referem-se aos tratamentos. Os números 25, 50 e 75 referem-se a percentagem genética do híbrido 109

Figura 12. Diagrama de Venn obtido da planilha de presença e ausência da estrutura de comunidades de fungos endofíticos. Onde *RS*, *NGM*, *Hx* e *Hxrr* referem-se aos tratamentos. Os números 25, 50 e 75 referem-se a percentagem genética do híbrido 110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Resultado do teste de ANOSIM por <i>Pairwise</i> (pareamento) baseado nos perfis de amplicons do gene rDNA 16S de bactérias endofíticas. Onde <i>RS</i> (crioulo) <i>NGM</i> (convencional), <i>Hx</i> (transgênico TC1507) e <i>Hxrr</i> (transgênico TC1507+NK603) referem-se aos genótipos de milho, nos estádios vegetativos V3 e V4 e reprodutivos R1 e R2.....	71
Tabela 2 Resultado do teste de ANOSIM por <i>Pairwise</i> (pareamento) baseado nos perfis de amplicons do gene rDNA 18S de fungos endofíticos. Onde <i>RS</i> (crioulo) <i>NGM</i> (convencional), <i>Hx</i> (transgênico TC1507) e <i>Hxrr</i> (transgênico TC1507+NK603) referem-se aos genótipos de milho, nos estádios vegetativos V3 e V4 e reprodutivos R1 e R2.....	75
Tabela 3. Descrição dos <i>backgrounds</i> genéticos das populações de milho com introgressão dos híbridos.....	99
Tabela 4. Resultado do teste de ANOSIM por <i>Pairwise</i> (pareamento) baseado nos perfis de amplicons do gene ssu (18S rDNA) de fungos endofíticos de plantas de milho.....	105
Tabela 5 Resultado do teste de ANOSIM por <i>Pairwise</i> (pareamento) baseado nos perfis de amplicons do gene ssu (18S rDNA) de fungos endofíticos de plantas de milho.....	111

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1 A cultura do milho	25
2.1.1 Origem, evolução e domesticação.....	25
2.1.2 Principais usos e seu papel na segurança alimentar mundial ...	25
2.1.3 Importância econômica	26
2.1.4 Variedades crioulas e a Agricultura familiar.....	27
2.2 O milho transgênico	29
2.2.1 Cenário dos transgênicos.....	29
2.2.2 Os transgênicos Herculex I e Roundup Ready.....	31
2.4 Efeitos dos transgênicos sobre organismos não alvo: os microrganismos endofíticos	35
2.4.1 Interação de organismos endofíticos com as plantas.....	35
2.4.2 PCR-DGGE para avaliação da comunidade de endofíticos	36
REFERÊNCIAS	39
3 HIPÓTESES E OBJETIVOS	51
3.1 Hipóteses.....	51
3.2 Objetivo Geral.....	51
4 CAPÍTULO 1	53
Comunidades de microrganismos endofíticos em diferentes estádios do crescimento de milho crioulo e híbridos isogênicos transgênico e convencional	53
RESUMO	55
INTRODUÇÃO	57
MATERIAL e MÉTODOS	61
<i>Material vegetal</i>	61
<i>Ensaio a campo</i>	61
<i>Detecção de transgenes</i>	62
<i>Extração de DNA</i>	63
<i>Análises de PCR-DGGE</i>	64
<i>Análises estatísticas</i>	65
RESULTADOS	67
<i>Detecção do evento TC1507</i>	67
<i>Detecção do evento TC1507</i>	67
<i>Comunidade de bactérias endofíticas</i>	68
<i>Comunidade de fungos endofíticos</i>	71
DISCUSSÃO.....	77
REFERÊNCIAS	83

5 CAPÍTULO 2.....	89
Efeitos do fluxo gênico entre transgênico, isogênica convencional e uma variedade crioula de milho sobre os fungos endofíticos	89
RESUMO	91
INTRODUÇÃO	93
MATERIAL e MÉTODOS	97
<i>Desenvolvimento das populações com diferentes backgrounds</i>	
<i>genéticos</i>	97
<i>Seleção do estágio fenológico para avaliação</i>	99
<i>Condições do experimento a campo</i>	100
<i>Coleta do material vegetal</i>	101
<i>Extração de DNA</i>	101
<i>Detecção de transgenes - evento TC1507</i>	102
<i>Comunidade de fungos endofíticos por PCR-DGGE</i>	103
<i>Análises estatísticas</i>	104
RESULTADOS.....	105
<i>Definição do estágio fenológico a ser analisado</i>	105
<i>Detecção de transgenes - evento TC1507</i>	106
<i>Comunidade de Fungos Endofíticos</i>	106
DISCUSSÃO	113
CONCLUSÃO	117
REFERÊNCIAS.....	119
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	125
APÊNDICE A - Desenvolvimento das populações com diferentes	
<i>backgrounds genéticos</i>	127
APÊNDICE B - Croqui e fotos do primeiro ensaio a campo	129
APÊNDICE E - Croqui e fotos do experimento	135
APÊNDICE F - Dados meteorológicos da área o experimento	139
APÊNDICE G - Quantidade e qualidade do DNA das amostras compostas	
.....	141
ANEXO A – Análise química do solo	143

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O milho é uma cultura de grande relevância econômica em todo o mundo, segundo a FAO, é a segunda *commodity* mais importante (FAOSTAT, 2012). Além disso, a cultura do milho possui um papel chave na segurança alimentar mundial, uma vez que a elevada diversidade genética do milho permite uma melhor adaptação aos mais diversos ambientes de cultivo e ainda apresenta muitos tipos de usos na alimentação, sendo uma das mais importantes fonte nutricionais do mundo (SHIFERAW et al., 2011).

A agricultura familiar é atualmente reconhecida como fundamental para alimentação humana no mundo (FAO, 2014) e o milho representa boa parte da produção para essas famílias, sendo utilizado para o consumo humano e animal e o excedente comercializado. Esse é um cenário mundial e que também ocorre no Brasil, em especial no estado de Santa Catarina, que é o foco desse estudo, onde 88% dos estabelecimentos catarinenses que produzem milho são de agricultura familiar e representam 76% de toda a produção estadual (IBGE, 2006).

O Núcleo de Estudos em Agrobiodiversidade (NEABio), da Universidade Federal de Santa Catarina, coordenado pela Professora Juliana B. Ogliari, tem trabalhado em comunidades de agricultores familiares do Oeste de Santa Catarina desde o ano de 2002, sobretudo com os chamados mantenedores, ou seja, agricultores que conservam variedades crioulas de milho, pipoca, arroz, feijão e mandioca. A atuação do grupo nessa região abrange a elaboração de diagnósticos do cenário da agricultura familiar, melhoramento participativo, cursos de capacitação, além da proveitosa troca de conhecimento entre os integrantes do NEABio e os agricultores familiares.

Grande parte dos estudos do grupo são realizados a partir das variedades crioulas de milho cultivadas por produtores familiares ao longo de muitos anos, as quais têm sido especialmente destacadas como valiosas fontes de características desejáveis (OGLIARI, KIST & CANCI, 2013; OGLIARI & ALVES, 2007). Dentre essas características, destaca-se a adaptação dessas variedades às condições de agroecossistemas locais, viabilizando sistemas de cultivo mais sustentáveis (KIST et al., 2010; WOOD & LENNÉ, 1997). Além disso, são fontes de genes para o melhoramento de plantas, pois a partir da conservação *in situ – on farm*, as plantas cultivadas estão em constante adaptação às condições do ambiente de cultivo.

Porém, devido à grande importância comercial e econômica que o milho representa, muitas empresas do agronegócio têm desenvolvido híbridos cada vez mais produtivos através do melhoramento genético e, desde a década de 90, com a inserção das tecnologias de engenharia genética, os transgênicos (JAMES & KRATTIGER, 1996). Mesmo após tanto tempo de cultivo de plantas transgênicas, esse assunto ainda preocupa a ciência, principalmente pelo seu cunho social e ambiental, uma vez que ainda são inconclusivos os reais efeitos que os transgenes podem acarretar no ambiente e também pela dependência econômica imposta às famílias de agricultores em todo o mundo.

Um recente estudo do grupo NEABio verificou que nos municípios de Anchieta e Guaraciaba, localizados na região do extremo Oeste catarinense, existe um sistema bimodal de produção, ou seja, variedades crioulas e híbridos comerciais cultivados pelo mesmo agricultor (SILVA et al., 2013). Isso ocorre, em parte, devido a política do governo do Estado (Programa Terra Boa) que promove a distribuição de híbridos, em sua maioria transgênicos, para os agricultores.

Ainda nesse estudo, verificou-se que 70% das áreas destinadas ao cultivo das variedades crioulas estão sendo cultivadas a uma distância menor ou igual a 100 metros das lavouras de milho transgênico (SILVA et al., 2013). A proximidade de lavouras de milho transgênico daquelas com milho crioulo é uma preocupação em vista da biologia reprodutiva das plantas. Os pólenes liberados pelos pendões da planta durante a fase reprodutiva, são lançados ao vento, percorrem grandes distâncias e são capazes de fecundar espigas que estejam receptivas de quaisquer outras plantas de milho, que não necessariamente aquela de onde o pólen partiu. E assim, perde-se com facilidade o controle da composição genética do milho, o que no caso das variedades crioulas pode representar erosão genética, perda de variedades adaptadas e o consumo e cultivo desconhecido de variedades crioulas contaminadas por transgenes.

Além disso, grande parte dos agricultores do extremo Oeste de Santa Catarina relata não saber o que é um transgênico e (o que é pior) não ter conhecimento da composição genética da semente de milho disponibilizada aos agricultores pelo programa do Estado “Terra Boa”, se transgênica ou convencional (Dados do NEABio, ainda não publicado).

No Brasil, a avaliação de segurança de alimentos/plantas transgênicas baseia-se no conceito da "equivalência substancial", ou seja, “se um alimento novo é substancialmente equivalente em composição e características nutricionais, ele pode ser considerado tão seguro quanto o alimento convencional” (SOT, 2003). Porém, esse conceito não responde

a todas as questões referentes à segurança das plantas transgênicas e assim está em desacordo com o “Princípio da Precaução” (Cartagena Protocol, 2000) e com o “Direito dos Agricultores” (Tratado da FAO, 2002), dos quais o Brasil é signatário.

Com base nisso, muitos estudos têm sido feitos a fim de avaliar os efeitos não-intencionais da transgenia, ou seja, efeitos além daquela característica conferida pela inserção de determinado gene ou fragmento de DNA.

Grande parte dos estudos envolvendo a introgressão de genes utiliza a comparação entre as plantas com transgenia e as suas versões isogênicas convencionais. Porém, visto a problemática relatada anteriormente, torna-se fundamental avaliar populações de variedades crioulas de milho que tenham sofrido introgressão indesejada de transgenes por fluxo gênico.

Uma série de abordagens são utilizadas para avaliar os efeitos da introgressão de genes em cultivares de milho não-transgênicas. Dentre elas, a proteômica, visto que muitas proteínas expressas pelas plantas com transgenes podem ser exclusivas e prejudiciais à saúde, como já demonstrado em alguns trabalhos (AGAPITO-TEFEN et al., 2013; SÉRALINI et al., 2012).

Com relação à avaliação dos efeitos das plantas transgênicas sobre organismos não-alvo destacam-se os estudos com abelhas (ZVI et al., 2012), macrofauna do solo (TRUTER, Van HAMBURG & Van Den BERG, 2014), fungos micorrízicos (CHEEKE, ROSENSTIEL & CRUZAN, 2012), microrganismos endofíticos (ANDREOTE et al., 2010; RASCHE et al., 2006), entre outros.

Os microrganismos endofíticos, visto sua íntima relação com as plantas e a importância para muitos mecanismos utilizados pelas mesmas, principalmente aqueles relacionados à defesa contra patógenos e adaptação a condições ambientais adversas (Ek-RAMOS et al., 2013; REDMAN et al., 2011; REDMAN et al., 2002; VARMA et al., 1999; M’PIGA et al., 1997), podem ser um importante grupo indicador dos efeitos da introgressão de genes em variedades de milho não-transgênicas.

Pressupõe-se que os efeitos epistáticos dos transgenes, ou seja, a sua interação com o genoma da planta pode acarretar mudanças na diversidade de microrganismos endofíticos que naturalmente colonizam variedades crioulas de milho. Consequentemente, podem desencadear modificações nas plantas, desde aquelas relacionadas à resistência a pragas e doenças (fatores bióticos), até aquelas associadas à adaptação sob condições adversas do ambiente (fatores abióticos).

A diversidade de microrganismos pode ser avaliada por muitas técnicas, basicamente divididas entre dependentes e independentes de cultivo. As técnicas dependentes de cultivo estão relacionadas à obtenção de isolados microbianos. O emprego de técnicas de biologia molecular, que representam técnicas independentes de cultivo, se baseia na detecção, diferenciação e identificação de microrganismos a partir de regiões específicas do DNA e permite avaliar a diversidade de microrganismos de determinado ambiente de forma mais representativa (LOGARES et al., 2014; ROESCH et al., 2006; DIAS et al., 2011).

Dentre as técnicas independentes de cultivo encontram-se as chamadas de *fingerprint*, como, ARISA, ARDRA, T-RFLP, TGGE e DGGE, as quais possibilitam a avaliação de estruturas de comunidades de microrganismos. Dentre essas técnicas, uma das mais utilizadas em estudos de ecologia microbiana é a DGGE (eletroforese em gel com gradiente desnaturante). Essa possui rapidez na obtenção de dados e baixo custo quando comparada a outras técnicas (SILVA, VIDAL-TORRADO & LAMBAIS, 2014; PINHEIRO et al., 2013; ARAÚJO et al., 2002; ØVREÅS et al., 1997; MUYZER et al., 1993). A DGGE permite a separação de fragmentos de DNA com base no seu conteúdo de bases C≡G e o padrão de bandas de cada amostra permite comparações de estruturas de comunidades microbianas entre ambientes.

Diante do cenário da região Oeste, do estado de Santa Catarina, no qual os transgênicos podem estar sendo disseminados indiscriminadamente e a falta de consenso na literatura científica sobre a liberação e biossegurança dos transgênicos, o grupo NEABio iniciou pesquisas de cunho comparativo entre híbridos com e sem transgenia e variedades crioulas de milho. Nesses experimentos também são conduzidos cruzamentos entre as populações de milho, a fim de avaliar o impacto dos transgenes no caso de ocorrer fluxo gênico. As primeiras populações de introgressões de transgenes em milho crioulo foram feitas durante o desenvolvimento do presente estudo.

Ao nosso conhecimento, não existem relatos na literatura sobre os efeitos de fluxo gênico entre cultivares transgênicas e variedades crioulas de milho sobre a estrutura de comunidades de bactérias e fungos endofíticos. Assim, esse estudo é inédito e relevante, simulando a introgressão de pólen transgênico em uma variedade crioula de milho, o que pode ocorrer em condições reais de campo, sendo as consequências dessa contaminação desconhecidas até o momento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura do milho

2.1.1 Origem, evolução e domesticação

O milho é uma espécie de fecundação cruzada, de alta especialização e adaptação. É uma gramínea anual, pertencente à família Poaceae, tribo Maydeae, gênero *Zea*, espécie *mays* L., identificado como *Zea mays* L. ssp. *mays* (PATERNIANI & CAMPOS, 1999; MACHADO & PATERNIANI, 1998).

As populações domesticadas de milho possuem uma adaptação ecológica crítica, que impossibilita a reprodução sem intervenção humana. As palhas que envolvem a espiga não se soltam naturalmente, impossibilitando a dispersão natural das sementes (HARLAN, 1992).

Uma das teorias mais aceitas é que o milho foi domesticado no Sul do México, no estado do Oaxaca, há aproximadamente 9.000 anos, a partir de um antepassado selvagem, também uma gramínea, cujo parente mais próximo seria o teosinto, *Zea mays* spp. *parviglumis* (Parviglumis) (WILKES, 2004). A única população natural significativa de teosinto que permanece até hoje encontra-se no vale do rio Balsas, no México (WILKES, 2007). Nesse processo, os americanos nativos tornaram o milho o principal cultivo de importantes civilizações como a dos astecas, maias e incas (GALINAT, 1992).

Devido à característica de dependência de intervenção para reprodução, acredita-se que os humanos foram os responsáveis pela dispersão do milho, a partir do rio Balsas (MATSUOKA et al., 2002). Em uma revisão feita sobre esse assunto, os autores sugerem que, inicialmente, o milho foi utilizado como fonte de carboidrato e como matéria-prima para elaboração de cervejas, visto que inicialmente a produção de grãos era muito baixa (SMALLEY & BLAKE, 2003). Não há estudos conclusivos sobre a época em que o milho começou a ser cultivado e melhorado para o uso dos grãos.

2.1.2 Principais usos e seu papel na segurança alimentar mundial

Foi sugerido por Smalley & Blake (2003) que os primeiros usos alimentares do milho foram a partir dos talos para bebidas alcoólicas, a cerveja de milho e o açúcar, já que apresentava baixa produção de grãos. Outra hipótese de uso inicial do milho é a do consumo de inflorescências imaturas como verdura (PIPERNO & PEARSALL, 1998).

Em um estudo do NEABio no município de Anchieta/SC foram identificados mais de 50 categorias de usos entre o milho comum, adocicado e pipoca, sendo a maioria com uso direto na alimentação. Dentre os principais usos destacaram-se alimentação da família, alimentação animal, artesanato e doação ou troca de sementes (COSTA et al., 2015; COSTA, 2013).

Devido à diversidade de usos do milho e à facilidade de adaptação do mesmo aos mais diversos ambientes, essa cultura apresenta-se como o alimento chave para garantir a segurança alimentar mundial. O milho é a cultura alimentar com maior capacidade de ser produzida em amplas faixas de altitudes e latitudes, em temperaturas que variam de amena a muito quente, em ambientes com alta disponibilidade hídrica e também em locais semiáridos, além de diferentes tipos de solo (SHIFERAW et al., 2011).

Os cereais mais cultivados no mundo, arroz, trigo e milho, fornecem pelo menos 30% da dieta alimentar para mais de 4,5 bilhões de pessoas, em 94 países considerados em desenvolvimento (SHIFERAW et al., 2011). O milho é produzido em quase 100 milhões de hectares em 125 países em desenvolvimento e está entre as três culturas mais amplamente cultivadas em 75 desses países (FAOSTAT, 2012). Aproximadamente 70% da produção total de milho no mundo vem de países de renda baixa ou inferior, por isso, o milho tem um papel importante nos meios de subsistência de milhões de agricultores pobres (SHIFERAW et al., 2011).

Assim, a importância do milho para os países em desenvolvimento e a crescente demanda mundial por essa cultura, faz do milho uma das principais plantas a serem conservadas. Além disso, com as perspectivas futuras de mudanças climáticas drásticas, percebe-se a importância de manter a salvo as variedades crioulas, visto que são as principais fontes para o melhoramento genético e desenvolvimento de variedades com capacidade de adaptação ao ambiente.

2.1.3 Importância econômica

De acordo com os dados mais recentes da FAO, o milho foi a segunda *commodity* mais importante no mundo no ano de 2012 (FAOSTAT, 2012). O milho é a terceira cultura alimentar mais importante no mundo como fonte de energia e proteína para a alimentação humana, sendo de grande importância econômica e social, atrás apenas de arroz e trigo (FAO, 2013; KIRINO, 2003). É o principal cereal cultivado em todo o mundo, com produção em um quinto das terras agrícolas (AMOS & WALTERS, 2006).

Na safra de 2013/2014, foi cultivado milho em uma área de 178 milhões de hectares em todo o mundo, com uma produção total de 984 milhões de toneladas e uma produtividade média de 5,5 t ha⁻¹. Nesse cenário, o Brasil encontra-se em terceiro lugar em área plantada, com 15,5 milhões de hectares, atrás de Estados Unidos e China. O Brasil atingiu nessa safra uma produção total de 78 milhões de toneladas e produtividade média de 5,0 t ha⁻¹ (USDA, 2014).

Além de suprir o abastecimento nacional, o país ainda exporta grãos de milho em grande quantidade, sendo o segundo em exportação, com 22 milhões de toneladas, perdendo apenas para os Estados Unidos (44,5 milhões t), seguido pela Ucrânia (16,5 milhões t) e Argentina (12,2 milhões t) (USDA, 2014). Os principais países que importam milho do Brasil são Irã, Vietnã, Coréia do Sul e Egito (MDIC, 2014).

O estado de Santa Catarina é o oitavo maior produtor de milho do país. Na safra de 2013/14, a área plantada foi de 472 mil hectares, com uma produção de 3,4 milhões de toneladas e produtividade média de 7,2 t ha⁻¹, bem acima da média nacional (CONAB, 2014).

2.1.4 Variedades crioulas e a Agricultura familiar

Além das cultivares comerciais, as denominadas variedades crioulas, locais ou tradicionais, possuem elevada diversidade genética, são fontes de genes para o melhoramento e estão associadas a segurança alimentar. Elas são amplamente utilizadas como fonte alimentar das famílias nas mais diversas formas, além de serem empregadas na alimentação animal (COSTA et al., 2015; KIST et al., 2014; OGLIARI, KIST & CANCI, 2013).

O milho, além de ser uma importante *commodity*, guarda relações com aspectos socioculturais, pois representa a base da sustentabilidade para muitas famílias rurais (KIRINO, 2003). Segundo o último Censo Agropecuário (IBGE, 2006), 84% dos estabelecimentos brasileiros são de agricultura familiar, ocupam 24,3% da área cultivada e são responsáveis por 46% da produção de milho. Este sistema de produção também predomina no Estado de Santa Catarina, sendo que 88% dos estabelecimentos produtores de milho são de agricultura familiar, os quais são responsáveis por 76% da produção estadual (IBGE, 2006).

As propriedades de agricultura familiar, em geral, possuem baixo capital para investimentos, o que acaba excluindo o acesso desses produtores aos pacotes tecnológicos atuais, incluindo às sementes de cultivares híbridas de elevado potencial produtivo (KIST et al., 2010). Quando cultivam sementes híbridas, transgênicas ou convencionais, os

elevados patamares de produtividade obtidos em estações experimentais, nem sempre se reproduzem em condições reais de cultivo de limitada tecnologia (BOEF et al., 2007).

Garantir que essas famílias permaneçam na atividade agrícola é uma responsabilidade de cunho social e econômico. Para isso, programas de incentivo a estes agricultores têm sido de fundamental importância no país, principalmente no que se refere à preservação dos recursos genéticos, a fim de conservar variedades resistentes às condições edafoclimáticas adversas, tornando a produção sustentável sob o ponto de vista econômico, ambiental e social.

Nesse contexto, o cultivo de variedades de polinização aberta e variedades crioulas de elevado potencial genético pode ser boa alternativa para esses agroecossistemas adversos de cultivo, onde os recursos externos (fertilizantes, irrigação, mecanização e sementes) são escassos ou pouco acessados (KIST et al., 2010). O Oeste catarinense é uma região do país que reúne uma rica diversidade de variedades crioulas de várias espécies vegetais, que é conservada por agricultores familiares, destacando-se o milho.

A variedade crioula de milho de Anchieta-SC denominada *Rosado*, por exemplo, apresenta elevados teores de carotenoides funcionais, sobretudo de luteína (KUHNEN et al., 2012), destacando-se também como uma das variedades crioulas mais produtivas desse município, além de ser uma das mais antigas do Extremo Oeste de Santa Catarina (COSTA et al., 2015; COSTA, 2013). As particularidades dessa variedade e de outras já pesquisadas pela Universidade Federal de Santa Catarina colocam em destaque essa região do país como uma das áreas mais atraentes para o desenvolvimento de pesquisas focadas na conservação, caracterização e avaliação desses recursos genéticos locais ainda pouco conhecidos (COSTA et al., 2015; OGLIARI, KIST & CANCI, 2013).

No Extremo Oeste de Santa Catarina, o milho crioulo é comumente usado dentro da própria propriedade, como fonte de alimento de animais, na forma de silagem, forragem e de grãos; como fonte de alimento e medicamento para as famílias de agricultores e como matéria-prima essencial para o preparo de uma ampla gama de produtos (COSTA et al., 2015; OGLIARI, KIST & CANCI, 2013; KUHNEN et al., 2012; OGLIARI & ALVES, 2007). Os grãos são comumente transformados em farinha e canjica pelos moinhos gerenciados pelas associações locais de agricultores, ou ainda são consumidos na propriedade como pipoca e milho verde. A palha, o grão e a espiga são usados no artesanato, enquanto

os estiletos, estigmas e a pasta dos grãos são usados no preparo de medicamentos pelas agricultoras, geralmente organizadas por movimentos sociais ou grupos religiosos (COSTA et al., 2015; KIST et al., 2014; OGLIARI, COSTA, 2013; KIST & CANCI, 2013; KIST et al., 2010).

Alguns estudos do NEABio têm mostrado uma importante diversidade de populações de milho crioulo mantidas *in situ - on farm* por agricultores familiares na região Oeste do estado de Santa Catarina (COSTA et al., 2015; COSTA, 2013; OGLIARI, KIST & CANCI, 2013; KUHNEN et al., 2012; KUHNEN et al., 2011). A conservação *in situ - on farm* assume papel essencial na manutenção da diversidade dos recursos genéticos no campo, uma vez que permite a dinâmica dos processos evolutivos, promovendo o desenvolvimento adaptativo das espécies quanto às variações climáticas ocorridas ao longo do tempo. A conservação *in situ - on farm* permite a geração contínua de novos recursos genéticos via evolução em seu meio natural e a domesticação em seu meio social (CLEMENT et al., 2007).

2.2 O milho transgênico

2.2.1 Cenário dos transgênicos

Os organismos transgênicos são aqueles em que foi feita a transferência intencional de genes entre organismos de espécies diferentes. O termo organismo geneticamente modificado (OGM) também é utilizado para referir-se a esse processo de transformação e inclusive é utilizado na legislação brasileira pela Lei de Biossegurança nº 11.105, de 24 de Março de 2005. Porém, um OGM pode ser o resultado de outros processos que ocasionaram uma modificação no genoma como, por exemplo, as mutações (ISAAA, 2014 a). Já o termo transgênico é utilizado para designar organismos que foram submetidos a técnicas de engenharia genética para inserção de uma parte do genoma de outra espécie em seu genoma (ISAAA, 2014 a). Mesmo assim, as siglas OGM ou GM ainda são utilizadas na literatura científica para designar organismos transgênicos.

O desenvolvimento das plantas transgênicas tem como objetivo principal a obtenção de cultivares com determinada característica agrônômica, através de engenharia genética, ao invés do melhoramento clássico de plantas. As principais características inseridas nas plantas transgênicas referem-se à resistência a insetos herbívoros, resistência a

doenças, tolerância a estresse abiótico, resistência a aplicação de herbicidas, características nutricionais, entre outros (ISAAA, 2014 b).

A área cultivada com plantas transgênicas no mundo foi estimada em 175 milhões de hectares no ano de 2013. O Brasil está em segundo lugar em relação à área plantada, com 42,2 milhões de hectares (ha), somando áreas de soja, milho e algodão. Em primeiro lugar estão os Estados Unidos, com 70 milhões de ha e em terceiro está a Argentina com 24,4 milhões de ha (JAMES, 2013). Do total de lavouras transgênicas no Brasil, 430 mil ha foram cultivados com milho transgênico no estado de Santa Catarina, o que representou em torno de 90% da produção total de milho nesse estado (CÉLERES, 2014).

Atualmente, o Brasil possui 39 eventos transgênicos aprovados pela CTNBio – Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, a qual foi designada pela Lei de Biossegurança (11.105/05) como órgão avaliador de qualquer OGM e seus derivados. As plantas transgênicas compreendem o feijão, com um evento, a soja, com cinco eventos, o algodão, com 12 eventos, e o milho com 21 eventos transgênicos liberados. O número de eventos é elevado pois existem muitas variações das proteínas cry (confere resistência a insetos) e também porque a combinação de dois ou mais eventos já existentes, inseridos na mesma planta, é classificado como um novo evento (CTNBio, 2014).

No caso da soja RR geneticamente modificada para apresentar resistência o herbicida glifosato (Roundup Ready), o uso da tecnologia está associado a maior produtividade da cultura e a ganhos na balança comercial do país, visto que a soja produzida é essencialmente destinada à exportação (CONAB, 2014). Porém, alguns estudos verificaram que a aplicação de elevadas doses do herbicida glifosato causa alterações no balanço nutricional da soja, diminuição do aproveitamento da água e diminuição da nodulação da soja por rizóbio, o que aumentaria os custos de produção (ZOBIOLE et al, 2010; REDDY & ZABLOTOWICZ, 2003). Todavia, é necessário realizar avaliações holísticas em relação ao uso das plantas transgênicas de forma a observar seus efeitos positivos e/ou negativos sobre a cultura, o ambiente e à sociedade.

A avaliação de segurança de alimentos/plantas transgênicas baseia-se no conceito da "equivalência substancial", ou seja, "se um alimento novo é substancialmente equivalente em composição e características nutricionais, ele pode ser considerado tão seguro quanto o alimento convencional" (SOT, 2003). Porém, esse conceito não responde a todas as questões referentes à segurança das plantas transgênicas e assim está em desacordo com o "Princípio da Precaução" (Cartagena Protocol,

2000) e com o “Direito dos Agricultores” (Tratado da FAO, 2002), visto que o Brasil é signatário desses acordos. Além disso, o Decreto nº 4.680/03 (BRASIL, 2003) regulamenta o direito à informação, assegurado pela Lei nº 8.078/90, quanto aos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou que sejam produzidos a partir de organismos que contêm transgenia.

O “Princípio da Precaução” em seu artigo 11, afirma que *"a ausência de certeza científica devido à insuficiência das informações e dos conhecimentos científicos relevantes sobre a dimensão dos efeitos adversos potenciais de um organismo vivo modificado na conservação e no uso sustentável da diversidade biológica na Parte importadora, levando também em conta os riscos para a saúde humana, não impedirá esta Parte, a fim de evitar ou minimizar esses efeitos adversos potenciais, de tomar uma decisão, conforme o caso, sobre a importação do organismo vivo modificado"*(Cartagena Protocol, 2000).

Dessa forma, além das incertezas científicas, a liberação das plantas transgênicas entra em conflito com a legislação nacional e assim esse é mais um motivo para que as pesquisas sejam mais abrangentes, a fim de assegurar o oferecimento de alimentos seguros para o consumo humano e animal.

2.2.2 Os transgênicos Herculex I e Roundup Ready

A tecnologia Herculex I, referente ao evento TC1507, desenvolvido pela Dow AgroSciences, está presente na cultivar BG7060H. A cultivar BG7060HR, além de possuir o evento TC1507, também possui o evento NK603, tecnologia Roundup Ready, também desenvolvido pela Dow AgroSciences. As cultivares híbridas BG7060H e BG7060HR, bem como sua versão isogênica não geneticamente modificada (BG7060), foram todas desenvolvidas pela Biogene-Pioneer e são alvo de estudo desse projeto.

O evento TC1507 apresenta características que conferem resistência a insetos da ordem Lepidóptera e tolerância ao herbicida glufosinato de amônio (Figura 1). Essas características advêm dos genes introduzidos que codificam uma forma truncada da proteína inseticida Cry1F, derivada da cepa PS81I (NRRL B-18484) da bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* e a enzima fosfotricina-N-acetil transferase (PAT), que confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio, também obtida de um microrganismo do solo, *Streptomyces viridochromogenes* (AGBIOS, 2008). Uma sequência do promotor P35S do CaMV (isolado Cabb-s) e a sequência intrônica IVS2 de 178 pb do

gene *adhS1* de milho foram utilizadas para promover e potencializar a transcrição do gene *pat* (FORLANI et al., 2006).

A proteína Cry1F é produzida sob a forma de protoxina e transformada em peptídeos tóxicos no intestino do inseto pela ação do pH alcalino intestinal e de proteases. A toxina ativa causa lise das células epiteliais e a morte das larvas (MONNERAT & BRAVO, 2000).

A enzima PAT confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio. Este herbicida é um tripeptídeo composto por dois resíduos de L-alanina e um resíduo de fosfotricina (PPT), um análogo do glutamato. O PPT é um inibidor da glutamina sintetase (GS), enzima que converte glutamato em glutamina e remove a amônia tóxica da célula. A inibição da enzima GS causa a morte da planta, devido ao efeito fitotóxico do acúmulo de amônia e ruptura dos cloroplastos inibindo a fotossíntese (LINDSEY, 1992). A enzima fosfotricina-N-acetiltransferase (PAT) realiza uma detoxificação, pois é promotora da acetilação do PPT, utilizando como co-fator acetil-coenzima 'a', fazendo com que o PPT perca a ação inibidora permitindo que as células sobrevivam mesmo em presença do herbicida.



Figura 1. Esquema do inserto para o milho transgênico Herculex I (TC1507). Gene inserido: *cry1F* e *pat*, promotor *ubiZM* (oriundo do milho) e P35S, terminador: T35S (Adaptado de TAKABATAKE, et al., 2010).

O evento NK603 contém o gene *cp4 epsps* (Figura 2), que é oriundo da bactéria *Agrobacterium* sp. cepa CP4 e é responsável pela expressão da proteína CP4-EPSPS (CP4-5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase), que determina a expressão da característica de tolerância ao herbicida glifosato. A proteína CP4-EPSPS, expressa nas plantas geneticamente modificadas tolerantes ao glifosato, é funcionalmente idêntica à proteína EPSPS endógena de plantas (PADGETTE et al., 1993). Em plantas convencionais o herbicida glifosato se liga à enzima EPSPS e bloqueia a biossíntese do 5-hidroxisilchiquimato-3-fosfato, impedindo a formação de aminoácidos aromáticos e metabólitos

secundários (HASLAM, 1997). Nas plantas geneticamente modificadas tolerantes ao glifosato, como o milho NK603, os aminoácidos aromáticos e outros metabólitos necessários para o desenvolvimento das plantas continuam sendo produzidos pela atividade da proteína CP4-EPSPS (BORÉM, 2005; STEINRÜCKEN & AMRHEIN, 1980).

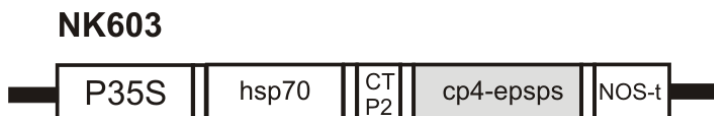


Figura 2. Esquema do inserto para o milho transgênico, evento NK603 Roundup Ready. Promotor: P35S, terminador: NOS-t. (Adaptado de TAKABATAKE, et al., 2010).

2.3 A coexistência entre as variedades crioulas e híbridos de milho transgênico

A coexistência significa a possibilidade efetiva, para os agricultores, de escolher entre o modo de produção convencional ou de culturas transgênicas. Portanto, coexistência é o termo usado para as medidas adotadas a fim de separar produtos transgênicos de não transgênicos. O objetivo das normas de coexistência deve ser a preservação da agricultura e da alimentação livre de transgênicos, reconhecendo o direito dos agricultores de cultivar tais produtos e dos consumidores de escolher alimentos sem contaminação por organismos geneticamente modificados (FERMENT et al., 2009).

No Brasil, desde 2003, são cultivados legalmente OGMs em escala comercial. Porém, ainda não foram adotadas medidas que de fato permitissem e assegurassem a coexistência das variedades transgênicas com os cultivos convencionais, agroecológicos e orgânicos.

As normas de coexistência devem estar baseadas no Princípio da Precaução, assegurado pela Lei de Biossegurança, nº 11.105/2005, Art. 1º e pelo Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança. Enquanto a comunidade científica encontra-se, todavia, claramente dividida com relação aos riscos das plantas geneticamente modificadas para a saúde e para o meio ambiente, cada país deve dotar-se de meios para manter alternativas sólidas de cultivo e consumo (FERMENT et al., 2009).

A contaminação de sementes e de lavouras não transgênicas pode ocorrer por vias biológicas (pólen e dispersão de sementes) ou físicas (mistura de sementes em máquinas, caminhões, vagões e troca de

sementes entre agricultores). Se por um lado a pesquisa ainda não esclareceu quais as reais consequências da contaminação de sementes ou plantas nativas por transgênicos, por outro, deve-se admitir que a questão atinge diretamente o direito dos produtores e dos consumidores. Sabe-se que uma determinada raça de milho pode ter de 200 a 1.000 diferentes variedades e que cada uma representa um sistema de adaptação distinto e arranjos gênicos completamente diferentes. Por essa razão é que se torna impossível recuperar uma determinada variedade local simplesmente recorrendo aos bancos de germoplasma (QUIST, 2009).

A norma de coexistência diz que: *“Para permitir a coexistência, a distância entre uma lavoura comercial de milho geneticamente modificado e outra de milho não geneticamente modificado, localizada em área vizinha, deve ser igual ou superior a 100 (cem) metros ou, alternativamente, 20 (vinte) metros, desde que acrescida de bordadura com, no mínimo, 10 (dez) fileiras de plantas de milho convencional de porte e ciclo vegetativo similar ao milho geneticamente modificado”* - Resolução Normativa Nº 4, de 16 de agosto de 2007 (BRASIL, 2007).

Porém, essas distâncias têm sido questionadas. Estudos demonstraram que o pólen de milho transgênico é capaz de fecundar outras plantas de milho a distância de 66 metros (LANGHOF et al., 2008). Também foi detectado fluxo gênico de milho transgênico sobre milho convencional a uma distância de 250 m (GOGGI et al., 2006). Mesmo que as taxas de cruzamento detectadas sejam baixas, até 4% (BANNERT & STAMP, 2007), em um hectare, com densidade de 50.000 plantas, em torno de 2 mil plantas seriam contaminadas por geração, o que ao longo de vários anos de cultivo pode aumentar proporcionalmente a quantidade de plantas convencionais que receberiam pólen contendo transgenes.

O risco da introgressão de transgenes é tão elevado que mesmo no México, onde é proibido o cultivo de milho transgênico, estudos constataram a presença de transgenes em variedades crioulas (EZCURRA, ORTIZ & SOBERON-MAINERO, 2002; QUIST & CHAPELA, 2001). Na África do Sul, onde o cultivo de plantas transgênicas é liberado desde 1997, foi recentemente constatado a presença de eventos transgênicos em variedades de milho crioulo. Nesses estudos, destacou-se a importância de avaliar o fluxo gênico em comunidades de agricultores familiares, as quais, assim como o caso do município de Anchieta-SC, são pequenas propriedades. Nessas propriedades o tipo de manejo exercido torna impeditiva a coexistência entre milhos transgênicos e crioulos, de forma a cumprir a legislação de

biossegurança do país (IVERSEN et al., 2014; JACOBSON & MYHR, 2012).

Dessa forma, pode-se inferir que a contaminação de variedades crioulas ou convencionais por pólen de milho transgênico pode ocorrer com certa facilidade e, portanto, ressalta-se a importância do presente estudo, que avaliou alguns efeitos que essa contaminação pode trazer ao milho crioulo. Ainda são resultados iniciais, mas já deixam a dúvida de que se um dia a ciência constatar efeitos maléficos ao ecossistema, que justifiquem retirar os transgênicos do mercado, talvez isso não seja mais possível, visto que os transgenes estão se espalhando de forma não prevista.

2.4 Efeitos dos transgênicos sobre organismos não alvo: os microrganismos endofíticos

2.4.1 Interação de organismos endofíticos com as plantas

Microrganismos endofíticos já foram isolados de todas as espécies de plantas até então analisadas (SANDBERG, BATTISTA & ARNOLD, 2014; ARNOLD, 2007; ROSENBLUETH & MARTINEZ-ROMERO, 2006). Devido à íntima associação entre os endófitos e espécies vegetais, tem sido sugerido que estes microrganismos co-evoluíram com os seus simbiotes (MISAGHI & DONNDELINGER, 1990). Muitos estudos têm sido feitos em relação ao uso de microrganismos endofíticos como agentes de controle biológico de inúmeras doenças e pragas de plantas (AZEVEDO et al., 2000; HALLMANN et al., 1997; M'PIGA et al., 1997) e também como promotores de crescimento vegetal (BENT & CHANWAY, 1998; HALLMANN et al., 1997).

Os microrganismos endofíticos compreendem, principalmente, fungos e bactérias que habitam o interior das plantas, sem causar, aparentemente, danos aos seus hospedeiros (PETRINI, 1991). A sua capacidade de biocontrole pode advir de vários mecanismos, tais como a produção de substâncias deletérias aos fitopatógenos (M'PIGA et al., 1997) ou por competição por espaço e nutrientes. Também atuam indiretamente, pela produção de substâncias promotoras de crescimento (VARMA et al., 1999) ou pela indução de resistência sistêmica nas plantas (Van LOON et al., 1998). Além disso, um estudo recente mostrou que, quando colonizadas com fungos endofíticos, plantas de arroz apresentaram melhor adaptação a condições de estresse hídrico, ao frio e à alta salinidade (REDMAN et al., 2011).

Devido a essas interações, os microrganismos endofíticos têm sido utilizados para avaliar os efeitos de transgenes sobre organismos associadas às plantas, ditas como organismos não-alvo (CHEEKE, ROSENSTIEL & CRUZAN, 2012; ANDREOTE et al., 2009 a, b; ANDREOTE et al., 2008). Porém, grande parte dos trabalhos restringem-se a avaliação dos microrganismos da rizosfera e aos fungos micorrízicos arbusculares (FMA).

Avaliando a diversidade de FMA no solo por TRFLP e sequenciamento, Zeng et al. (2014) concluíram que após o cultivo de milho *Bt* (transgene cry - inseticida) durante cinco safras seguidas, não houve impactos significativos sobre a comunidade de FMA. Em outro estudo, Cheeke et al. (2012) avaliaram nove híbridos contendo o transgene *Bt* e quando comparados com as suas isogênicas convencionais, os milhos transgênicos apresentaram taxa de colonização por FMA 10% menor. No entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

A estrutura de comunidade de bactérias presentes na rizosfera de plantas de tabaco foi avaliada através de PCR-DGGE. Nessas condições, observou-se que houve diferença entre as plantas transgênicas e não-transgênicas, no período vegetativo, porém no estágio de floração não houve diferenças, sugerindo que a comunidade bacteriana sofreu modificações e depois se reestabeleceu (ANDREOTE et al., 2008). Esse grupo de pesquisa também avaliou a comunidade de bactérias na rizosfera de plantas de eucalipto transgênico em comparação com as isogênicas convencionais e verificou poucas variações significativas (ANDREOTE et al., 2009 a, b).

A comunidade microbiana da rizosfera é fortemente influenciada pelos exsudatos das plantas, mas também pela composição da microbiota do solo e talvez esse fator não permita que as diferenças entre plantas com e sem transgenia sejam observadas facilmente. Alternativamente, endofíticos associados às folhas podem ser avaliados como organismos não-alvo, pois são mais intimamente relacionados com as plantas hospedeiras e ainda são pouco conhecidos quanto a sua diversidade e variação em resposta ao genótipo e ao estágio fenológico das plantas (PEÑUELAS & TERRADAS, 2014).

2.4.2 PCR-DGGE para avaliação da comunidade de endofíticos

Muitos estudos sobre fungos e bactérias endofíticos referem-se aos cultiváveis, pois há o interesse em bioprospecção desses microrganismos, como por exemplo, os que conferem às plantas resistência a estresses

bióticos e abióticos (REDMAN et al., 2002; DEVARAJAN & SURYANARAYANAN, 2006; AZEVEDO & ARAÚJO, 2007; REDMAN et al., 2011), bem como aqueles responsáveis pela produção de compostos bioquímicos medicinais (MILLER et al., 2012; YUAN, CHEN & YANG, 2009; HUANG et al., 2008).

Porém, estudos para avaliar a dinâmica e os impactos sobre a diversidade total de microrganismos devem priorizar as técnicas independentes de cultivo, como PCR-DGGE, T-RFLP, Sequenciamento de biblioteca de clones, Sequenciamento de Nova Geração (NGS) (MiSeq-Illumina, Pirosequenciamento, Ion Torrent etc), a fim de acessar a diversidade total, pois estima-se que grande parte dos microrganismos ainda não seja passível de cultivo (TYSON & BANFIELD, 2005).

No presente estudo, a avaliação da estrutura da comunidade dos endofíticos foi realizada por PCR-DGGE. A PCR-DGGE foi introduzida nos estudos de ecologia microbiana por Muyzer et al. (1993) e, desde então, tem sido utilizada para avaliação de comunidades microbianas em diferentes tipos de amostras (LI et al., 2014; SILVA, VIDAL-TORRADO & LAMBAIS, 2014; PEARCE, 2007; SEKIGUCHI et al., 2001; WATANABE, KODAMA & HARAYAMA, 2001; ØVREÅS et al., 1997). Essa técnica apresenta elevada resolução, na qual um grande número de amostras pode ser rapidamente comparado, revelando a dinâmica de comunidades endofíticas.

A técnica de DGGE pode ser classificada como de *fingerprinting*, pois permite a avaliação da estrutura de comunidades microbianas, enquanto que a diversidade total é avaliada por técnicas de maior acurácia, como o sequenciamento (VALÁŠKOVÁ & BALDRIAN, 2009). A DGGE pode ser indicada para a comparação de muitas amostras e, após o agrupamento, permite selecionar um grupo menor de amostras para o sequenciamento, visto que esta última tem um custo mais elevado. A técnica de DGGE consiste basicamente na separação de fragmentos de DNA de tamanhos similares, amplificados com primers universais, com base na diferença de composição de sequências (quantidade de nucleotídeos citosina e guanina), em um gel de poliacrilamida com gradiente de desnaturação.

A técnica de PCR-DGGE tem sido amplamente empregada no estudo das comunidades de microrganismos endofíticos. Foi avaliado bactérias e fungos endofíticos nas raízes de plantas de milho sob diferentes condições de manejo, com o uso de herbicidas e adubos durante o cultivo (SEGHERS et al., 2004); em plantas de soja, onde aplicou-se herbicida no solo, foram caracterizadas bactérias endofíticas

(KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2005); em raízes de batatas convencional e transgênica avaliou-se os fungos endofíticos (GÖTZ et al., 2006); em sementes de arroz foi avaliado a dinâmica das bactérias endofíticas (HARDOIM et al., 2012); em plantas de arroz crioulo comparou-se bactérias diazotróficas endofíticas e epifíticas (RANGJAROEN et al., 2014); e avaliou-se a comunidade de bactérias, fungos e arqueias endofíticas em raízes de milho transgênico e convencional (SILVA et al., 2014).

Assim, essa técnica foi escolhida para a avaliação da estrutura de comunidade de bactérias e fungos endofíticos associados aos diferentes genótipos de milho.

REFERÊNCIAS

- AGAPITO-TENFEN, S.Z.; Guerra, M.P.; Wikmark, O.G.; Nodari, R.O. Comparative proteomic analysis of genetically modified maize grown under different agroecosystems conditions in Brazil. **Proteome Science**, v.11, p.1-15, 2013.
- AGBIOS. **Information on GM Approved Products (2008)**. Disponível em: <<http://www.agbios.com/dbase.php>>. Acesso em: 2 Mai. 2014.
- AMBARDAR, S.; SANGWAN, N; MANJULA, A.; RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN. P.; LAL, R.; VAKHLU, J. Identification of bacteria associated with underground parts of *Crocus sativus* by 16S rRNA gene targeted metagenomic approach. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2014.
- AMOS, B; WALTERS, D.T. Maize root biomass and net rhizodeposited carbon: an analysis of the literature. **Soil Science Society American Journal**, Madison, v. 70, p. 1489–1503, 2006.
- ANDREOTE, F.D.; ROCHA, U.N.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L.; OVERBEEK, L.S. Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). **Antonie van Leeuwenhoek**, v.97, p.389-399, 2010.
- ANDREOTE FD, ROSSETTO PB, MENDES R, AVILA LA, LABATE CA, PIZZIRANI-KLEINER AA, AZEVEDO JL, ARAUJO WL. Bacterial community in the rhizosphere and rhizoplane of wild type and transgenic eucalyptus. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.25, p. 1065–1073, 2009a.
- ANDREOTE FD, CARNEIRO RT, SALLES JF, MARCON J, LABATE CA, AZEVEDO JL, ARAUJO WL. Culture-independent assessment of Alphaproteobacteria related to order Rhizobiales and the diversity of cultivated *Methylobacterium* in the rhizosphere and rhizoplane of transgenic eucalyptus. **Microbial Ecology**, v.57, p.82–93, 2009b.
- ANDREOTE FD, MENDES R, DINI-ANDREOTE F, ROSSETTO PB, LABATE CA, PIZZIRANI-KLEINER CA, van ELSAS JD, AZEVEDO JL, ARAUJO WL. Transgenic tobacco revealing altered bacterial diversity in the rhizosphere during early plant development. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.93, p.415–424, 2008.
- ARAUJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI Jr., W.; van ELSAS, J.D.; van VUURDE, J.W.L.; AZEVEDO, J.L. Diversity of Endophytic Bacterial Populations and Their Interaction with *Xylella*

- fastidiosa* in Citrus Plants. **Applied And Environmental Microbiology**, v.68, p. 4906–4914, 2002.
- ARNOLD, A.E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, v.21, p.51–66, 2007.
- AZEVEDO, J.L. & ARAÚJO, W.L. Endophytic fungi of tropical plants: diversity and biotechnological aspects. In: Ganguli BN, Deshmukh SK, editors. **Fungi: multifacetated microbes**. New Delhi (India): Anamaya Publishers. p. 189–207. 2007.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, Jr., W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, 2000 [online]. Acesso em 11 Jul. 2014. Disponível em: <<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol3/issue1/full/4/reprint.html>>.
- BANNERT, M. & STAMP, P. Cross-pollination of maize at long distance. **European Journal of Agronomy**, v.27, p.44-51, 2007.
- BENT, E.; CHANWAY, C.P. The growth-promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.44, p.980-988, 1998.
- BOEF, W. S; THIJSEN, M.; OGLIARI, J.B.; STHAPIT, B. **Biodiversidade e Agricultura: fortalecendo o manejo comunitário**. 1. ed. Porto Alegre: L&PM, 2007. v. 1. 271p.
- BORÉM, A. Variedades transgênicas e meio ambiente. **Biociência e Desenvolvimento**, n. 34, p. 91-99, 2005.
- BRASIL, 2007. MCT - Comissão técnica nacional de biossegurança. **Resolução Normativa nº 4, de 16/08/2007**, 2007. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/4687.html>>. Acesso em 12 Mar. 2012.
- BRASIL, 2003. Presidência da República, Casa Civil. **DECRETO Nº 4.680, DE 24 DE ABRIL DE 2003**. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2003/d4680.htm. Acesso em: 12 Mar. 2012.
- CARTAGENA PROTOCOL. **Cartagena Protocol on biosafety to the convention on biological diversity, 2000**. Disponível em <http://bch.cbd.int/protocol>. Acesso em: 8 Jun. 2012.

- CÉLERES. **Informativo biotecnologia**. Safra 2014/2015. Disponível em: < <http://www.celeres.com.br/wordpress/wp-content/uploads/2014/12/IB1403.pdf>>. Acesso em: 11 Jan. 2015.
- CHEEKE, T.E.; ROSENSTIEL, T.N.; M.B. CRUZAN. Evidence of reduced arbuscular mycorrhizal fungal Colonization in multiple lines of *Bt* maize. **American Journal of Botany**, v.99, p.700–707, 2012.
- CLEMENT, C. R.; ROCHA, S. F. R; COLE, D. M. VIVIAN, J. L. Conservação on farm. In: NASS, L. L. **Recursos genéticos Vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. v.1, Sexto Levantamento 2013/2014. P.1-83. Brasília, 2014.
- COSTA, F. M.; SILVA, N.C.A.; OGLIARI, J.B. Corn diversity in Southern Brazil: indication of a microcenter of *Zea mays* L. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 2015. (*em revisão*).
- COSTA, F. M. Diversidade genética e distribuição geográfica: uma abordagem para a conservação *on farm* e *ex situ* e o uso sustentável dos recursos genéticos de milho do Oeste de Santa Catarina. **Dissertação**. Recursos Genéticos Vegetais. UFSC. 2013.
- CTNBio – Comissão Técnica Nacional De Biossegurança - **Tabela Geral de Plantas Geneticamente Modificadas Aprovadas Comercialmente – 2014**. Disponível em: <http://www.ctnbio.gov.br/upd_blob/0001/1873.pdf>. Acesso em 13 Nov. 2014.
- DEVARAJAN, P.T.; SURYANARAYANAN, T.S. Evidence for the role of phytophagous insects in dispersal of non-grass fungal endophytes. **Fungal Diversity**, v.23, p.111-119, 2006.
- DIAS, A. C. F.; DINI-ANDREOTE, F.; TAKETANI, R.G.; TSAI, S. M.; AZEVEDO, J. L.; MELO, I.S.; ANDREOTE, F.D. Archaeal communities in the sediments of three contrasting mangroves. **Journal Soils Sediments**, v.11, p.1466–1476, 2011.
- EK-RAMOS, M.J.; ZHOU, W.; VALENCIA, C.U.; ANTWI, J.B.; KALNS, L.L.; MORGAN, G.D. et al. Spatial and Temporal Variation in Fungal Endophyte Communities Isolated from Cultivated Cotton (*Gossypium hirsutum*). **PLoS ONE**, v.8, 2013.
- EZCURRA, E.; ORTIZ, S.; SOBERON-MAINERO, J. Evidence of gene flow from transgenic maize to local varieties in Mexico. **Lmos and the environment: An international conference**. 2002.

- FAO. **International Year of Family Farming (IYFF)**. Disponível em: <<http://www.fao.org/family-farming-2014/en/>> Acesso em: 10 Nov. 2014.
- FAO. **FAO Statistical yearbook**. Roma. 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e.PDF>>. Acesso em: 14 Jun 2014.
- FAOSTAT. (2012). **Statistical databases and data-sets of the Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/E>>. Acessado em: jul. 2012.
- FERMENT, G.; ZANONI, M.; BRACK, P.; KAGEYAMA, P.; NODARI, R.O. **Coexistência: o caso do Milho**. Brasília, MDA. 2009. 56 p.
- FORLANI, G.; OBOJSKA, A.; BERLICKI, Ł.; KAFARSKI, P. Phosphinothricin analogues as inhibitors of plant glutamine synthetases. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p. 796-802, 2006.
- GALINAT, W.C. Evolution of corn. In: SPARKS, D.L. **Advances in agronomy**. London: Academic Press, 1992. 403p.
- GOGGI, A.S.; CARAGEA, P.; LOPEZ-SANCHEZ, H.; WESTGATE, M.; ARRITT, R.; CLARK, C. Statistical analysis of outcrossing between adjacent maize grain production fields. **Field Crops Research**, v.99, p. 147-157, 2006.
- GÖTZ, M.; NIRENBERG, H.; KRAUSE, S.; WOLTERS, H.; DRAEGER, S.; BUCHNER, A.; LOTTMANN, J.; BERG, G.; SMALLA, K. Fungal endophytes in potato roots studied by traditional isolation and cultivation-independent DNA-based methods. **FEMS Microbiology Ecology**, v.58, p. 404-413, 2006.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.895-914, 1997.
- HARDOIM PR, HARDOIM CCP, van OVERBEEK LS, van ELSAS JD. Dynamics of Seed-Borne Rice Endophytes on Early Plant Growth Stages. **PLoS ONE**, v.7, e3038, 2012.
- HARLAN, J.R. Crops and man, 2nd ed. Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy. **Crop Science Society of America**. 284p, 1992.
- HASLAM, E. **Shikimic acid: metabolism and metabolites**. 1ed. University of Sheffield, UK. Chichester: New York; Wiley, 1997. 387p.

- HUANG, W.Y.; CAI, Y.Z.; HYDE, K.D.; CORKE, H.; SUN, M. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. **Fungal Diversity**, v.22, p.61-75, 2008.
- IBGE. **Censo Agropecuário 2006**. Rio de Janeiro, pag. 1-267. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/agri_familiar_2006/familia_censoagro2006.pdf>. Acesso em: 05 de Out. 2014.
- ISAAA a - International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. Brief, n. 1: **Q and A About Genetically Modified Crops**. ISAAA: Ithaca, NY. Disponível em: <<http://isaaa.org/resources/publications/pocketk/1/default.asp>> Acesso em 12 Nov. 2014.
- ISAAA b - International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. Brief, n. 17: **Genetic Engineering and GM Crops**. ISAAA: Ithaca, NY. Disponível em: <<http://isaaa.org/resources/publications/pocketk/17/default.asp>> Acesso em: 12 Nov. 2014.
- IVERSEN, M.; GRØNSBERG, I.M.; van den BERG, J.; FISCHER, K.; AHETO, D.W.; BØHN, T. Detection of Transgenes in Local Maize Varieties of Small-Scale Farmers in Eastern Cape, South Africa. **PLoS ONE**, v. 9, e116147, 2014.
- JACOBSON, K.; MYHR, A.I. GM Crops and Smallholders: Biosafety and Local Practice. **Journal of Environment & Development**, v.22, p. 104-124, 2012.
- JAMES, C. & KRATTIGER, A.F. 1996. Global Review of the Field Testing and Commercialization of Transgenic Plants, 1986 to 1995: The First Decade of Crop Biotechnology. **ISAAA Briefs** No. 1. ISAAA: Ithaca, NY. pp. 31.
- JAMES, C. Global Status of **Commercialized Biotech/GM Crops: 2013**. ISAAA Brief, n. 46. ISAAA: Ithaca, NY.
- KIRINO, P. **Farmers and Food Security**. IFA – FAO Agriculture Conference: Rome - Italy, 2003. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 05 Jul. 2014.
- KIST, V.; ALBINO, V.S.; MARASCHIN, M.; OGLIARI, J.B. Genetic variability for carotenoid content of grains in a composite maize population. **Scientia Agricola**, v. 1, p. 480-487, 2014.
- KIST, V.; OGLIARI, J.B.; MIRANDA FILHO, J.B.; ALVES, A.C. Genetic potential of a maize population from Southern Brazil for the

- modified convergent divergent selection scheme. **Euphytica**, v. 176, p. 25-36, 2010.
- KUHNEN, S.; DIAS, P. F.; OGLIARI, J. B.; MARASCHIN, M. Brazilian Maize Landraces Silks as Source of Lutein: An Important Carotenoid in the Prevention of Age-Related Macular Degeneration. **Food and Nutrition Sciences**, v. 3, p. 1609-1614, 2012.
- KUHNEN, S.; LEMOS, P.M.M; CAMPESTRINI, L.H.; OGLIARI, J.B.; DIAS, P.F.; MARASCHIN, M. Carotenoid and anthocyanin contents of grains of Brazilian maize landraces. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 1548-1553, 2011.
- KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. **Plant and Soil**, v.273, p. 91-99, 2005.
- LANGHOF, M.; HOMMEL, B.; HÜSKEN, A.; SCHIEMANN, J.; WEHLING, P.; WILHELM, R.; RÜHL, G. Coexistence in Maize: Do Nonmaize Buffer Zones Reduce Gene Flow between Maize Fields? **Crop Science**, v.48, p. 306-316, 2008.
- LI, X.; RUI, J.; MAO, Y.; Yannarell, A.; MACKIE, R. Dynamics of the bacterial community structure in the rhizosphere of a maize cultivar. **Soil Biology and Biochemistry**, v.68, p.392-401, 2014.
- LINDSEY, K. Genetic manipulation of crop plants. **Journal of Biotechnology**, v.26, p.1-28, 1992.
- LOGARES, R.; SUNAGAWA, S.; SALAZAR, G.; CORNEJO-CASTILLO, F.M.; FERRERA, I.; SARMENTO, H. et al. Metagenomic 16S rDNA Illumina tags are a powerful alternative to amplicon sequencing to explore diversity and structure of microbial communities. **Environmental Microbiology**, v. 16, p. 2659-2671, 2014.
- M'PIGA, P.; BELANGER, R.R.; PAULITZ, T.C.; BENHAMOU, N. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 50, p. 301-320, 1997.
- MACHADO, C.T.T. & PATERNIANI, M.L.S. Origem, domesticação e difusão do milho. In: SOARES, A.C. et al. **Milho crioulo: conservação e uso da biodiversidade**. Rio de Janeiro: AS-PTA, 1998, 185p.

- MATSUOKA, Y.; VIGOUROUX, Y.; GOODMAN, M.M.; SANCHEZ, J.G.; BUCKLER, E.; DOEBLEY, J.. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States Of America**, v.99, p.6080–6084, 2002.
- MDIC – **Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior**. Disponível em: <<http://www.desenvolvimento.gov.br/sitio/>>. Acesso em 12 Nov. 2014.
- MILLER, K.I.; QING, C.; SZE, D.M.Y.; ROUFOGALIS, B.D; NEILAN, B.A. Culturable Endophytes of Medicinal Plants and the Genetic Basis for Their Bioactivity. **Microbial Ecology**, v.64, p.431–449, 2012.
- MISAGHI, I.J.; DONNDELINGER, C.R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopatology**, v.80, p.808-811, 1990.
- MONNERAT, R.G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.) 2000. **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 163-200. 2000.
- MUYZER, G., De WAAL, E.C., UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 59, p. 695– 700, 1993.
- OGLIARI, J.B.; KIST, V.; CANCI, A. **The participatory genetic enhancement of a local maize variety in Brazil**. In: de Boef WS, Subedi A, Peroni N, Thijssen M, O’Keeffe E (ed) Community biodiversity management, promoting resilience and the conservation of plant genetic resources, 1rd edn. Abingdon, Oxon, p. 265-71, 2013.
- OGLIARI, J.B. & ALVES, A.C. Manejo e uso de variedades de milho como estratégia de conservação em Anchieta. In: BOEF, W.S. de; THIJSSSEN, M.H.; OGLIARI, J.B.; STHAPIT, B.R. **Biodiversidade e agricultores: fortalecendo o manejo comunitário**. Porto Alegre, RS: L&PM, 2007. 271p.
- ØVREÅS, L., FORNEY, L., DAAE, F.L., TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3367-3373, 1997.
- PADGETTE, SR.; BARRY, G.F.; RE, D.B.; EICHHOLTZ, D.A.; WELDON, M.; KOLACZ, K.; KISHORE, G.M. Purification, cloning

- and characterization of a highly glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate- 3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp. strain CP4. **Monsanto Technical Report MSL 12738**, 1993.
- PATERNIANI, E.; CAMPOS, M.S. Melhoramento de milho. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. 817p.
- PEARCE, D. Bacterioplankton community structure in a maritime antarctic oligotrophic lake during a period of holomixis, as determined by denaturing gel electrophoresis (DGGE) and fluorescence in situ hybridization (FISH). **Microbial Ecology**, v.353, p. 153-164, 2007.
- PEÑUELAS, J.; TERRADAS, J. The foliar microbiome. **Trends in Plant Science**, v.19, p.278-280, 2014.
- PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S.S. **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer Verlag, 1991. P. 179-197.
- PINHEIRO, J.C.; MARQUES, C.R.; PINTO, G.; BOUGUERRA, S.; MENDO, S.; GOMES, N.C. et al. The performance of *Fraxinus angustifolia* as a helper for metal phytoremediation programs and its relation to the endophytic bacterial communities. **Geoderma**, 171–182, 2013.
- PIPERNO, D.R. & PEARSALL, D.M. **Origins of Agriculture in the Lowland Neotropics**. Asn Diego: Academic Press. 1998. 161 p.
- QUIST, D. Vertical (trans)gene flow: implications for crop diversity and wild relatives. In: Traavik, T. & Ching, L.L. **Biosafety First**. 2009. 612p.
- QUIST, D.; CHAPELA, I.H. Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oxaca, Mexico. **Nature**, v. 414, p. 541-543, 2001.
- RANGJAROEN, C.; RERKASEM, B.; TEAUMROONG, N.; SUNGTHONG, R.; LUMYONG, S. Comparative study of endophytic and endophytic diazotrophic bacterial communities across rice landraces grown in the highlands of northern Thailand. **Archives of Microbiology**, v. 196, p. 35–49, 2014.
- RASCHE, F.; VELVIS, H.; ZACHOW, C.; BERG, G.; VAN ELSAS, J.D.; SESSITSCH, A. Impact of transgenic potatoes expressing anti-bacterial agents on bacterial endophytes is comparable with the effects of plant genotype, soil type and pathogen infection. **Journal of Applied Ecology**, v.43, p.555- 556, 2006.

- REDDY, K.N.; ZABLOTOWICZ, R.M. Glyphosate-resistant soybean response to various salts of glyphosate accumulation in soybean nodules. **Weed Science**, v.51, p. 496-502, 2003.
- REDMAN, R.S.; KIM, Y.; WOODWARD, C.J.D.A.; GREER, C.; ESPINO, L.; DOTY, S.L.; RODRIGUEZ, R.J. Increased Fitness of Rice Plants to Abiotic Stress Via Habitat Adapted Symbiosis: A Strategy for Mitigating Impacts of Climate Change. **PLoS ONE**, v.6, n.7, 2011.
- REDMAN, R.S., SHEEHAN KB, STOUT TG, RODRIGUEZ RJ, HENSON JM. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. **Science**, v.298, p.1581, 2002.
- ROESCH, L.F.W.; FULTHORPE, R.R.; PEREIRA, A.B.; PEREIRA, C. K.; LEMOS, L.N.; BARBOSA, A.D.; SULEIMAN, A.K.A.; GERBER, A.L.; PEREIRA, M.G.; LOSS, A.; COSTA, E.M. Soil bacterial community abundance and diversity in ice-free areas of Keller Peninsula, Antarctica. **Applied Soil Ecology**, v.61, p.7– 15, 2012.
- ROSENBLUETH M; MARTINEZ-ROMERO E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.19, p.827–837, 2006.
- SANDBERG, D.C.; BATTISTA, L.J.; ARNOLD, A.E. Fungal Endophytes of Aquatic Macrophytes: Diverse Host-Generalists Characterized by Tissue Preferences and Geographic Structure. **Microbial Ecology**, v.67, p.735–747, 2014.
- SEGHERS, D.; WITTEBOLLE, L.; TOP, E.M.; VERSTRAETE, W.; SICILIANO, S.D. Impact of Agricultural Practices on the Zea mays L. Endophytic Community. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 1475–1482, 2004.
- SEKIGUCHI, H.; TOMIOKA, N.; NAKAHARA, T.; UCHIYAMA, H. A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. **Biotechnology Letters**, v.23, p.1205-1208, 2001.
- SÉRALINI, G.E.; CLAIR, E.; MESNAGE, R.; GRESS, S.; DEFARGE, N.; MALATESTA, M.; HENNEQUIN, D.; VENDÔMOIS, J.S. Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, p.4221-4231, 2012.
- SHIFERAW, B.; PRASANNA, B.M.; HELLIN, J.; BÄNZIGER, M. Crops that feed the world 6. Past successes and future challenges to

- the role played by maize in global food security. **Food Security**, v.3, p.307–327, 2011.
- SILVA, K. J.; VIDAL-TORRADO, P.; LAMBAIS, M.R. Bacterial and Archaeal Communities in Bleached Mottles of Tropical Podzols. **Microbial Ecology**, 2014.
- SILVA, D.; COTTA, S.; VOLLÚ, R.; JURELEVICIUS, D.; MARQUES, J.; MARRIEL, I.; SELDIN, L. Endophytic microbial community in two transgenic maize genotypes and in their near-isogenic non-transgenic maize genotype. **BMC Microbiology**, v. 24, 2014.
- SILVA, N.C.A.; COSTA, F.M; VIDAL, R.; OGLIARI, J.B. Riesgos de contaminación de maíz genéticamente modificado en maíces criollos conservados in stu-on farm en el oeste de santa catarina, sur del brasil. **IX Simposio Internacional de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe El Salvador**. p.55, 2013.
- SMALLEY, J. & BLAKE, M. Sweet Beginnings - Stalk Sugar and the Domestication of Maize. **Current Anthropology**, v.44, p.675-703, 2003.
- SOT (Society of Toxicology). The safety of genetically modified foods produced through biotechnology. **Toxicology Science**, v.71, p.2-8. 2003.
- STEINRÜCKEN, H.C.; AMRHEIN, N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5enolpyruvyl- shikimic acid-3-phosphate synthase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.94, p.1207-1212, 1980.
- TAKABATAKE, R. Evaluation of Quantitative PCR Methods for Genetically Modified Maize (MON863, NK603, TC1507 and T25). **Food Science Technology Research**, v. 16, p. 421 – 430, 2010.
- TRATADO DA FAO 2002. **International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture**. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0510e/i0510e.pdf>>. Acesso em: 05 Out. 2014.
- TRUTER, J.; Van HAMBURG, H.; Van Den BERG, J. Comparative Diversity of Arthropods on Bt Maize and Non-Bt Maize in two Different Cropping Systems in South Africa. **Environmental Entomology**, v. 43, p. 197-208, 2014.
- TYSON, G.W.; BANFIELD, J.F. Cultivating the uncultivated: a community genomics perspective. **Trends in Microbiology**, v.13, p. 411-415, 2005.
- USDA. United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service. **Corn Area, Yield, and Production**.

- Disponível em: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>. Acesso em: 17 Jun. 2014.
- VALÁŠKOVÁ, V.; BALDRIAN, P. Denaturing gradient gel electrophoresis as a fingerprinting method for the analysis of soil microbial communities. **Plant Soil**, v. 55, p. 413–423, 2009.
- Van LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M.; PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual review of Phytopathology**, v. 36, p. 453-483, 1998.
- VARMA, A.; VERMA, S.; SUDHA, S.N.; BUTEHORN, B.; FRANKEN, P. *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2741-2744, 1999.
- WATANABE, K.; KODAMA, Y.; HARAYAMA, S. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. **Journal of Microbiological Methods**, v.44, p.253–262, 2001.
- WILKES, G. Urgent notice to all maize researchers: disappearance and extinction of the last wild teosinte population is more than half completed. A modest proposal for teosinte evolution and conservation in situ: the Balsas, Guerrero, Mexico. **Maydica**, v. 52, p. 49-58. 2007.
- WILKES, G. **Corn, strange and marvelous: but is a definitive origin known?** In *Corn: Origin, History, Technology, and Production*. Edited by Smith CW, Betran J, Runge ECA. John Wiley & Sons, New Jersey; 2004.
- WOOD, D. & LENNÉ, J.M. The conservation of agrobiodiversity on-farm: questioning the emerging paradigm. **Biodiversity and Conservation**, n.6, p.109-129, 1997.
- YUAN, Z.L.; CHEN, Y.C.; YANG, Y. Diverse non-mycorrhizal fungal endophytes inhabiting an epiphytic, medicinal orchid (*Dendrobium nobile*): estimation and characterization. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.25, p.295–303, 2009.
- ZENG, H.; TAN, F.; ZHANG, Y.; FENG, Y.; SHU, Y.; WANG, J. Effects of cultivation and return of *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize on the diversity of the arbuscular mycorrhizal community in soils and roots of subsequently cultivated conventional maize. **Soil Biology and Biochemistry**, v.75, p.254-263, 2014.
- ZOBIOLE, L.H.S.; OLIVEIRA, R.S.; KREMER, R.J. et al. Effect of glyphosate on symbiotic N₂ fixation and nickel concentration in

glyphosate-resistant soybeans. **Applied Soil Ecology**, v.44, p.176-180, 2010.

ZVI, M.M.B.; SHKLARMAN, E.; MASCI, T.; KALEV, H.; DEBENER, T.; SHAFIR, S.; OVADIS, M.; VAINSTEIN, A. *PAPI* transcription factor enhances production of phenylpropanoid and terpenoid scent compounds in rose flowers. **New Phytologist**, v.195, 2012.

3 HIPÓTESES E OBJETIVOS

3.1 Hipóteses

Nesse trabalho foram avaliadas as seguintes hipóteses:

a. A estrutura de comunidade de microrganismos endofíticos das folhas de milho está intimamente relacionada à composição genética da planta, se população de milho crioulo ou cultivar híbrida com e sem transgenia.

b. Os endofíticos foliares ainda podem variar de acordo com o estágio fenológico das plantas de milho.

c. E o fluxo gênico de milho híbrido com e sem transgenia sobre uma variedade crioula, pode alterar a estrutura de comunidade de endofíticos do milho crioulo.

3.2 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da transgenia sobre a estrutura de comunidades de bactérias e fungos endofíticos associada às plantas de milho crioulo e de cultivares isogênicas com e sem transgenes.

3.2.1 Objetivos específicos

1. Confirmar a presença do evento transgênico nos híbridos geneticamente modificados (Hx e $Hxrr$), bem como certificar-se da ausência de transgenes na variedade local Rosado (RS) e no híbrido convencional sem transgenia (NGM);

2. Avaliar a estrutura das comunidades de bactérias e fungos endofíticos das folhas dos três híbridos isogênicos (NGM ; Hx e $Hxrr$) e da variedade crioula Rosado (RS), em diferentes estádios do desenvolvimento das plantas de milho.

3. Desenvolver populações com distintos *backgrounds* genéticos para simular diferentes percentuais de introgressão entre milhos

transgênicos (*Hx* e *Hxrr*) e sua versão isogênica não transgênica (*NGM*), sobre a variedade crioula Rosado (*RS*);

4. Avaliar os efeitos da introgressão de milhos híbridos sobre a estrutura de comunidade de fungos endofíticos associados à variedade crioula, comparando os híbridos transgênicos (*Hx* e *Hxrr*), o híbrido isogênico não transgênico (*NGM*), a variedade crioula Rosado (*RS*) e as populações desenvolvidas com diferentes *backgrounds* genéticos.

4 CAPÍTULO 1

Este manuscrito refere-se ao artigo submetido para publicação em revista científica.

Comunidades de microrganismos endofíticos em diferentes estádios do desenvolvimento de milho crioulo e híbridos isogênicos transgênico e convencional

NEABio - Núcleo de Estudos em Agrobiodiversidade, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Catarina, 88.034-001, Brasil.

RESUMO

A diversidade de microrganismos endofíticos pode sofrer alterações em função do genótipo da planta em que estão associados e também do seu estágio fenológico. Nesse estudo foi avaliada a estrutura das comunidades de bactérias e fungos endofíticos em quatro estádios fenológicos de desenvolvimento, dois vegetativos (V3, V4) e dois reprodutivos (R1 e R2), visando analisar os efeitos dos genótipos, transgênicos e variedade, a fim de definir o estágio mais adequado para a avaliação de tais efeitos sobre os endófitos das folhas do milho. As populações de milho avaliadas foram constituídas por uma variedade crioula denominada Rosado (*RS*) e três híbridos isogênicos, dos quais um deles era não geneticamente modificado (*NGM*), o segundo continha a transgenia Herculex (*Hx*) e o terceiro, a transgenia Herculex combinada com Roundup Ready (*Hxrr*). Cada população de milho foi plantada em parcelas individuais a campo, na mesma data, em local homogêneo, de onde foram coletadas as folhas de três plantas de cada tratamento. A avaliação das comunidades de bactérias e fungos endofíticos das folhas de milho foi feita pela análise de perfis de amplicons, gerados por PCR-DGGE, com primers específicos para os microrganismos avaliados. As análises de cluster e ANOSIM agruparam as bactérias endofíticas segundo o estágio fenológico do milho e não discriminaram as quatro populações no mesmo estágio. Entretanto, a estrutura de comunidade de fungos, diferiu em função dos genótipos. Os fungos do milho *RS* foram diferentes dos híbridos *NGM*, *Hx* e *Hxrr*, nos quatro estádios avaliados. Os estádios fenológicos vegetativos (V3 e V4) discriminaram os dois híbridos de milho transgênicos do convencional quanto à estrutura de comunidades de fungos endofíticos. Apenas no estágio R1 foi possível discriminar o transgênico portador de um evento (*Hx*) do transgênico portador de dois eventos (*Hxrr*). Entretanto, estudos complementares devem ser conduzidos para investigar se as mudanças da comunidade de fungos endofíticos do milho afetam o crescimento e o desenvolvimento das plantas, a absorção de água e nutrientes, bem como os mecanismos de defesa do milho frente aos fatores de estresses bióticos e abióticos do ambiente de cultivo.

Palavras-chave: PCR-DGGE; Recursos Genéticos; 16S/18S rDNA; *Zea mays* L.

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays*) é a terceira cultura alimentar mais importante no mundo como fonte direta ou indireta de energia e proteína para a alimentação humana e como cultivo de grande importância econômica e social (FAO, 2013; KIRINO, 2003). Além das cultivares comerciais, as variedades crioulas, locais ou tradicionais, são recursos genéticos valiosos, pelo fato de constituírem elevada diversidade genética, serem fontes de genes para os programas de melhoramento genético e por estarem frequentemente associadas à segurança alimentar de muitas populações rurais. Elas são amplamente utilizadas como fonte alimentar das famílias rurais, nas mais diversas formas de uso (farinha, milho-verde e milho-pipoca), além de serem empregadas na alimentação animal, na forma de silagem, forragem e ração (COSTA et al., 2015; KIST et al., 2014; OGLIARI, KIST & CANCI, 2013).

A variedade crioula de milho de Anchieta-SC denominada *Rosado*, por exemplo, apresenta elevados teores de carotenoides funcionais, sobretudo de luteína (KUHNNEN et al., 2012), destacando-se também como uma das variedades crioulas mais produtivas desse município (6,65 t ha⁻¹), além de ser uma das mais antigas do Extremo Oeste de SC (COSTA et al., 2015; OGLIARI, KIST & CANCI, 2013). As particularidades dessa variedade e de outras já pesquisadas pela Universidade Federal de Santa Catarina colocam em destaque essa região do país como uma das áreas mais atraentes para o desenvolvimento de pesquisas focadas na conservação, caracterização e avaliação desses recursos genéticos locais ainda pouco conhecidos (COSTA et al., 2015; OGLIARI, KIST & CANCI, 2013).

Por outro lado, nessa mesma região do país, as cultivares híbridas melhorados e comerciais de milho são as mais cultivadas, sobretudo os híbridos de milhos geneticamente modificados. A expansão das áreas cultivadas com híbridos transgênicos de milho tem apresentado um aumento exponencial em todo o mundo (JAMES, 2013) e também no Brasil (CÉLERES, 2014). Assim, torna-se essencial a avaliação dos impactos ecológicos e biológicos dessa biotecnologia, principalmente com relação à ameaça iminente sobre a agrobiodiversidade, em decorrência do risco de contaminação das variedades crioulas por fluxo gênico procedente das cultivares transgênicas.

Dentre as cultivares híbridas transgênicas recomendadas para a região Sul do Brasil estão aquelas portadoras dos eventos TC1507 e NK603. O evento TC1507 contém dois transgenes: cry1F e pat. O

transgene cry1F codifica uma delta-endotoxina (Cry1F) letal a insetos da ordem Lepidóptera, o transgene pat codifica a enzima fosfinotricina-N-acetil transferase (PAT), que confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio. O evento NK603 contém o transgene cp4 epsps, responsável pela expressão da proteína CP4-EPSPS, que confere tolerância ao herbicida Roundup Ready (AGBIOS, 2008). Esses eventos são cultivados amplamente no Brasil e em outros países, justificando a relevância de avaliá-los quanto aos seus efeitos sobre organismos não-alvo.

Muitos estudos têm avaliado os impactos das plantas transgênicas sobre organismos não-alvo, tais como as abelhas em flores de rosas modificadas para produção de antocianinas *PAPI* (ZVI et al., 2012), a macrofauna do solo em milho contendo o transgene cry1Ab (TRUTER, Van HAMBURG & van den BERG, 2014), os fungos micorrízicos em milho contendo o transgene cry1F (CHEEKE, ROSENSTIEL & CRUZAN, 2012), os microrganismos endofíticos em batata com transgenia para produção de compostos antibacterianos (RASCHE et al., 2006), os endofíticos de folha de cana-de-açúcar com transgenia para resistência a herbicida (STUART et al., 2010), e sobre fungos endofíticos de espécies arbóreas com transgenia de resistência a patógenos (MARTÍN et al., 2013).

Os microrganismos endofíticos compreendem, principalmente, fungos e bactérias que habitam o interior das plantas, sem causar danos aparentes aos seus hospedeiros (PETRINI, 1991). A importância da avaliação dos impactos dos transgênicos sobre microrganismos endofíticos deve-se essencialmente a estreita relação desenvolvida com as plantas associadas, promovendo benefícios sobre o crescimento de raízes, aumento da área foliar, incremento na absorção de nutrientes e água, bem como sobre mecanismos de defesa da planta a fatores bióticos (GANLEY et al., 2008; AZEVEDO et al., 2000; Van LOON et al., 1998) e de adaptação frente às condições abióticas de ambientes adversos (NAVEED et al., 2014; WORCHEL et al., 2013; REDMAN et al., 2011).

Devido a essas interações com as plantas, os endofíticos têm sido utilizados como organismo não alvo para avaliar os efeitos indiretos provocados pelos transgenes (CHEEKE, ROSENSTIEL & CRUZAN, 2012; ANDREOTE et al., 2009 a, b; ANDREOTE et al., 2008). Contudo, grande parte dos trabalhos avaliam os microrganismos da rizosfera e os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), que tem demonstrado baixa ou nenhuma influência decorrente do genótipo das plantas hospedeiras. Alternativamente, endofíticos associados às folhas poderiam ser

avaliados como organismos não-alvo, pois são ainda pouco conhecidos quanto à diversidade genética e à variação em resposta ao genótipo e estágio fenológico de plantas transgênicas (PENUELAS & TERRADAS, 2014).

Dessa forma, esse estudo buscou responder algumas questões fundamentais: (1) Quais microrganismos endofíticos sofrem mais alterações devido ao genótipo da planta, fungos ou bactérias? (2) A inserção de transgenes em milho pode acarretar mudanças nas comunidades de bactérias e fungos endofíticos? (3) A comunidade de endofíticos do milho crioulo é diferente daquela que habita as folhas das cultivares híbridas melhoradas? (4) Em qual (is) estágio (s) fenológico (s) da planta essas diferenças são mais evidentes?

A fim de responder essas questões foi avaliada a estrutura de comunidades de bactérias e fungos endofíticos das folhas, em quatro estágios fenológicos do desenvolvimento, dois vegetativos e dois reprodutivos, de uma variedade crioula de milho de Anchieta-SC e três híbridos isogênicos, dois transgênicos e um não transgênico.

MATERIAL e MÉTODOS

Material vegetal

Uma variedade de milho crioulo e três híbridos isogênicos, dois transgênicos e um não transgênico, constituíram os quatro tratamentos dessa pesquisa. A variedade crioula denominada Rosado (*RS*) foi cedida por um agricultor familiar do município de Anchieta, microrregião do Extremo Oeste do Estado de Santa Catarina (SC), Sul do Brasil, por intermédio da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI).

Os híbridos isogênicos pertencem à série Biogene BG7060®. O híbrido transgênico BG7060H (*Hx*) é portador da tecnologia *Herculex* I (evento TC1507) e o transgênico BG7060HR (*Hxrr*) é portador das tecnologias *Roundup Ready 2* (evento NK603) e *Herculex* I (evento TC1507). Como testemunha dos híbridos transgênicos, foi utilizada a versão do híbrido isogênico convencional, sem transgenes, BG7060 (*NGM*).

Ensaio a campo

Os quatro tratamentos foram semeados na Fazenda Experimental da Ressacada da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil (27° 41' 04.85" S; 48° 32' 43.04" O), na safra de 2012/2013. O solo é classificado como Neossolo Quartzarênico Hidromórfico Típico, de acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação dos Solos (EMBRAPA, 2006). Segundo a classificação climática de Köeppen, a Fazenda situa-se numa sub-região de clima subtropical constantemente úmido, sem estação seca e com verão quente. Durante o período das avaliações (64 dias), entre outubro e dezembro de 2012, a temperatura média foi de 24,2 °C, com mínima registrada de 14 °C e máxima de 38,4 °C, o total de chuvas acumulado no período foi de 175,6 mm (APÊNDICE D) (Fonte: estação meteorológica EPAGRI/CIRAM).

Os tratamentos foram implantados em sistema de parcelas únicas. Cada parcela continha quatro fileiras de cinco metros de comprimento cada, espaçadas um metro entre si (ver croqui em APÊNDICE C). A parte interna da fileira central constituiu a área útil de parcela de quatro metros quadrados, cuja densidade foi de 50.000 plantas ha⁻¹. Três plantas localizadas na parte central da parcela útil foram definidas como amostra para retirada do material vegetal (folhas) usado nas análises.

Os tratos culturais, adubação e capina foram realizados manualmente e de forma homogênea para toda a área. Não foram aplicados herbicidas ou inseticidas durante o experimento, a fim de simular uma condição de manejo muito comum entre os agricultores familiares dessa microrregião catarinense, mesmo quando cultivam milhos transgênicos. Foi feita análise química de solo e com base nela a adubação com nitrogênio, fósforo e potássio, de acordo com recomendação para a cultura do milho (Comissão de Química e Fertilidade do Solo – RS/SC, 2004).

As avaliações dos endofíticos foram feitas em quatro estádios do desenvolvimento das plantas de milho, aos 28, 50, 73 e 91 dias, após a semeadura, correspondendo aos estádios designados como V3, V4, R1 e R2. Aos 28 dias da semeadura as plantas de milho estavam no estágio vegetativo de três folhas expandidas (V3); aos 50 dias, ainda no estágio vegetativo, as plantas continham quatro folhas expandidas (V4); aos 73 dias, as plantas estavam no início do período reprodutivo (R1), com cinco folhas expandidas e com pendão e espiga, em processo de desenvolvimento e; aos 91 dias, as plantas estavam com seis folhas expandidas e, com pendão e espiga bem formados, já em fase de polinização (R2). Após 110 dias as folhas apresentavam sintomas de doenças, o que limitou a coleta.

Foram coletadas folhas jovens e sadias na sessão mediana de três plantas de cada tratamento, incluindo a nervura. Após a coleta, as amostras foliares foram acondicionadas em sacos plásticos e mantidas em caixas térmicas (por no máximo duas horas), levadas ao laboratório e armazenadas a -80 °C até o processamento.

Deteccção de transgenes

A confirmação da presença dos eventos dos híbridos transgênicos (*Hx* e *Hxrr*) e a ausência de transgenes, no híbrido isogênico não geneticamente modificado (*NGM*) e na variedade crioula (*RS*), foi feita a partir da deteção da presença do evento TC1507 (região do gene pat), já que os dois híbridos transgênicos eram portadores desse evento. Para tanto, foi utilizado o DNA extraído das folhas das mesmas plantas utilizadas para a avaliação de endofíticos, conforme será descrito no item seguinte.

A região do evento TC1507 foi amplificada com os primers *foward/reverse TC1507f* (5' CTT GTG GTG TTT GTG GCT CT 3') e *TC1507r* (5' TGG CTC CTC CTT CGT ATG T 3') (LI et al., 2009), nas seguintes condições: solução tampão 1X contendo 0,2 mM dNTPs, 2,5

mM MgCl₂, 1 U DNA polimerase Taq (Life Technologies, São Paulo, Brasil), 10 mM dos primers e 100 ng do DNA metagenômico. As condições de amplificação da PCR foram 8 min a 95 °C; 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 58 °C e 50 s a 72 °C e extensão final por 8 min a 72 °C (LI et al., 2009). Os produtos da PCR foram corados com Sybr Green (Life Technologies, São Paulo, Brasil), submetidos a eletroforese horizontal em gel de agarose 2% em tampão TAE 1X (Tris a 50 mM; ácido acético glacial a 50 mM e EDTA a 25 mM) por 60 min, a 60 V. A aquisição das imagens dos géis foi feita em fotodocumentador Fusion (Vilber Loumart, Paris, França).

Além da confirmação da presença do fragmento de DNA correspondente ao transgene, foi realizado a confirmação da expressão proteica através de tiras de imuno ensaio de fluxo lateral (*strip tests*). Essas tiras são projetadas comercialmente para extrair e detectar a presença das proteínas que as culturas transgênicas expressam em seus tecidos foliares ou em sementes. Nesse estudo utilizou-se o kit *QuickStix* (Envirologix, Portland, EUA) para detecção da proteína cry 1F, que está presente nos dois híbridos transgênicos utilizados nesse estudo, conforme recomendações do fabricante. A visualização de duas faixas na coloração roxa confirmou a presença da proteína cry1F nos tratamentos com transgenia (dados não apresentados).

Extração de DNA

Previamente a extração de DNA foi realizada a desinfecção superficial das folhas de milho, mediante imersão por 2 min em álcool 70%, 5 min em hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) (V/V), 1 min em álcool 70% e imersão em água destilada esterilizada, quatro vezes por 1 min. Da última água de lavagem foi feita a PCR com primers específicos de bactérias e fungos para confirmar a eliminação de epifíticos nas folhas (dados não apresentados). Após a desinfecção superficial, as amostras de tecido foliar foram maceradas com auxílio de almofariz e pilão de porcelana em nitrogênio líquido e, aproximadamente 100 mg foram acondicionados em tubos de 1,5 mL. O DNA foi extraído pelo método CTAB 2% (DOYLE & DOYLE, 1990) e sua integridade confirmada em eletroforese horizontal, em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X, por 60 min, a 60 V e corados com Sybr Green (Life Technologies, São Paulo, Brasil). A aquisição das imagens dos géis foi feita em fotodocumentador Fusion (Vilber Loumart, Paris, França).

Análises de PCR-DGGE

A análise da estrutura das comunidades de microrganismos endofíticos do milho foi feita por PCR-DGGE, pela amplificação de regiões específicas de bactérias e fungos.

A região V3 do gene rDNA 16S de *Bacteria* foi amplificada com os primers BAC338FGC (5' GCC CGC CGC GCG CGG CGG GCG GGG CGG GGG CAC GGA CTC CTA CGG GAG GCA GCA G 3') e UN518R (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') (ØVREÅS et al., 1997). A reação foi feita em solução tampão 1X, contendo 0,2 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂, 1 U DNA polimerase Taq (Life Technologies, São Paulo, Brasil), 10 mM dos primers e 100 ng do DNA metagenômico. As condições no termociclador modelo T-100 (BioRad, Hercules, CA, EUA) foram de 5 min a 95 °C; 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 55 °C e 1 min a 72 °C e extensão final por 10 min a 72 °C.

A comunidade de fungos foi avaliada a partir da amplificação parcial da região ssu (18S rDNA *Fungi*) com os primers FR1GC (5' GCC CGC CGC GCG CGG CGG GCG GGG CGG GGG AIC CAT TCA ATC GGT AIT 3') e FF390 (CGA TAA CGA ACG AGA CCT) (VAINIO & HANTULA, 2000). A reação foi feita nas mesmas condições descritas acima para amplificação do gene de bactéria. As condições de amplificação foram 8 min a 95 °C; 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 45 s a 50 °C e 2 min a 72 °C e extensão final por 10 min a 72 °C. Os produtos da PCR, tanto de fungos quanto de bactérias, foram corados com Sybr Green (Life Technologies, São Paulo, Brasil), submetidos a eletroforese horizontal em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X por 60 min, a 60 V. A aquisição das imagens dos géis foi feita em fotodocumentador Fusion (Vilber Loumart, Paris, França).

Os produtos amplificados foram analisados através de eletroforese em gel com 8% (m/V) de acrilamida:bisacrilamida (37,5: 1, m:m), contendo um gradiente de 25 a 65% de formamida e ureia (ØVREÅS et al., 1997). A eletroforese foi realizada a 200 V e 60 °C constantes, por 4h e 30 min, utilizando-se um sistema "DCode" (BioRad, Hercules, CA, USA) e tampão TAE 1X. O DNA foi corado com Sybr Safe (Life Technologies, São Paulo, Brasil) e a aquisição das imagens dos géis foi feita em foto documentador Gel Logic 2200 Pro (Carestream Health, New York, EUA).

Análises estatísticas

Os perfis de amplicons dos géis de DGGE foram analisados pelo programa GelCompar II versão 6.5 (BioSystematica, Wales, UK), a partir da análise de agrupamento hierárquico, utilizando índice de *Jaccard* e o modelo de agrupamento por UPGMA. Para as comparações aos pares foi realizado o teste de similaridade de ANOSIM, utilizando o coeficiente de *Jaccard*, pelo programa PAST 3.04 (HAMMER, HARPER, RYAN, 2001). A planilha de presença e ausência de amplicons, gerada no programa GelCompar II, foi utilizada para os cálculos do diagrama de Venn (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

RESULTADOS

Detecção do evento TC1507

A presença do evento TC1507 nas cultivares transgênicas *Hx* e *Hxrr* e a ausência do mesmo no híbrido convencional *NGM* e na variedade crioula *RS*, foram verificadas previamente às análises da estrutura da comunidade de microrganismos endofíticos (Figura 3), visando confirmar a condição genética de cada tratamento quanto à presença e ausência de transgenes. Com base nessas análises foi possível verificar que todos os tratamentos atendiam as especificações genéticas atestadas (híbridos) ou esperadas (variedade crioula) quanto à presença (*Hx* e *Hxrr*) e ausência (*NGM* e *RS*) de transgenes.

A confirmação prévia da condição genética dos quatro tratamentos foi um procedimento metodológico adotado nesse estudo, visando garantir que as associações estabelecidas entre as comunidades de microrganismos endofíticos e as populações de milho estudadas pudessem ser decorrentes dos efeitos da composição genética de cada tratamento. A partir disso, buscou-se descartar possíveis erros de identidade dos híbridos comerciais (se transgênico ou não transgênico) ou da variedade crioula (se livre de contaminações indesejadas por fluxo gênico de pólen de híbridos transgênicos).

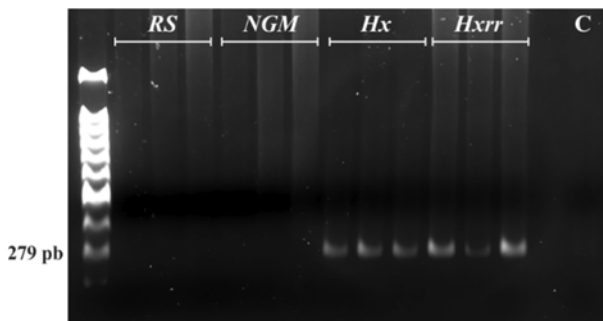


Figura 3. Imagem da amplificação parcial do gene TC1507 com aproximadamente 279 pb. Onde *RS* (crioulo) *NGM* (convencional), *Hx* transgênico TC1507) e *Hxrr* (transgênico TC1507+NK603) referem-se aos genótipos de milho e *C* refere-se ao controle negativo.

Comunidade de bactérias endofíticas

A imagem do gel após DGGE, com o perfil de amplicons das comunidades de bactérias endofíticas do milho estão apresentadas na Figura 4. As amostras agruparam-se de acordo com o estágio de desenvolvimento das plantas, não havendo discriminação entre as mesmas a partir dos tratamentos avaliados (Figura 5 e Tabela 1). Pela análise de agrupamento hierárquico pode-se observar a formação de dois grupos dominantes, um constituído pelos dois estádios vegetativos (V3 e V4) e o outro pelos estádios reprodutivos (R1 e R2). A estrutura das comunidades de bactérias apresentou-se mais homogênea nos estádios reprodutivos (Figura 5).

A inserção de transgenes não afetou significativamente a comunidade de bactérias endofíticas do milho, não havendo separação entre as amostras do milho *NGM*, *Hx* e *Hxrr*. Dentro dos mesmos estádios as estruturas de comunidades de bactérias endofíticas foram semelhantes entre os três híbridos e a variedade crioula de milho (*RS*), embora tenham sido observadas pequenas diferenças apenas nos períodos vegetativos. Esses resultados indicam que a comunidade de bactérias endofíticas das folhas de milho não foi afetada significativamente pela presença do evento T1507 isolado ou combinado ao NK603, bem como pela composição genética das populações de milho, se crioulo ou híbrido.

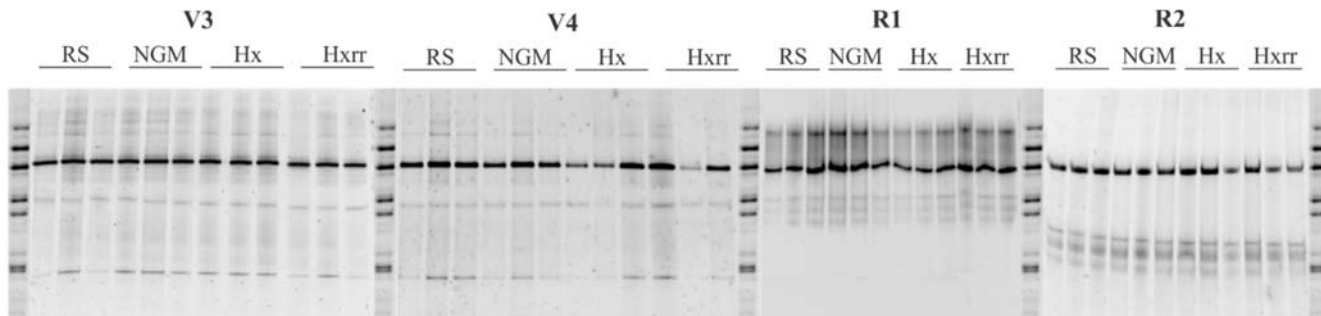


Figura 4. Imagem dos géis de DGGE de bactérias endofíticas, com três repetições de cada tratamento avaliado. Onde *RS* (crioulo) *NGM* (convencional), *Hx* (transgênico TC1507) e *Hxrr* (transgênico TC1507+NK603) referem-se aos genótipos de milho, nos estádios vegetativos V3 e V4 e reprodutivos R1 e R2.

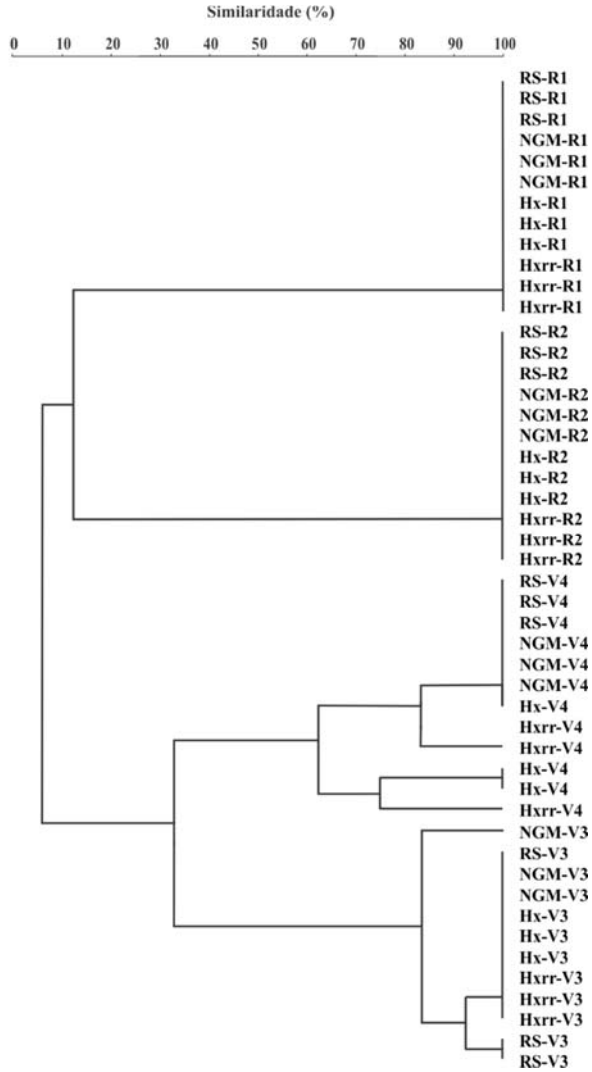


Figura 5. Agrupamento hierárquico da estrutura de comunidades de bactérias endofíticas. Onde *RS* (crioulo) *NGM* (convencional), *Hx* (transgênico TC1507) e *Hxrr* (transgênico TC1507+NK603) referem-se

aos genótipos de milho, nos estádios vegetativos V3 e V4 e reprodutivos R1 e R2.

Tabela 1 Resultado do teste de ANOSIM por pareamento (*Pairwise*) baseado nos perfis de amplicons do gene 16S rDNA de bactérias endofíticas. Onde *RS* (crioulo) *NGM* (convencional), *Hx* (transgênico TC1507) e *Hxrr* (transgênico TC1507+NK603) referem-se aos genótipos de milho, nos estádios vegetativos V3 e V4 e reprodutivos R1 e R2

Tratamento	<i>Teste de Pairwise*</i>			
	<i>RS</i>	<i>NGM</i>	<i>Hx</i>	<i>Hxrr</i>
Estádio V3				
<i>RS</i>	-			
<i>NGM</i>	0,148	-		
<i>Hx</i>	0,333	0,000	-	
<i>Hxrr</i>	0,333	0,000	0,000	-
Estádio V4				
<i>RS</i>	-			
<i>NGM</i>	0,000	-		
<i>Hx</i>	0,333	0,333	-	
<i>Hxrr</i>	0,167	0,167	0,000	-
Estádio R1				
<i>RS</i>	-			
<i>NGM</i>	0,000	-		
<i>Hx</i>	0,000	0,000	-	
<i>Hxrr</i>	0,000	0,000	0,000	-
Estádio R2				
<i>RS</i>	-			
<i>NGM</i>	0,000	-		
<i>Hx</i>	0,000	0,000	-	
<i>Hxrr</i>	0,000	0,000	0,000	-

*(R global = 0.815; $P < 0.001$).

Comunidade de fungos endofíticos

A imagem do gel após DGGE, com o perfil de amplicons das comunidades de fungos endofíticos do milho estão apresentadas na Figura 6. As amostras foram agrupadas em alguns estádios fenológicos de acordo com constituição genética do material avaliado (Figura 7). De maneira geral, as comunidades de fungos apresentaram repetibilidade entre as três

plantas avaliadas em cada tratamento, demonstrando confiabilidade nas demais avaliações estatísticas.

Os fungos do milho crioulo (*RS*) variaram de acordo com o estágio fenológico das plantas e foram diferentes dos híbridos (*NGM*, *Hx* e *Hxrr*), nos quatro estádios avaliados. Os estádios fenológicos vegetativos (V3 e V4) discriminaram os dois híbridos de milho transgênicos do convencional quanto à estrutura de comunidades de fungos endofíticos. Apenas no estágio R1, a comunidade de fungos foi diferente entre o transgênico portador de um evento (*Hx*) e o transgênico de dois eventos (*Hxrr*), enquanto que o convencional (*NGM*) foi semelhante ao *Hx*. Já no estágio R2 foi possível diferenciar apenas a comunidade de fungos entre o milho crioulo e os demais híbridos, não havendo diferenças devido à inserção de transgenes aos híbridos (Tabela 2).

Assim, os fungos foram os endofíticos do milho que sofreram alterações devido à constituição genética das plantas, diferindo em razão: (i) da presença e ausência de transgenes com o evento T1507 isolado ou combinado ao NK603 (estádios V3 e V4); (ii) do *background* avaliado, se crioulo ou híbridos melhorados (estádios V3, V4, R1 e R2); e (iii) do tipo de transgene inserido, se evento T1507 isolado ou T1507 combinado com NK603 (estádio R1).

Pelos diagramas de Venn pode-se observar a baixa diversidade estrutural dos fungos endofíticos nas populações de milho avaliadas (Figura 8). Esses resultados podem ser verificados pelo reduzido número de amplicons de cada tratamento, em todos os quatro estádios de desenvolvimento do milho. No estágio V3 foram quatro amplicons no total, no V4 foram cinco, no R1 cinco e no R2 quatro amplicons. Apenas as populações de *RS* no estágio reprodutivo R2 e *Hxrr* no estágio reprodutivo R1 apresentaram amplicons exclusivos (Figura 8).

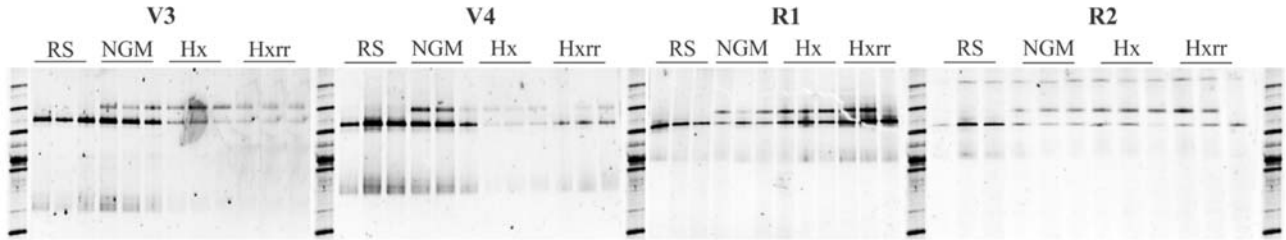


Figura 6. Imagem dos géis de DGGE, de fungos endofíticos, com três repetições de cada tratamento avaliado. Onde *RS* (crioulo) *NGM* (convencional), *Hx* (transgênico TC1507) e *Hxrr* (transgênico TC1507+NK603) referem-se aos genótipos de milho, nos estádios vegetativos V3 e V4 e reprodutivos R1 e R2.

aos genótipos de milho, nos estádios vegetativos V3 e V4 e reprodutivos R1 e R2.

Tabela 2 Resultado do teste de ANOSIM por *Pairwise* (pareamento) baseado nos perfis de amplicons do gene rDNA 18S de fungos endofíticos. Onde *RS* (crioulo) *NGM* (convencional), *Hx* (transgênico TC1507) e *Hxrr* (transgênico TC1507+NK603) referem-se aos genótipos de milho, nos estádios vegetativos V3 e V4 e reprodutivos R1 e R2

Tratamento	<i>Teste de Pairwise*</i>			
	<i>RS</i>	<i>NGM</i>	<i>Hx</i>	<i>Hxrr</i>
Estádio V3				
<i>RS</i>	-			
<i>NGM</i>	1.000 [#]			
<i>Hx</i>	1.000 [#]	1.000 [#]		
<i>Hxrr</i>	1.000 [#]	1.000 [#]	0.000	-
Estádio V4				
<i>RS</i>	-			
<i>NGM</i>	1.000 [#]			
<i>Hx</i>	1.000 [#]	1.000 [#]		
<i>Hxrr</i>	1.000 [#]	1.000 [#]	0.000	-
Estádio R1				
<i>RS</i>	-			
<i>NGM</i>	1.000 [#]			
<i>Hx</i>	1.000 [#]	0.000		
<i>Hxrr</i>	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	-
Estádio R2				
<i>RS</i>	-			
<i>NGM</i>	1.000 [#]			
<i>Hx</i>	1.000 [#]	0.000		
<i>Hxrr</i>	1.000 [#]	0.000	0.000	-

*(R global = 0.917; $P < 0.001$). [#] Diferença significativa.

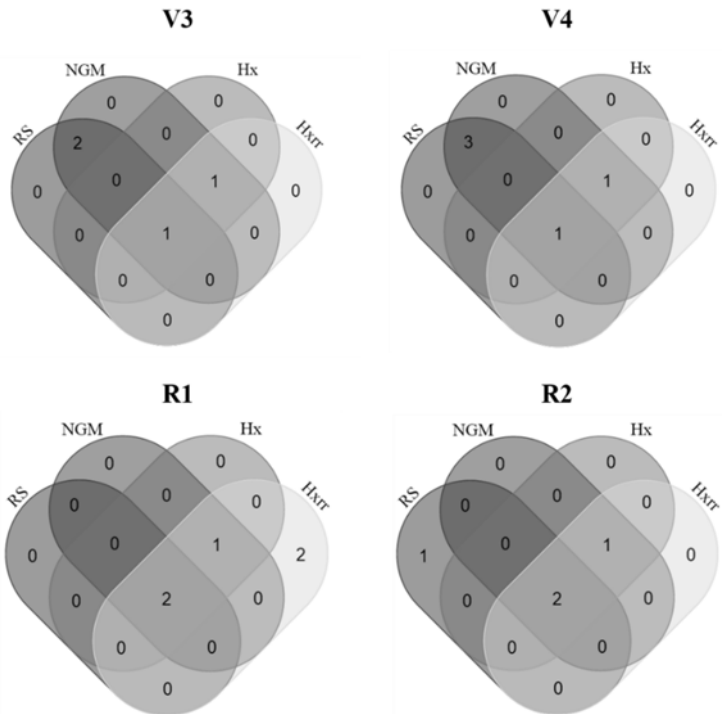


Figura 8. Diagrama de Venn obtido da planilha de presença e ausência da estrutura de comunidades de fungos endofíticos. Onde *RS* (crioulo) *NGM* (convencional), *Hx* (transgênico TC1507) e *Hxrr* (transgênico TC1507+NK603) referem-se aos genótipos de milho, nos estádios vegetativos V3 e V4 e reprodutivos R1 e R2.

DISCUSSÃO

As comunidades de bactérias e fungos endofíticos das folhas de milho crioulo, híbridos isogênicos transgênicos e não transgênico, foram avaliadas em quatro etapas do desenvolvimento das plantas.

Nesse estudo não foram utilizados herbicidas nos quatro tratamentos, por não ser frequente a prática de utilização de herbicidas entre muitos agricultores do Extremo Oeste de Santa Catarina. Isso pode ocorrer mesmo em lavouras cultivadas por milhos transgênicos tolerantes a glifosato e glifosinato de amônia, já que muitos agricultores não têm conhecimento prévio da constituição genética transgênica da semente disponibilizada pelo programa do governo catarinense denominado 'Terra Boa' (SILVA et al., 2013). Ademais, a exclusão de herbicidas se deu em razão da ocorrência de possíveis alterações no metabolismo e crescimento microbiano quando expostos a esses agroquímicos, podendo comprometer a inferência de alterações sobre a comunidade de endófitos. Martins et al. (2011), por exemplo, detectaram diferenciação na expressão proteica em bactérias isoladas do solo quando expostas a diferentes herbicidas. Zain et al. (2013) observaram que a aplicação de glifosato ou glifosinato de amônia em plantações de palma reduziram o crescimento de bactérias, fungos e actinomicetos do solo.

Outra consideração a fazer é o efeito que os herbicidas podem ter nas plantas transgênicas portadoras dos transgenes *pat* e /ou *cp4epsps*. O princípio glifosato atua no bloqueio da enzima EPSPS, o que impede a síntese de aminoácidos aromáticos necessários aos desenvolvimento da planta (HASLAM, 1997). Por sua vez, o glifosinato de amônio é um inibidor da glutamina sintetase, enzima que converte glutamato em glutamina e remove a amônia tóxica da célula, impedindo a morte da planta (LINDSEY, 1992). Essas alterações metabólicas decorrentes da exposição aos seus respectivos herbicidas também podem resultar em mudanças na comunidade de endófitos da planta, em relação àquelas observadas na comunidade de fungos endofíticos das plantas transgênicas (*pat* e *cp4epsps*) quando não são expostas aos herbicidas. Novos estudos devem ser conduzidos para avaliar as mudanças das comunidades dos endófitos do milho, na ausência e na presença dessa exposição.

A alteração da comunidade microbiana endofítica poderia ser esperada em plantas transgênicas, visto que muitas proteínas expressas nessas plantas podem ser exclusivas e, nunca antes detectadas no milho (AGAPITO-TEFEN et al., 2013; SÉRALINI et al., 2012). Com a mudança no metabolismo da planta transgênica ficam disponíveis para os

microrganismos associados, proteínas diferentes daquelas encontradas em uma planta convencional. Por isso, a microbiota da planta pode sofrer alterações na sua composição para assim conseguir metabolizar esses novos compostos, tal como ocorre em casos de adaptação dos microrganismos para a degradação de compostos estranhos ou poluentes no ambiente (SRIVASTAVA et al., 2014; MARTINS et al., 2007).

Os resultados da presente pesquisa sugerem que as bactérias endofíticas do milho não são afetadas significativamente pelos transgenes cry1F, pat e cp4epsps e tão pouco pelo *background* genético da planta. No entanto, sofrem alterações durante os estádios de desenvolvimento do milho. Embora a estrutura de comunidade de bactérias endofíticas não tenha sofrido alterações significativas entre as populações de milho avaliadas, verificou-se que tais mudanças ocorreram entre os estádios de desenvolvimento da planta. Nos estádios vegetativos o metabolismo da planta de milho está voltado para o acúmulo de massa, sobretudo para o crescimento e desenvolvimento de raízes, colmo e folhas. Nesse período ocorre alta demanda por água e nitrogênio. Já nos períodos reprodutivos o metabolismo do milho está voltado para a formação dos grãos. Portanto, o período demanda ainda mais água e nitrogênio, mas também fósforo e potássio, de maneira mais intensa do que no início do desenvolvimento da planta (RITCHIE, HANWAY & BENSON, 1992). Essas diferenças no metabolismo da planta durante o seu desenvolvimento, poderiam afetar a associação com as bactérias endofíticas e selecionar grupos específicos para cada fase do seu desenvolvimento.

Dados semelhantes foram encontrados em bactérias endofíticas de arroz, avaliadas por PCR-DGGE, onde não houve diferenças significativas entre as cultivares ou manejo aplicado, mas sim entre as diferentes fases do desenvolvimento das plantas (RANGJAROEN et al., 2014; PRAKAMHANG et al., 2009). Heuer & Smalla (1999) avaliaram bactérias endofíticas nas folhas de batata transgênica (T4 - lisoenzima) e verificaram que as mesmas variam de acordo com o estágio fenológico da planta e condições ambientais, e que elas não foram diferentes das bactérias associadas à batata convencional.

Com análise de RFLP, outro estudo verificou que as bactérias diazotróficas de colmo, raiz e rizosfera de duas cultivares de milho convencional variaram somente de acordo com os estádios fenológicos avaliados e foram semelhantes entre as cultivares (ROESCH et al., 2006). Entretanto, dados controversos também são encontrados na literatura. SILVA et al. (2014) ao avaliar bactérias, fungos e arqueias endofíticas de raízes de milho transgênico (cry 1F, pat e cry 1Ab) e convencional,

demonstraram que as bactérias sofreram mais alterações devido aos genótipos das plantas de milho.

Por outro lado, na presente pesquisa a estrutura das comunidades de fungos endofíticos do milho variou entre as populações de milho estudadas. As alterações mais significativas entre os híbridos transgênicos e não transgênico de milho ocorreram nos períodos V3 e V4. Porém, os fungos endofíticos do milho crioulo foram diferentes dos três híbridos isogênicos, em todos os estádios avaliados. Esses resultados corroboram os resultados obtidos por Pan, Baumgarten & May (2008), que investigaram os fatores que influenciavam a composição da comunidade de fungos endofíticos em diferentes genótipos de milho convencional. Esses autores concluíram que a diversidade de espécies não é aleatória estando associada ao genótipo da planta associada.

A partir dos resultados dessa pesquisa é possível inferir que a composição genética das populações de milho estudadas foi o fator determinante das alterações detectadas na estrutura das comunidades de fungos endofíticos, e que esses microrganismos sofrem menos alterações devido ao metabolismo básico da planta, ou seja, ao longo dos estádios de desenvolvimento. Outros estudos, comparando híbridos de milho contendo o transgene *Bt* com as suas isogênicas convencionais correspondentes, em condições controladas, demonstraram que os transgênicos apresentaram menores taxas de colonização por fungos micorrízicos arbusculares (CHEEKE, ROSENSTIEL & CRUZAN, 2012; CASTALDINI et al., 2005). Götz et al. (2006) detectaram alterações significativas na diversidade de fungos endofíticos, comparando batatas transgênicas capazes de produzir a Lisoenzima-T4, que confere resistência a bactérias fitopatogênicas e sua versão convencional.

Os efeitos não intencionais dos transgenes nas plantas e nos endófitos associadas ainda são desconhecidos. Porém, o presente trabalho sugere que a diversidade estrutural de fungos endofíticos das folhas de milho é afetada pelo *background* genético dessa espécie, independentemente de ser ou não portador de transgenes, assim como pelos transgenes *cry1F* e *pat* isolados ou combinados a *cp4 epsps*. Entretanto, estudos complementares devem ser conduzidos para investigar se tais mudanças da comunidade de fungos associados ao milho, provocadas direta ou indiretamente pela presença de transgenes, afetam o crescimento e o desenvolvimento das plantas, assim como a absorção de água e nutrientes e os mecanismos de defesa do milho frente aos fatores de estresses bióticos (resistência a patógenos e pragas) e

abióticos (resistência ao calor, estresse hídrico etc) do ambiente de cultivo.

CONCLUSÃO

Os fungos foram os microrganismos endofíticos do milho que sofreram mais alterações devido ao genótipo da planta, enquanto que as bactérias endofíticas variaram de acordo com o estágio fenológico; as comunidades fúngicas do milho crioulo foram distintas das comunidades presentes nos híbridos isogênicos avaliados; a inserção de transgenes nos híbridos não afetou as comunidades de bactérias endofíticas; e por fim, comparando as comunidades de fungos endofíticos em diferentes estágios fenológicos de desenvolvimento do milho, os estágios vegetativos (V3 e V4) discriminaram os genótipos com transgenia daqueles não geneticamente modificados, enquanto o estágio reprodutivo (R1) foi mais eficiente em discriminar os dois tipos de híbridos transgênicos avaliados.

REFERÊNCIAS

- AGAPITO-TENFEN, S.Z.; Guerra, M.P.; Wikmark, O.G.; Nodari, R.O. Comparative proteomic analysis of genetically modified maize grown under different agroecosystems conditions in Brazil. **Proteome Science**, v.11, p.1-15, 2013.
- AGBIOS, **Information on GM Approved Products (2008)**. Disponível em: <<http://www.agbios.com/dbase.php>>. Acesso em: 21 Set. 2012.
- ANDREOTE, F.D.; CARNEIRO, R.T.; SALLES, J.F.; MARCON, J.; LABATE, C.A.; AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. Culture-independent assessment of Alphaproteobacteria related to order Rhizobiales and the diversity of cultivated Methylobacterium in the rhizosphere and rhizoplane of transgenic eucalyptus. **Microbial Ecology**, v.57, p.82–93, 2009b.
- ANDREOTE, F.D.; MENDES, R.; DINI-ANDREOTE, F.; ROSSETTO, P.B.; LABATE, C.A.; PIZZIRANI-KLEINER, C.A.; van ELSAS, J.D.; AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. Transgenic tobacco revealing altered bacterial diversity in the rhizosphere during early plant development. **Antonie Leeuwenhoek**, v.93, p.415–424, 2008.
- ANDREOTE, F.D.; ROSSETTO, P.B.; MENDES, R.; AVILA, L.A.; LABATE, C.A.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. Bacterial community in the rhizosphere and rhizoplane of wild type and transgenic eucalyptus. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.25, p.1065–1073, 2009a.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, Jr. W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Eletronic Journal of Biotechnology**, 2000 [online]. Acesso em 11 Jul. 2014. Disponível em: <<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol3/issue1/full/4/reprint.html>>.
- CASTALDINI, M.; TURRINI, A.; SBRANA, C. et al. Impact of Bt Corn on Rhizospheric and Soil Eubacterial Communities and on Beneficial Mycorrhizal Symbiosis in Experimental Microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p. 6719–6729, 2005.
- CÉLERES. **Informativo biotecnologia**. Safra 2014/2015. Disponível em: <<http://www.celeres.com.br/wordpress/wp-content/uploads/2014/12/IB1403.pdf>>. Acesso em: 11 Jan. 2015.

- CHEEKE, T.E.; ROSENSTIEL, T.N.; CRUZAN, M.B. Evidence of reduced arbuscular mycorrhizal fungal colonization in multiple lines of bt maize. **American Journal of Botany**, v. 99, p. 700–707, 2012.
- COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 10 ed. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo/Núcleo Regional Sul, 2004. 400p.
- COSTA, F.M.; SILVA, N.C.A.; OGLIARI, J.B. Corn diversity in Southern Brazil: indication of a microcenter of *Zea mays* L. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 2015. (*em revisão*).
- DOYLE, J.J.; DOYLL, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro, RJ). **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. – Rio de Janeiro: EMBRAPA-SPI, 2006. 306p.
- FAO: **FAO Statistical yearbook**. Roma. 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e.PDF>>. Acesso em: 15 Out. 2014.
- GANLEY, R.J.; SNIEZKO, R.A.; NEWCOMBE, G. Endophyte-mediated resistance against white pine blister rust in *Pinus monticola*. **Forest Ecology and Management**, v. 255, p. 2751–2760, 2008.
- GÖTZ, M.; NIRENBERG, H.; KRAUSE, S.; WOLTERS, H.; DRAEGER, S.; BUCHNER, A.; LOTTMANN, J.; BERG, G.; SMALLA, K. Fungal endophytes in potato roots studied by traditional isolation and cultivation-independent DNA-based methods. **FEMS Microbiology Ecology**, v.58, p. 404-413, 2006.
- HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. **Paleontologia Electronica**, v.4, 9 pp., 2001.
- HASLAM, E. **Shikimic acid: metabolism and metabolites**. 1ed. University of Sheffield, UK. Chichester: New York; Wiley, 1997. 387p.
- HEUER, H.; SMALLA, K. Bacterial phyllosphere communities of *Solanum tuberosum* L. and T4-lysozyme-producing transgenic variants. **FEMS Microbiology Ecology**, v.28, p. 357-371, 1999.
- JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013. **ISAAA Brief**, n. 46. ISAAA: Ithaca, NY.

- KIRINO, P. **Farmers and Food Security**. IFA – FAO Agriculture Conference: Rome - Italy, 2003. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 05 Jul. 2014.
- KIST, V.; ALBINO, V.S.; MARASCHIN, M.; OGLIARI, J.B. Genetic variability for carotenoid content of grains in a composite maize population. **Scientia Agricola**, v. 1, p. 480-487, 2014.
- KUHNEN, S.; DIAS, P.; OGLIARI, J.B.; MARASCHIN, M. Brazilian Maize Landraces Silks as Source of Lutein: An Important Carotenoid in the Prevention of Age-Related Macular Degeneration, **Food and Nutrition Sciences**, v.3, p.1609-1614, 2012.
- LI, X.; YANG, L.; ZHANG, J.; WANG, S.; SHEN, K.; PAN, L.; ZHANG, D. Simplex and Duplex Polymerase Chain Reaction Analysis of Herculex® RW (59122) Maize Based on One Reference Molecule Including Separated Fragments of 5_ Integration Site and Endogenous Gene. **Journal of AOAC International**, v. 92, p. 1472-1483, 2009.
- LINDSEY, K. Genetic manipulation of crop plants. **Journal of Biotechnology**, v. 26, p. 1-28, 1992.
- MARTÍN, J.A.; WITZELL, J.; BLUMENSTEIN, K.; ROZPEDOWSKA, E.; HELANDER, M.; SIEBER, T.N.; GIL, L. Resistance to Dutch Elm Disease Reduces Presence of Xylem Endophytic Fungi in Elms (*Ulmus* spp.). **PLoS ONE**, v.8, 2013.
- MARTINS, P.F.; CARVALHO, G.; GRATÃO, P.L.; DOURADO, M.N.; PILEGGI, M.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, R.A. Effects of the herbicides acetochlor and metolachlor on antioxidant enzymes in soil bacteria. **Process Biochemistry**, v.46, p.1186–1195, 2011.
- MARTINS, P.F.; MARTINEZ, C.O.; CARVALHO, G.; CARNEIRO, P.I.B.; AZEVEDO, R.A.; PILEGGI, S.A.V.; et al. Selection of microorganisms degrading metolachlor herbicide. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p.153–159, 2007.
- NAVEED, M.; MITTERA, B.; REICHENAUERB, T.G.; WIECZOREKC, K.; SESSITSCHA, A. Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by *Burkholderia phytofirmans* PsJN and *Enterobacter* sp. FD17. **Environmental and Experimental Botany**, v.97, p. 30 – 39, 2014.
- OGLIARI, J.B.; KIST, V.; CANCI, A. **The participatory genetic enhancement of a local maize variety in Brazil**. In: de Boef WS, Subedi A, Peroni N, Thijssen M, O’Keeffe E (ed) Community biodiversity management, promoting resilience and the conservation of plant genetic resources, 1rd edn. Abingdon, Oxon, p. 265-71, 2013.

- ØVREÅS, L., FORNEY, L., DAAE, F.L., TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3367-3373, 1997.
- PAN, J. J.; BAUMGARTEN, A. M.; MAY, G. Effects of host plant environment and *Ustilago maydis* infection on the fungal endophyte community of maize (*Zea mays*). **New Phytologist**, v.178, p. 147–156, 2008.
- PEÑUELAS, J.; TERRADAS, J. The foliar microbiome. **Trends in Plant Science**, v.19, p.278-280, 2014.
- PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S.S. **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer Verlag, 1991. p. 179-197.
- PRAKAMHANG, J.; MINAMISAWA, K.; TEAMTAISONG, K.; BOONKERD, N.; TEAUMROONG, N. The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). **Applied Soil Ecology**, v.42, p.41–149, 2009.
- RANGJAROEN, C.; RERKASEM, B.; TEAUMROONG, N.; SUNGTHONG, R.; LUMYONG, S. Comparative study of endophytic and endophytic diazotrophic bacterial communities across rice landraces grown in the highlands of northern Thailand. **Archives of Microbiology**, v. 196, p. 35–49, 2014.
- RASCHE, F.; VELVIS, H.; ZACHOW, C.; BERG, G.; VAN ELSAS, J.D.; SESSITSCH, A. Impact of transgenic potatoes expressing anti-bacterial agents on bacterial endophytes is comparable with the effects of plant genotype, soil type and pathogen infection. **Journal of Applied Ecology**, v.43, p.555- 556, 2006.
- REDMAN, R.S.; KIM, Y.; WOODWARD, C.J.D.A.; GREER, C.; ESPINO, L.; DOTY, S.L.; RODRIGUEZ, R.J. Increased Fitness of Rice Plants to Abiotic Stress Via Habitat Adapted Symbiosis: A Strategy for Mitigating Impacts of Climate Change. **PLoS ONE**, v.6, n.7, 2011.
- RITCHIE S.; HANWAY J.; BENSON G. **How a Corn Plant Develops**. Special report n. 48, Iowa State University, Ames, Iowa. 1992. Disponível em <<http://www.extension.iastate.edu/hancock/info/corn.htm>>. Acesso em 5 Nov. 2014.
- ROESCH, L.F.W.; OLIVARES, F.L.; PASSAGLIA, L.M.P.; SELBACH, P.A.; SÁ, E.L.S.; CAMARGO, F.A.O. Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant

- genotype, ontogeny and nitrogen-supply. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, p. 967–974, 2006.
- SÉRALINI, G.E.; CLAIR, E.; MESNAGE, R.; GRESS, S.; DEFARGE, N.; MALATESTA, M.; HENNEQUIN, D.; VENDÔMOIS, J.S. Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, p.4221-4231, 2012.
- SILVA, N.C.A.; COSTA, F.M; VIDAL, R.; OGLIARI, J.B. Riesgos de contaminación de maíz genéticamente modificado en maíces criollos conservados in situ on farm en el oeste de santa catarina, sur del brasil. **IX Simposio Internacional de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe El Salvador**. p.55, 2013.
- SILVA, D.; COTTA, S.; VOLLÚ, R.; JURELEVICIUS, D.; MARQUES, J.; MARRIEL, I.; SELDIN, L. Endophytic microbial community in two transgenic maize genotypes and in their near-isogenic non-transgenic maize genotype. **BMC Microbiology**, v. 24, 2014.
- SRIVASTAVA, J.; NARAIAN, R.; KALRA, S.J.S.; CHANDRA, H. Advances in microbial bioremediation and the factors influencing the process. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 11, p.1787-1800, 2014.
- STUART, R.M.; ROMÃO, A.S.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Culturable endophytic filamentous fungi from leaves of transgenic imidazolinone-tolerant sugarcane and its non-transgenic isolines. **Archives of Microbiology**, v.192, p.307-313, 2010.
- TRUTER, J.; H. Van HAMBURG; J. Van Den BERG. Comparative Diversity of Arthropods on Bt Maize and Non-Bt Maize in two Different Cropping Systems in South Africa. **Environmental Entomology**, v.43, p.197-208, 2014.
- VAINIO, E.J. & HANTULA, J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. **Mycological Research**, v. 104, p. 927-936, 2000.
- Van LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M.; PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual review of Phytopathology**, v. 36, p. 453-483, 1998.
- WORCHEL, E.R.; GIAUQUE, H.E.; KIVLIN, S.N. Fungal Symbionts Alter Plant Drought Response. **Microbial Ecology**, v. 65, p.671–678, 2013
- ZAIN, N. M. M.; MOHAMAD, R. B.; SIJAM, K.; MORSHED, M.M.; AWANG, Y. Effects of selected herbicides on soil microbial

populations in oil palm plantation of Malaysia: A microcosm experiment. **African Journal of Microbiology Research**, v.7, p. 367-374, 2013.

ZVI, M.M.B.; SHKLARMAN, E.; MASCI, T.; KALEV, H.; DEBENER, T.; SHAFIR, S.; OVADIS, M.; VAINSTEIN, A. *PAPI* transcription factor enhances production of phenylpropanoid and terpenoid scent compounds in rose flowers. **New Phytologist**, v.195, 2012.

5 CAPÍTULO 2

Este manuscrito refere-se ao artigo submetido para publicação em revista científica.

Efeitos do fluxo gênico entre transgênico, isogênica convencional e uma variedade crioula de milho sobre os fungos endofíticos

RESUMO

Os pólenes provenientes de cultivares transgênicas de milho podem fecundar quaisquer outros milhos não geneticamente modificados. É iminente o risco de contaminação por transgenes, inclusive sobre as variedades de milho crioulas ou locais, que guardam a grande diversidade usada no melhoramento genético e que são conservados *on farm* pela agricultura familiar da região Oeste de Santa Catarina, Brasil. Devido a facilidade de ocorrência de fluxo gênico entre os milhos transgênicos e as variedades crioulas, é premente a realização de estudos com a finalidade de avaliar os efeitos resultantes da introgressão progressiva de transgenes nas variedades crioulas. Com base nisso, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do background genético de três híbridos isogênicos – um não geneticamente modificado (*NGM*), outro contendo a transgenia Herculex (*Hx*) e o terceiro contendo a transgenia Herculex combinada com Roundup Ready (*Hxrr*) – em uma variedade local de milho “Rosado” (*RS*), do Extremo Oeste de Santa Catarina, sobre a estrutura de comunidade de fungos endofíticos. Para isso, foi implantado um experimento a campo, no delineamento de blocos ao acaso com três repetições, onde foram implantadas parcelas contendo o milho crioulo, os três híbridos isogênicos e as nove populações derivadas do *RS*, contendo 25, 50 ou 75% do genoma de cada híbrido separadamente, de onde coletou-se folha de 10 plantas de cada tratamento, totalizando 390 amostras avaliadas. A estrutura das comunidades de fungos endofíticos foi estudada por meio de análises de cluster e ANOSIM, com base em dados gerados em PCR-DGGE a partir de DNA fúngico obtido de folhas do milho, no início do estágio reprodutivo. A estrutura de comunidade de fungos endofíticos associados a variedade de milho crioula *RS* foi diferentes dos demais tratamentos. A comunidade de fungos endofíticos associados ao híbrido transgênico *Hxrr*, diferiu significativamente do híbrido transgênico *Hx* e do híbrido isogênico *NGM*, e estes últimos, por sua vez, foram semelhantes entre si. As populações de milho crioulo que sofreram apenas uma introgressão com seus respectivos híbridos e que, na geração seguinte, foram retrocruzadas com o mesmo milho crioulo (*NGM-25*, *Hx-25* e *Hxrr-25*), não voltaram a apresentar a comunidade de fungos antes observada no milho *RS*. Assim, pode-se inferir que uma vez modificada a diversidade de fungos endofíticos, a mesma poderá se perpetuar para as próximas gerações, o que justifica ainda mais os cuidados na questão da coexistência entre milhos crioulos e transgênicos.

Palavras-chave: introgressão; coexistência; PCR-DGGE; *Zea mays* L.

INTRODUÇÃO

O milho é uma cultura de grande relevância econômica em todo o mundo. De acordo com a FAO, o milho é a segunda *commodity* mais importante (FAOSTAT, 2012). Além disso, essa cultura possui um papel chave na segurança alimentar mundial, uma vez que a elevada diversidade genética permite sua adaptação aos mais diversos ambientes de cultivo. O milho apresenta muitos tipos de usos na alimentação, sendo uma das mais importantes fontes nutricionais conhecidas (SHIFERAW et al., 2011).

As variedades crioulas de milho cultivadas por agricultores familiares têm sido especialmente destacadas como valiosas fontes de características desejáveis (COSTA et al., 2015; OGLIARI, KIST & CANCI, 2013;). Quando conservadas *in situ - on farm* ao longo de muitos anos, as adaptações desenvolvidas por essas variedades às condições de agroecossistemas locais viabilizam sistemas de cultivo mais sustentáveis, além de fornecerem aos programas de melhoramento genético uma valiosa fonte de genes para o desenvolvimento de novas cultivares (OGLIARI, KIST & CANCI, 2013; WOOD & LENNÉ, 1997).

Porém, além das variedades de milho crioulas nessa região, são também cultivados os híbridos melhorados e comerciais, sobretudo os híbridos contendo tecnologia transgênica. As áreas cultivadas com híbridos transgênicos de milho têm apresentado um aumento exponencial em todo o mundo (JAMES, 2013) e também no Brasil (CÉLERES, 2014). De acordo com a norma de coexistência estabelecida no Brasil - Resolução Normativa Nº 4, de 16 de agosto de 2007 - uma distância igual ou superior a 100 metros, ou 20 fileiras de plantas convencionais, mais 20 metros entre os cultivos de milhos transgênicos e os convencionais, assegura a possibilidade da coexistência, ou seja, deve impedir fluxo gênico (BRASIL, 2007).

No entanto, as normas foram estabelecidas com base em lavouras comerciais e não de acordo com a realidade e o manejo exercido em pequenas propriedades agrícolas, como ocorre na região Oeste de Santa Catarina, onde o milho crioulo é tradicionalmente cultivado e conservado por agricultores familiares em pequenas propriedades. Um estudo recente do grupo NEABio (Núcleo de Estudos em Agrobiodiversidade, da Universidade Federal de Santa Catarina, SC, Brasil), nessa região, constatou que existe um sistema bimodal de produção nos municípios de Anchieta e Guaraciaba, ou seja, variedades crioulas e híbridos comerciais são cultivados pelo mesmo agricultor. Além disso, verificou-se que 70%

das áreas com variedades crioulas estão sendo cultivadas a uma distância menor ou igual a 100 metros de lavouras com milho híbrido transgênico (SILVA et al., 2013), situação essa que facilita a ocorrência de fluxo gênico nessa região.

Já foram detectados transgenes em variedades crioulas de milho no México, onde o cultivo de transgenes é proibido (EZCURRA, ORTIZ & SOBERON-MAINERO, 2002; QUIST & CHAPELA, 2001). Na África do Sul, onde o cultivo de plantas transgênicas é liberado desde 1997, foi recentemente constatado a presença de eventos transgênicos em variedades de milho crioulo. Nesses estudos, destacou-se a importância de avaliar o fluxo gênico em comunidades de agricultores familiares, pois assim como ocorre no município de Anchieta-SC, as pequenas propriedades locais e o tipo de manejo exercido tornam o sistema incapaz de propiciar as normas exigidas pela coexistência entre milhos transgênicos e crioulos. Assim, não é possível que nessa região africana seja cumprida a legislação de biossegurança do país, que também é signatário do Protocolo de Cartagena (IVERSEN et al., 2014; JACOBSON & MYHR, 2012).

A contaminação dessas variedades por um transgene pode acarretar efeitos epistáticos desconhecidos, ou seja, os produtos de tradução do DNA introduzido podem interagir com o genoma do milho, regulando a expressão de outros genes, interferindo em certas rotas bioquímicas (ZOLLA et al., 2008). Entretanto, a contaminação de variedades crioulas ou convencionais por pólen de milho transgênico já é um fato. Portanto, se um dia a ciência constatar efeitos maléficos ao ecossistema que justifiquem a retirada dos transgênicos do mercado, talvez isso não seja mais possível, visto que os transgenes estão se espalhando de forma não prevista.

Com base nesse cenário, muitos estudos têm-se dedicado a avaliação dos efeitos dos transgenes sobre organismos não alvo, a fim de esclarecer de que forma o ecossistema pode estar sendo afetado pelos transgenes, e assim estimular um maior cuidado na liberação e no manejo adotado para as plantas transgênicas. Pesquisas sobre esse tema foram conduzidas para avaliar as abelhas em flores de rosas modificadas para produção de antocianinas *PAP1* (ZVI et al., 2012), a macrofauna do solo em milho contendo o transgene *cry1Ab* (TRUTER, Van HAMBURG & Van Den BERG, 2014), os fungos micorrízicos em milho contendo o transgene *cry1F* (CHEEKE, ROSENSTIEL & CRUZAN, 2012), os microrganismos endofíticos em batata com transgenia para produção de compostos antibacterianos (RASCHÉ et al., 2006), os endofíticos de folha

de cana-de-açúcar com transgenia para resistência a herbicida (STUART et al., 2010) e sobre fungos endofíticos de espécies arbóreas com transgenia de resistência a patógenos (MARTÍN et al., 2013).

Todavia, em todos esses trabalhos foram comparados somente as plantas transgênicas com a sua isogênica convencional sem transgenes. Além de fazer essas comparações, a presente pesquisa foi inovadora por ter incluído também a avaliação de populações de milho crioulo submetidas a diferentes graus de introgressão do *background* genético dos híbridos isogênicos com e sem transgenia, simulando situações reais de contaminação recorrente por fluxo gênico.

No presente estudo avaliou-se os fungos endofíticos das folhas de milho. A escolha por esse grupo de microrganismos baseou-se em um estudo prévio desenvolvido pelo grupo do NEABio, onde demonstrou-se que os fungos endofíticos foram melhores indicadores do que as bactérias endofíticas das folhas de milho quanto a diferenciação entre genótipos de milho, com e sem transgenia, em quatro estádios do desenvolvimento da cultura (Capítulo 1 da presente tese).

Além disso, os fungos endofíticos possuem íntima relação com as plantas e estão associados a muitos mecanismos utilizados pelas mesmas, principalmente aqueles relacionados à defesa contra patógenos e à adaptação a condições ambientais adversas (Ek-RAMOS et al., 2013; REDMAN et al., 2011; REDMAN et al., 2002; VARMA et al., 1999; M'PIGA et al., 1997). Por essa razão, esse estudo utilizou a avaliação da comunidade de fungos endofíticos para verificar efeitos do fluxo gênico de transgenes em milho crioulo.

As comunidades de microrganismos em diferentes ecossistemas, têm sido avaliadas principalmente por emprego de técnicas de biologia molecular (LOGARES et al., 2014; ROESCH et al., 2006; DIAS et al., 2011). Dentre elas, a técnica de *fingerprint* PCR-DGGE permite avaliar a estrutura de comunidade da microbiota e tem sido utilizada de forma associada a outras técnicas mais avançadas, como sequenciamento de clones ou sequenciamento de nova geração, demonstrando resultados semelhantes (SILVA et al., 2014; LI et al., 2014; DIAS et al., 2011). É considerada uma técnica de baixo custo, de rápida obtenção de resultados e consistente em suas análises.

Ao nosso conhecimento, não existem relatos disponíveis na literatura sobre os efeitos de fluxo gênico entre cultivares transgênicas e variedades crioulas de milho quanto à comunidade de fungos endofíticos das folhas. Assim como são desconhecidos os impactos da alteração nas comunidades de microrganismos endofíticos e sobre a

agrobiodiversidade. Assim, o presente estudo visou elucidar a primeira questão, e para tanto, propôs-se analisar os efeitos da transgenia e da introgressão progressiva de híbridos isogênicos com e sem transgenia, em uma variedade local de milho do Extremo Oeste de Santa Catarina, com relação a estrutura das comunidades de fungos endofíticos do microbioma foliar das plantas.

MATERIAL e MÉTODOS

Desenvolvimento das populações com diferentes backgrounds genéticos

As sementes de milho utilizadas nesse estudo foram provenientes de uma variedade de milho crioulo, três híbridos triplos comerciais isogênicos, e nove populações de milho crioulo contendo três percentuais de introgressão (25%, 50% e 75%) do *background* genético de cada híbrido, totalizando 13 tratamentos. A variedade crioula de milho utilizada foi a Rosado (*RS*), cedida gentilmente pelos agricultores familiares Jair Coser e Miriam Della Vecchia, do município de Anchieta, Santa Catarina, Brasil. Essa variedade apresenta elevados teores de carotenóides funcionais, como a luteína (KUHLEN et al., 2012), produtividade razoável em sistema de produção orgânica (6,65 t ha⁻¹), além de ser uma das variedades crioulas de milho mais antigas da região Oeste de Santa Catarina, sendo cultivada há mais de 50 anos no município (OGLIARI, KIST & CANCI, 2013). Além disso, o Rosado é cultivado em uma área isolada geograficamente, recebendo todos os cuidados para evitar o cruzamento com outras plantas de milho.

Os três híbridos isogênicos utilizados pertencem à série Biogene BG7060 da Pioneer. A versão isogênica convencional, sem transgenes, é a BG7060 (*NGM*). Os híbridos transgênicos são o BG7060H (*Hx*) que contém a tecnologia *Herculex I* (evento TC1507) e BG7060HR (*Hxrr*) que contém a tecnologia *Roundup Ready 2*, além da *Herculex I* (eventos NK603 e TC1507). O evento TC1507 contém dois transgenes: cry1F e pat. O transgene cry1F codifica uma delta-endotoxina (Cry1F) letal a insetos da ordem Lepidóptera, o transgene pat codifica a enzima fosfinotricina-N-acetil transferase (PAT), que confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio. O evento NK603 contém o transgene cp4 epsps responsável pela expressão da proteína CP4-EPSPS, que confere tolerância ao herbicida Roundup (AGBIOS, 2008).

A partir desses quatro genótipos de milho foram obtidas populações contendo diferentes *backgrounds* genéticos. Foram feitas polinizações manuais controladas, de forma que o pólen coletado de cada híbrido foi usado para polinizar o milho crioulo, o qual foi despendoado para evitar a dispersão de pólen. Foram conduzidos, a campo, duas gerações de cruzamentos controlados para desenvolver as populações e após a obtenção do material foi implantado o experimento a campo (ver esquema das polinizações em APÊNDICE A).

A primeira geração foi destinada a obtenção das progênes F1, resultantes dos cruzamentos entre a variedade *RS* e cada um dos híbridos

isogênicos separadamente (NGM, Hx e Hxrr). Os cruzamentos foram realizados em área experimental da UFSC, no Centro de Ciências Agrárias – CCA, Florianópolis, SC, Brasil (27° 34' 57.72" S; 48° 30' 18.65" O), de março a julho de 2012. As fileiras de plantas de milho tinham cinco metros lineares, espaçadas um metro entre si. A distância entre plantas foi de 0,20 m, totalizando 25 plantas por linha (50.000 plantas ha⁻¹). Após uma semana da semeadura das linhas de milho crioulo, foram semeadas linhas de cada híbrido. Após mais uma semana foram semeadas mais outras linhas de híbridos. Com base nessa prática, foi possível garantir a disponibilidade de pólen dos híbridos para fecundar o milho crioulo, visto que os híbridos costumam ser mais precoces e não se conhecia o ciclo das cultivares previamente. Foram realizadas polinizações coletando o pólen dos três híbridos isogênicos (NGM, Hx e Hxrr) separadamente, visando polinizar as espigas do crioulo RS e gerar três progênes F1, cada uma contendo 50% de composição genética de cada genitor. Essa primeira geração de cruzamentos foi constituída de aproximadamente 200 plantas e ocupou uma área de 100 m² (ver croqui em APÊNDICE B).

Na segunda geração foram realizados os retrocruzamento das progênes F1 com os respectivos genitores de cada progênie F1, assim como a recombinação entre os indivíduos F1, que deram origem às três populações F2. A partir dos retrocruzamento foram desenvolvidas seis populações RC1F1, das quais três possuíam em média 25% dos genes dos genitores híbridos (25% de NGM, 25% de Hx e 25% de Hxrr) e as outras três populações continham em média 75% desses mesmos *backgrounds* genéticos. Essa segunda etapa de desenvolvimento do material vegetal para essa pesquisa foi realizada na Fazenda Experimental da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil (27° 41' 07.86" S; 48° 32' 36.60" O), de setembro de 2012 a janeiro de 2013. Os campos de polinização foram implantados em duplicata a fim de garantir um maior número de plantas com espigas polinizadas. A densidade de plantas e a estrutura de parcelas foram de acordo com as utilizadas na primeira geração. Essa etapa de geração de material constituiu-se de aproximadamente 800 plantas e ocupou uma área de 630 m² (ver croqui em APÊNDICE C). Os *backgrounds* genéticos com seus respectivos graus de introgressão estão representados na Tabela 3.

Tabela 3. Descrição dos *backgrounds* genéticos das populações de milho com introgressão dos híbridos

Populações*	<i>Background</i> genético (%)	
	RS	Híbrido
<i>NGM-75</i>	25	75
<i>NGM-50</i>	50	50
<i>NGM-25</i>	75	25
<i>Hx-75</i>	25	75
<i>Hx-50</i>	50	50
<i>Hx-25</i>	75	25
<i>Hxrr-75</i>	25	75
<i>Hxrr-50</i>	50	50
<i>Hxrr-25</i>	75	25

*RS: variedade crioula; *NGM*: híbrido convencional não-geneticamente modificado; *Hx*: híbrido transgênico contendo o evento TC1507; *Hxrr*: híbrido transgênico contendo os eventos TC1507 e NK603. Seguidos pelos números 25, 50 e 75 de acordo com o *background* genético de cada híbrido sobre a variedade crioula.

Seleção do estágio fenológico para avaliação

No Capítulo 1 da presente tese concluiu-se que os estádios V3 e V4 separavam melhor os fungos endofíticos associados aos transgenes daqueles associados a isogênica convencional. Porém, no estágio R1 foi possível diferenciar os endofíticos associados aos dois híbridos transgênicos avaliados. Portanto, realizou-se análises com as progênes F1, contendo 50% da composição genética proveniente de cada híbrido. Uma vez que os resultados encontrados no Capítulo 1 poderiam ser diferentes na avaliação de populações de milho crioulo que já sofreram uma geração de contaminação. Portanto, durante a segunda geração de tratamentos a campo, foram realizadas análises para definir o estágio fenológico em que a comunidade de fungos endofíticos do milho sofresse mais alterações devido ao fluxo gênico. Para isso, foram utilizadas as populações F1 implantadas no ensaio 2, oriundas do cruzamento entre o milho crioulo *RS* e cada um dos três híbridos separadamente, das quais coletou-se folhas jovens e sadias de três plantas em quatro estádios distintos (28, 50, 73 e 91 dias após a semeadura, denominados como V3,

V4, R1 e R2, descritos no Capítulo 1). A estrutura de comunidade de fungos endofíticos foi avaliada por PCR-DGGE, cuja metodologia será descrita posteriormente.

Condições do experimento a campo

O experimento foi realizado na Fazenda Experimental da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil (27° 41' 07.86" S; 48° 32' 37.60" O). O solo da área experimental foi classificado como Neossolo Quartzarênico Hidromórfico Típico, de acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação dos Solos (EMBRAPA, 2006). Segundo a classificação climática de Köppen, a Fazenda situa-se numa sub-região de clima subtropical constantemente úmido, sem estação seca e com verão quente. Durante o período do experimento, 74 dias desde a semeadura até a coleta das folhas, a temperatura média foi de 20,9 °C, com mínima registrada de 6,0 °C e máxima de 30,8 °C. O total de chuvas acumulado no período foi de 273 mm (APÊNDICE F) (Fonte: estação meteorológica Epagri/Ciram).

O experimento foi implantado a campo (Mar/2013), no delineamento experimental em blocos casualizados com três repetições. Cada bloco foi formado por três parcelas referentes aos três híbridos (*NGM*, *Hx* e *Hxrr*) e cada parcela foi dividida em cinco subparcelas, correspondente aos três *backgrounds* (25%, 50% e 75%), além de mais duas parcelas, uma delas referente a um dos híbridos puros (100% de *NGM*, *Hx* ou *Hxrr*) e a outra ao Rosado. As subparcelas foram constituídas por quatro fileiras de cinco metros lineares, espaçadas um metro entre si. A distância entre plantas foi de 0,20 m totalizando 100 plantas por subparcela. Em razão da variabilidade do milho crioulo, ao invés de uma subparcela por bloco, optou-se por incluir três subparcelas, a fim de melhor representar essa amostra. Esse ensaio constituiu-se de aproximadamente 4500 plantas e ocupou uma área de 1500 m² (ver croqui em APÊNDICE E).

Os tratos culturais foram homogêneos para toda a área do experimento. A adubação foi realizada junto ao plantio e as doses foram calculadas com base na análise química do solo (ANEXO A) de acordo com as recomendações de adubação para a cultura do milho (Comissão de Química e Fertilidade do Solo – RS/SC, 2004). Foi adicionado nitrogênio nas doses de 80 kg ha⁻¹ (Blocos 1, 2 e 3), fósforo nas doses de 85 kg ha⁻¹ (Bloco 1) e 125 kg ha⁻¹ (Blocos 2 e 3) e potássio nas doses de 110 kg ha⁻¹ (Bloco 1) e 85 kg ha⁻¹ (Blocos 2 e 3). O controle de plantas

espontâneas foi feito por meio de capinas manuais e não foi aplicado qualquer tipo de agroquímico no local durante o experimento.

Coleta do material vegetal

A coleta procedeu-se quando as plantas estavam no início do período reprodutivo (R1), apresentando oito folhas expandidas e a última folha enrolada, de onde saiu o pendão, aos 74 dias após a semeadura.

Foi selecionada uma folha jovem por planta, sem sintomas de doenças ou ataque de pragas, de 10 plantas escolhidas ao acaso, na região central de cada subparcela. A partir da folha selecionada cortou-se a região mediana, incluindo as nervuras, com o auxílio de uma tesoura, a qual foi desinfetada em álcool 70% previamente a cada amostragem.

Foram coletadas 10 amostras de cada subparcela, de 13 tratamentos, e mais duas subparcelas para o RS em três repetições, totalizando 450 amostras para as análises posteriores. As folhas foram acondicionadas individualmente em sacos plásticos, mantidas em caixa térmica contendo gelo durante a coleta e transporte, sendo posteriormente armazenadas em ultra freezer a -80 °C até a extração de DNA.

Extração de DNA

Foi realizada a desinfecção superficial das folhas de milho mediante imersão por 2 min em álcool 70%, 5 min em hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) (V/V), 1 min em álcool 70% e imersão em água destilada esterilizada, quatro vezes por 1 min. Da última água de lavagem foi feita PCR com primers específicos para fungos e foi confirmada a eliminação de epifíticos nas folhas (dados não apresentados).

Após a desinfecção superficial as amostras de tecido foliar foram maceradas com auxílio de almofariz e pilão de porcelana em nitrogênio líquido e, aproximadamente 100 mg, foram acondicionados em tubos de 1,5 mL contendo 600 µL de CTAB 2% pré-aquecido (2% de brometo de cetiltrimetilamônio - CTAB; 1,4 M de NaCl; 100 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 20 mM de EDTA, pH 8,0; 0,2% de betamercaptoetanol). Os tubos foram colocados em banho-maria a 65 °C por 1 h, agitando-os a cada 15 min. Na sequência tirou-se os tubos do banho sendo deixados em bancada até atingir temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 500 µL de uma solução contendo fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (na proporção 25:24:1), procedendo-se agitação suave dos tubos por 10 minutos. Posteriormente foram submetidos a centrifugação de 6000 g por 10 minutos. O líquido sobrenadante (em torno de 400 µL) foi transferido

com cuidado para novos tubos, nos quais foram adicionados 500 μL de isopropanol gelado para promover a precipitação do DNA. Os tubos foram colocados em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após 24 h as amostras foram centrifugadas a 12000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado com cuidado para não perder o pélete e o tubo invertido em papel toalha para eliminar os resíduos líquidos. Em seguida foram efetuadas duas lavagens com álcool 70% gelado por três minutos, invertendo os tubos suavemente e ao fim descartando o líquido. Por fim, foi feita mais uma lavagem com álcool absoluto gelado e, após essa lavagem, os tubos ficaram abertos por 15 minutos em câmara de fluxo para evaporação total dos resíduos de álcool. O pélete foi ressuspensionado em 50 μL de TE e 2 μL de RNase, mantendo-se as amostras em temperatura ambiente por duas horas, agitando os tubos a cada 15 minutos. Após esse período o DNA foi armazenado em ultra freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização das PCRs (DOYLE & DOYLE, 1990).

A integridade do DNA foi confirmada em eletroforese horizontal, em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X (50 mM de Tris; 50 mM de ácido acético glacial; 25 mM de EDTA), por 60 min a 60 V e corado com Sybr Green (Life Technologies, São Paulo, Brasil). A aquisição das imagens dos géis foi feita com câmera digital comum. Todas as amostras foram quantificadas em nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, EUA) para atestar sua qualidade (razão 260/280) e a quantidade de DNA em $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$. Com esses valores foi possível compor uma amostra de 100 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, igualmente representada pelas 10 plantas de cada tratamento (APÊNDICE G).

Deteção de transgenes - evento TC1507

Para confirmação da eficácia dos cruzamentos e da presença ou ausência de transgenes nas plantas de milho foram feitas PCRs a partir do DNA genômico extraído, com primers para deteção parcial do evento TC1507. Cada amostra foi composta por 10 plantas distintas da mesma subparcela.

Para tanto, foi utilizado o DNA extraído das folhas de milho das mesmas plantas utilizadas para avaliação de endofíticos, conforme descrito no item anterior. A região do evento TC1507 foi amplificada parcialmente com os primers *TC1507f* (5' CTT GTG GTG TTT GTG GCT CT 3') e *TC1507r* (5' TGG CTC CTC CTT CGT ATG T 3') (LI et al., 2009), nas seguintes condições: solução tampão 1X para Taq DNA polimerase contendo 0,2 mM dNTPs, 2,5 mM MgCl_2 , 1 U DNA polimerase Taq (Life Technologies, São Paulo, Brasil), 10 mM dos

primers e 100 ng do DNA metagenômico, para um volume final de 25 µL. As condições de amplificação da PCR no termociclador (T-100, BioRad, Hercules, CA, EUA) foram 8 min a 95 °C; 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 58 °C e 50 s a 72 °C e extensão final por 8 min a 72 °C (LI et al., 2009).

Os produtos da PCR foram corados com Sybr Green (Life Technologies, São Paulo, Brasil), submetidos a eletroforese horizontal em gel de agarose 2% em tampão TAE 1X, por 90 min, a 60 V. A aquisição das imagens dos géis foi feita em fotodocumentador QuemiDoc MP (BioRad, Hercules, CA, EUA).

Além da avaliação por PCR, realizou-se a detecção da proteína Cry1F, que está presente nos dois híbridos transgênicos utilizados nesse estudo, através do kit *QuickStix*, conforme as recomendações do fabricante (Envirologix, Portland, EUA).

Comunidade de fungos endofíticos por PCR-DGGE

A estrutura das comunidades de fungos endofíticos das folhas de milho foi avaliada por PCR-DGGE. Foi feita a amplificação parcial da região SSU (18S rDNA) com os iniciadores FR1GC (5' GCC CGC CGC GCG CGG CGG GCG GGG CGG GGG AIC CAT TCA ATC GGT AIT 3') e FF390 (CGA TAA CGA ACG AGA CCT) (VAINIO & HANTULA, 2000). A reação foi feita em solução tampão 1X, contendo 0,2 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂, 1 U DNA polimerase Taq (Life Technologies, São Paulo, Brasil), 10 mM dos primers e 100 ng do DNA metagenômico, para um volume final de 25 µL. As condições de amplificação no termociclador modelo T-100 (BioRad, Hercules, CA, EUA) foram 8 min a 95 °C; 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 45 s a 50 °C e 2 min a 72 °C e extensão final por 10 min a 72 °C. Os produtos da PCR foram corados com Sybr Green (Life Technologies, São Paulo, Brasil), submetidos a eletroforese horizontal em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X, por 60 min, a 60 V. A aquisição das imagens dos géis feita em fotodocumentador Fusion (Vilber Loumart, Paris, França).

Os produtos amplificados foram analisados por meio de eletroforese em gel com 8% (m/V) de acrilamida:bisacrilamida (37,5: 1, m:m), contendo um gradiente de 25 a 65% de formamida e ureia (ØVREÅS et al., 1997). A eletroforese foi realizada à 200 V e 60 °C constantes, por 4h e 30 min, utilizando-se um sistema "DCode" (BioRad, Hercules, CA, EUA) e tampão TAE 1X. O DNA foi corado com Sybr Safe (Life Technologies, São Paulo, Brasil) e a aquisição das imagens dos

géis foi feita em fotodocumentador QuemiDoc MP (BioRad, Hercules, CA, EUA).

Análises estatísticas

Os perfis de amplicons obtidos nos géis de DGGE foram analisados pelo software GelCompar II versão 6.5 (BioSystematica, Wales, UK), no qual foi possível normalizar o gel com base nos marcadores utilizados. As bandas presentes foram marcadas e o software gerou uma planilha de presença e ausência, a partir da qual gerou-se a matriz de similaridade que foi utilizada para a análise de cluster, utilizando o índice de *Jaccard* e o modelo de agrupamento por UPGMA, no software PAST 3.04 (HAMMER, HARPER, RYAN, 2001). Nesse mesmo software foi feito o teste de similaridade de ANOSIM, utilizando o coeficiente de *Jaccard*. A planilha de presença e ausência de amplicons, gerada no programa GelCompar II, foi utilizada para os cálculos do diagrama de Venn (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

RESULTADOS

Definição do estágio fenológico a ser analisado

Conforme os resultados apresentados na Tabela 4 foi possível observar, a partir da análise da estrutura da comunidade de fungos endofíticos das populações F1, que nos estádios V3, V4 e R1 houve separação entre as populações de milho crioulo que sofreram introgressão de híbridos com dois eventos de transgenia (*Hxrr/RS*), das populações sem transgenes (*NGM/RS*). Em nenhum estágio observou-se diferenças significativas entre *NGM/RS* e *Hx/RS* que continha apenas um evento transgene. Contudo, no estágio R1 ainda foi possível observar diferença significativa entre as populações de milho crioulo que sofreram introgressão com os dois tipos de transgenes, *Hx/RS* de *Hxrr/RS*. Portanto, esse estágio foi selecionado para a comparação da estrutura da comunidade de fungos endofíticos de milho no experimento a campo com todas as populações de milho geradas.

Tabela 4. Resultado do teste de ANOSIM por *Pairwise* (pareamento) baseado nos perfis de amplicons do gene *ssu* (18S rDNA) de fungos endofíticos de plantas de milho

<i>Teste de Pairwise*</i>		
Tratamentos	NGM/RS	Hx/RS
V3		
NGM/RS	-	
Hx/RS	0.481	-
Hxrr/RS	1.000 [#]	0.481
V4		
NGM/RS	-	
Hx/RS	0.351	-
Hxrr/RS	0.925 [#]	0.777
R1		
NGM/RS	-	
Hx/RS	0.000	-
Hxrr/RS	1.000 [#]	1.000 [#]
R2		
NGM/RS	-	
Hx/RS	0.000	-
Hxrr/RS	0.518	0.555

*(R global = 0.921; $P < 0.001$); [#] Diferença significativa. V3, V4, R1 e R2 referem-se aos estádios fenológicos avaliados; Os tratamentos NGM/RS,

Hx/*RS* e *Hxrr*/*RS* possuem 50% da composição genética de milho híbrido e 50% de milho crioulo Rosado.

Deteção de transgenes - evento TC1507

A presença do evento TC1507 foi verificada nas cultivares transgênicas *Hx* e *Hxrr* e nas populações geradas que continham esses eventos. A ausência do mesmo evento foi confirmada no híbrido convencional *NGM*, na variedade crioula *RS*, bem como nas populações geradas a partir do cruzamento desses genótipos. Com base nesses resultados foi possível verificar que os tratamentos atendiam as especificações genéticas atestadas (Figura 9). Além disso, foram observadas duas faixas de coloração roxa nas tiras com os transgenes *Hx* e *Hxrr*, confirmando a presença da proteína e apenas uma faixa roxa nas tiras com os tratamentos sem transgenia *RS* e *NGM*, o que confirma que a tira estava funcionando e que não foi detectado transgenia (dados não apresentados).

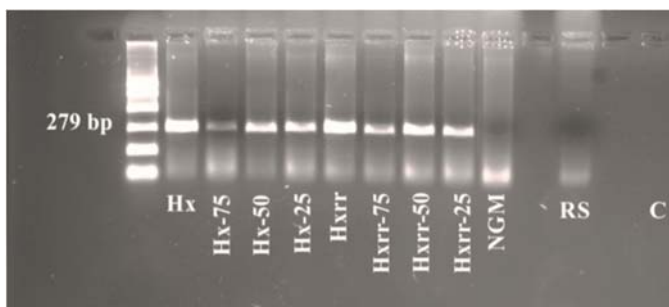


Figura 9. Imagem da amplificação parcial do gene TC1507 com aproximadamente 279 pb. Onde *RS*, *NGM*, *Hx* e *Hxrr* referem-se aos tratamentos, representados pelo DNA de amostras compostas, obtidas a partir de 10 plantas distintas. Os números 25, 50 e 75 referem-se a percentagem genética do híbrido, o restante refere-se ao milho crioulo. *C* refere-se ao controle negativo.

Comparação das Comunidades de Fungos Endofíticos

A imagem do gel após DGGE, com o perfil de amplicons das comunidades de fungos endofíticos do milho estão apresentadas na Figura 10. A comunidade fúngica foi influenciada pelos genótipos de milho, com diferenças de até 40% quando comparadas pela análise de cluster (Figura 11). Pode-se observar que a estrutura da comunidade de fungos do *RS* difere das demais populações de milho, até mesmo nas populações que

contém 75% de *RS*. Isso sugere que uma ocorrência de fluxo gênico já é suficiente para alterar a comunidade de fungos endofíticos, mesmo que na próxima geração não ocorra contaminação, tal como ficou evidenciado pelos tratamentos oriundos do retrocruzamento da F1 com o parental crioulo (*NGM-25*, *Hx-25* e *Hxrr-25*), cujo reestabelecimento da comunidade fúngica não ocorreu (Figura 11 e Tabela 5).

Com base no teste de ANOSIM (Tabela 5) pode-se observar que o híbrido convencional *NGM* não é diferente do híbrido transgênico com um evento *Hx*, mas os dois diferem do híbrido com dois eventos de transgenia *Hxrr*. Durante a seleção do estágio fenológico, na segunda geração a campo de tratamentos as progênies F1 entre *NGM* e *RS* e *Hx* e *RS* também foram semelhantes entre si, porém optou-se por avaliar essas populações novamente, visto que em um experimento onde um maior número de plantas avaliado poderiam ser observadas maiores diferenças entre essas populações, em um experimento onde um maior número de plantas é avaliado, porém isso não foi constatado.

O híbrido *Hxrr* e as populações geradas entre este e o milho crioulo *RS* formaram grupos distintos, diferenciando-se de todas as outras populações avaliadas. Esse resultado indica que o *Hxrr* teve maior influência na composição da comunidade de fungos, quando comparado aos outros dois híbridos avaliados. Apenas os resultados das populações *Hxrr-25* e *Hxrr-50* não foram significativamente diferentes entre si. Isso indica que o transgene *Hxrr* afetou a comunidade de fungos endofíticos, porém ainda não é possível afirmar se esse efeito é decorrente da presença exclusiva do evento NK603, ou da combinação desse com o evento Tc1507. Para isso, trabalhos futuros serão realizados avaliando mais um híbrido isogênico que contenha apenas o evento NK603.

A importância do retrocruzamento da F1 com o parental crioulo foi para observar se a comunidade de fungos endofíticos retornaria à condição original no caso de não ocorrer fluxo gênico recorrente dos híbridos nessa população, mas isso não foi constatado. Já o retrocruzamento com os parentais híbridos, que resultou em 75% da composição genética dos híbridos nas populações obtidas, não diferiram dos materiais com 50% do mesmo híbrido.

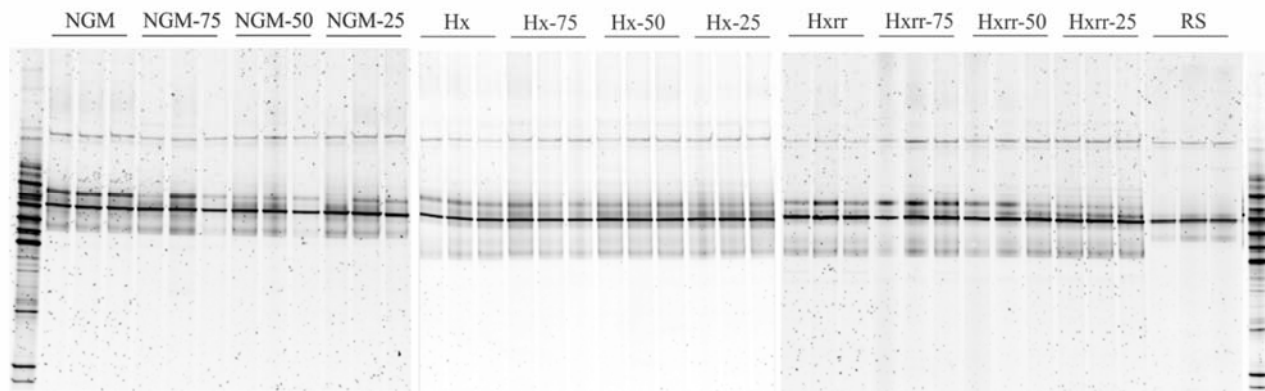


Figura 10. Imagem dos géis de DGGE de fungos endofíticos, com três repetições de cada tratamento avaliado. Onde *RS*, *NGM*, *Hx* e *Hxrr* referem-se aos tratamentos, representados pelo DNA de amostras compostas, obtidas a partir de 10 plantas distintas. Os números 25, 50 e 75 referem-se a percentagem genética do híbrido, o restante é refere-se ao milho crioulo.

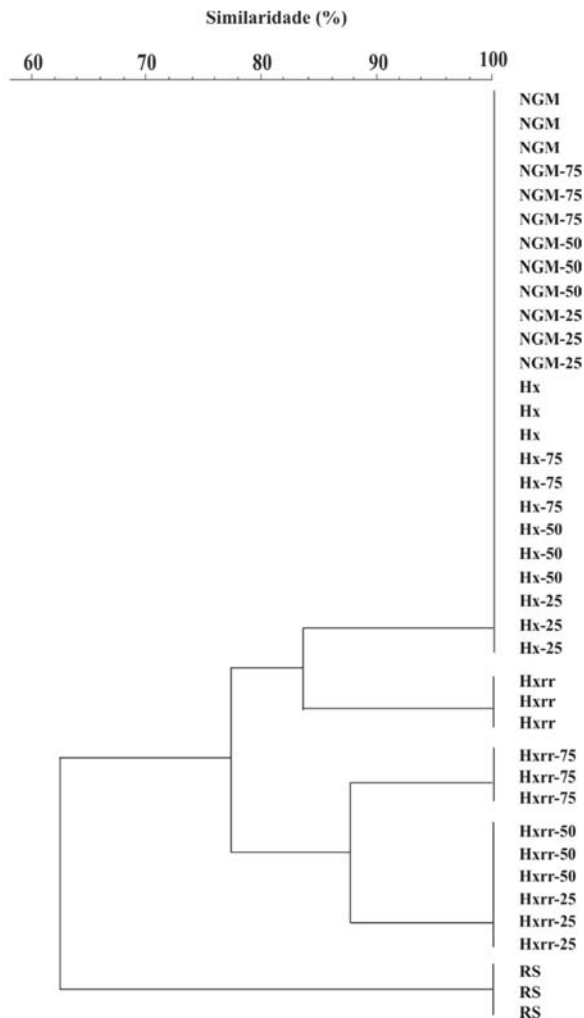


Figura 11. Agrupamento hierárquico da estrutura de comunidades de fungos endofíticos de populações de milho contendo diferentes *backgrounds* genéticos de introgessão de genes obtida por PCR-DGGE. Onde *RS*, *NGM*, *Hx* e *Hxrr* referem-se aos tratamentos. Os números 25, 50 e 75 referem-se a percentagem genética do híbrido.

Apenas oito amplicons representaram a comunidade de fungos endofíticos das populações avaliadas. Três desses foram comuns a todos os tratamentos e a presença exclusiva de poucos amplicons promoveu a diferenciação das populações contendo o transgene *Hxrr*. As populações de milho *RS* contendo em média 25%, 50% e 75% de genes de *Hxrr* foram diferentes dos demais tratamentos avaliados, em razão de possuírem dois amplicons exclusivos (Figura 12).

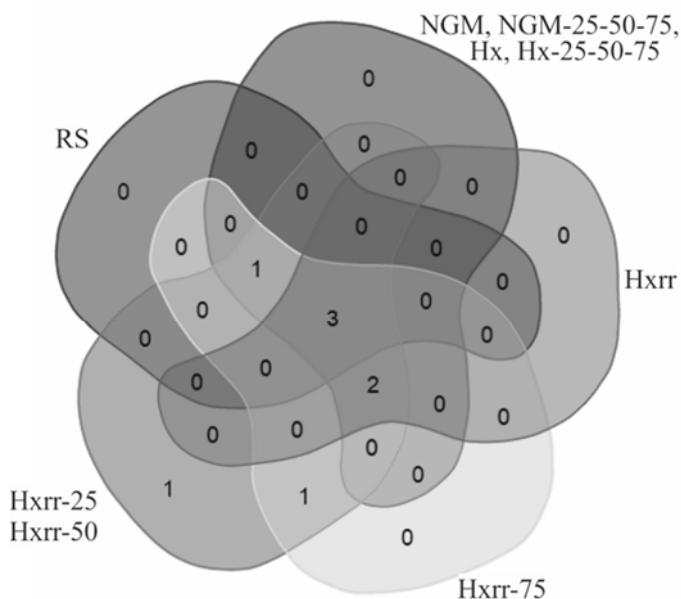


Figura 12. Diagrama de Venn obtido da planilha de presença e ausência da estrutura de comunidades de fungos endofíticos. Onde *RS*, *NGM*, *Hx* e *Hxrr* referem-se aos tratamentos. Os números 25, 50 e 75 referem-se a percentagem genética do híbrido.

Tabela 5 Resultado do teste de ANOSIM por *Pairwise* (pareamento) baseado nos perfis de amplicons do gene *ssu* (18S rDNA) de fungos endofíticos de plantas de milho

Tratam.	Teste de Pairwise*												
	<i>RS</i>	<i>NGM</i>	<i>NGM-75</i>	<i>NGM-50</i>	<i>NGM-25</i>	<i>Hx</i>	<i>Hx-75</i>	<i>Hx-50</i>	<i>Hx-25</i>	<i>Hxrr</i>	<i>Hxrr-75</i>	<i>Hxrr-50</i>	
<i>RS</i>	-												
<i>NGM</i>	1.000 [#]	-											
<i>NGM-75</i>	1.000 [#]	0.000	-										
<i>NGM-50</i>	1.000 [#]	0.000	0.000	-									
<i>NGM-25</i>	1.000 [#]	0.000	0.000	0.000	-								
<i>Hx</i>	1.000 [#]	0.000	0.000	0.000	0.000	-							
<i>Hx-75</i>	1.000 [#]	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-						
<i>Hx-50</i>	1.000 [#]	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-					
<i>Hx-25</i>	1.000 [#]	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-				
<i>Hxrr</i>	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	-			
<i>Hxrr-75</i>	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	-		
<i>Hxrr-50</i>	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	-	
<i>Hxrr-25</i>	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	1.000 [#]	0.000

*(R global = 0.6282; $P < 0.001$); [#] Diferença significativa.

DISCUSSÃO

Avaliou-se a comunidade de fungos endofíticos das folhas de plantas de milho crioulo com diferentes graus de introgressão de híbridos transgênicos. A estrutura de comunidade de fungos endofíticos foi afetada pela composição genética das populações avaliadas.

Apesar desse estudo ter avaliado genótipos de milho transgênico resistentes aos herbicidas glufosinato de amônio e glifosato, optou-se por não aplicá-los na área experimental uma vez que o objetivo desse estudo foi simular a introgressão genética que pode ocorrer sobre o milho crioulo em seu agroecossistema. Nesses casos de contaminação indesejável e desconhecida, o agricultor continuará cultivando o milho crioulo da mesma forma que tradicionalmente o faz, ou seja, sem a aplicação desses agroquímicos. Além disso, alguns estudos detectaram alterações no metabolismo e crescimento de microrganismos endofíticos quando expostos a herbicidas (ZAIN et al., 2013; MARTINS et al., 2011).

Em geral, os resultados encontrados na literatura baseiam-se na comparação de microrganismos do solo, da rizosfera e fungos micorrízicos arbusculares (FMA) obtidos de plantas transgênicas e suas isogênicas convencionais. Estudos comparando híbridos de milho contendo transgenes *Bt* (Cry1Ab; Cry34/35Ab1; Cry3Bb1 e Cry1F) com as suas isogênicas convencionais, em condições controladas, demonstraram que os transgênicos apresentaram menores taxas de colonização por FMA (CHEEKE, ROSENSTIEL & CRUZAN, 2012; CASTALDINI et al., 2005). Entretanto, não foi observado efeito da transgenia em árvores de álamo sobre a diversidade de fungos da rizosfera e do solo (DANIELSEN et al., 2012).

Nesses casos, é relevante considerar que a comunidade microbiana da rizosfera é fortemente influenciada pelos exsudatos das plantas e também pela composição da microbiota do solo, fator esse que talvez não permita observar as diferenças entre plantas com e sem transgenia. Os exsudatos das raízes das plantas são ricos em matéria orgânica solúvel (MOS) e são fontes de carbono e energia para os microrganismos do solo, promovendo a atividade da microbiota na rizosfera (PHILLIPS, FINZI & BERNHARDT, 2011; HAMILTON & FRANK 2001). Outro estudo também confirmou que a biomassa microbiana é de três a sete vezes maior na rizosfera de plantas vivas do que em raízes em decomposição (SHAZAD et al., 2015). Assim, o ambiente da rizosfera é muito rico e diverso, promovendo a resiliência da comunidade microbiana, processo

esse que pode dificultar as análises que buscam comparar os efeitos dos genótipos de plantas sobre a microbiota associada às mesmas.

Por outro lado, os microrganismos endofíticos do microbioma foliar podem ser avaliados como organismos não-alvo dos transgênicos, pois são intimamente relacionados com as plantas associadas e ainda são pouco conhecidos quanto a sua diversidade e variação, em resposta ao genótipo e ao estágio fenológico da planta (PENUELAS & TERRADAS, 2014).

Nesse estudo, foram observadas diferenças entre as populações sem transgenia daquelas que continham o transgene com dois eventos *Hxrr*. Isso sugere que a expressão dos transgenes, interação entre eles ou até mesmo a epistasia entre esses e o genoma do milho, podem afetar a comunidade de fungos endofíticos. Lohn (2014) avaliou o mesmo material vegetal do presente trabalho e observou que os grupos funcionais proteínas e carboidratos sofreram alterações, na avaliação de grãos inteiros por Drifts, quando comparado o milho crioulo *RS* com as populações de *RS* contendo as introgressões com o híbrido transgênico *Hxrr*. Assim, pode-se inferir que houve alterações significativas quando o milho crioulo sofre introgressões do híbrido *Hxrr*, tanto sobre os fungos endofíticos quanto sobre o metaboloma dos grãos.

Segundo o parecer técnico da CTNBio (Nº 2053/2009) sobre a cultivar BG7060HR correspondente ao *Hxrr* desse estudo não há comprovação da interação entre os eventos TC1507 e NK603, uma vez que foram feitas avaliações comparando essa cultivar com as cultivares contendo os eventos isolados, e para todos os itens avaliados (não especificado no relatório) não houve diferença (CTNBio, 2009). Porém, nesse estudo pode-se observar que os fungos endofíticos das folhas de milho foram diferentes entre o híbrido *Hxrr*, que contém os dois eventos TC1507 e NK603, e o híbrido *Hx* que contém apenas o evento TC1507.

A comunidade de fungos endofíticos sofreu alterações devido ao fluxo gênico entre plantas de milho híbrido e crioulo. As plantas de milho crioulo que sofreram introgressão de um híbrido transgênico ou convencional em uma geração e receberam novamente pólen de milho crioulo na geração seguinte (*NGM-25*, *Hx-25* e *Hxrr-25*), não retornaram à estrutura de comunidade de fungos observada inicialmente nas plantas de milho crioulo. Com base nisso, é possível inferir que uma vez modificada a diversidade de fungos endofíticos, a mesma poderá se perpetuar junto às sementes para as próximas gerações. Além disso, um estudo observou que grupos específicos de bactérias endofíticas foram similares entre o teosinto (ancestral do milho) e variedades/cultivares

modernas de milho, sugerindo que as bactérias são levadas juntamente com as sementes (JOHNSTON-MONJE & RAIZADA, 2011). Assim, os parâmetros estabelecidos no caso de coexistência devem ser mais cautelosos, visto que apenas uma ocorrência de fluxo gênico já pode provocar diferenças significativas nas comunidades de fungos endofíticos das folhas.

O transgene com apenas um evento (*Hx*) e suas populações de introgressão não foram diferentes das populações do híbrido convencional (*NGM*), demonstrando que a transgenia referente apenas ao evento TC1507 não foi impactante sobre a comunidade de fungos endofíticos. Já as introgressões referentes ao transgene contendo os dois eventos (TC1507 e NK603) foram diferentes das demais populações.

A estrutura e composição da comunidade de microrganismos endofíticos das plantas pode estar relacionada a resposta das mesmas ao ambiente de cultivo, no caso de estresses bióticos (resistência a patógenos e pragas) e abióticos (resistência ao calor, estresse hídrico etc) seria a capacidade de resistir e se desenvolver em tais condições. Para testar essas hipóteses trabalhos futuros deverão ser conduzidos de forma a submeter as populações geradas (*background* de fluxo gênico) nesse estudo, a diferentes tipos de estresses, como por exemplo ao fungo patogênico *Exserohilum turcicum*. Outros cenários incluem submeter as populações de milho a condições de estresse hídrico, comum na atualidade, sobretudo na região Oeste do Estado.

Além disso, sob condições de estresse as plantas são mais dependentes dos microrganismos, pois eles são capazes de aumentar a atividade metabólica e combater o estresse (KAVAMURA et al., 2013). Estudos recentes já demonstraram que as plantas apresentam melhores respostas ao estresse ambiental quando em associação com determinado microrganismo endofítico. Foi constatada maior resistência de plantas de milho ao estresse hídrico quando as mesmas estavam em associação com bactérias endofíticas, tais como *Burkholderia phytofirmans* e *Enterobacter* sp., nas folhas e raízes das plantas (NAVEED et al., 2014). Foi verificadas alterações na interação entre fungos e plantas, quando em condições de estresse hídrico (WORCHEL et al., 2013). Plantas de arroz associadas com os fungos endofíticos *Fusarium culmorum* e *Culvularia protuberata* apresentaram melhor adaptação a condições de frio e alta salinidade (REDMAN et al., 2011).

Dessa forma, os resultados futuros sobre os efeitos da introgressão de transgenes na resposta das plantas ao ambiente poderão servir para discutir as consequências diretas e indiretas no agroecossistema. Essas

informações são ainda mais relevantes para os casos como da agricultura familiar onde o risco de contaminação é alto e existem muitas variedades crioulas de milho que deveriam ser conservadas e protegidas do fluxo gênico de híbridos. Assim, esses e outros resultados futuros do NEABio poderão servir de base para inferir sobre as normas de coexistência entre milho transgênico e convencional, com base no princípio da precaução.

CONCLUSÃO

Nesse estudo conclui-se que a ocorrência de sucessivas introgressões com pólen de milho híbrido provoca alterações nos fungos endofíticos foliares do milho crioulo Rosado. A estrutura de comunidade de fungos endofíticos sofreu maiores alterações quando as introgressões eram provenientes do híbrido com dois eventos. Pode-se inferir que uma vez modificada a comunidade de fungos endofíticos do milho crioulo, a mesma não retornará a sua condição original, o que justifica ainda mais os cuidados na questão da coexistência entre milhos crioulos e híbridos com e sem transgenia.

REFERÊNCIAS

- AGBIOS, **Information on GM Approved Products (2008)**. Disponível em: <<http://www.agbios.com/dbase.php>>. Acesso em: 23 Set. 2012.
- ANDREOTE FD, CARNEIRO RT, SALLES JF, MARCON J, LABATE CA, AZEVEDO JL, ARAUJO WL. Culture-independent assessment of Alphaproteobacteria related to order Rhizobiales and the diversity of cultivated Methylobacterium in the rhizosphere and rhizoplane of transgenic eucalyptus. **Microbial Ecology**, v.57, p.82–93, 2009b.
- ANDREOTE FD, MENDES R, DINI-ANDREOTE F, ROSSETTO PB, LABATE CA, PIZZIRANI-KLEINER CA, van ELSAS JD, AZEVEDO JL, ARAUJO WL. Transgenic tobacco revealing altered bacterial diversity in the rhizosphere during early plant development. **Antonie Leeuwenhoek**, v.93, p.415–424, 2008.
- ANDREOTE FD, ROSSETTO PB, MENDES R, AVILA LA, LABATE CA, PIZZIRANI-KLEINER AA, AZEVEDO JL, ARAUJO WL. Bacterial community in the rhizosphere and rhizoplane of wild type and transgenic eucalyptus. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v.25, p.1065–1073, 2009a.
- ANDREOTE, F.D.; Rocha, U.N.; Araújo, W.L.; Azevedo, J.L.; Overbeek, L.S. Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). **Antonie van Leeuwenhoek**, v.97, p.389-399, 2010.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, Jr., W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Eletronic Journal of Biotechnology**, 2000 [online]. Acesso em 11 Jul. 2014. Disponível em: <<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol3/issue1/full/4/reprint.html>>.
- BRASIL, 2007. MCT - Comissão técnica nacional de biossegurança. **Resolução Normativa nº 4, de 16/08/2007**, 2007. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/4687.html>>. Acesso em 12 Mar. 2012.
- CASTALDINI, M.; TURRINI, A.; SBRANA, C. et al. Impact of Bt Corn on Rhizospheric and Soil Eubacterial Communities and on Beneficial Mycorrhizal Symbiosis in Experimental Microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p. 6719–6729, 2005.

- CÉLERES. **Informativo biotecnologia**. Safra 2014/2015. Disponível em: < <http://www.celeres.com.br/wordpress/wp-content/uploads/2014/12/IB1403.pdf>>. Acesso em: 11 Jan. 2015.
- CHEEKE, T.E.; ROSENSTIEL, T.N.; CRUZAN, M.B. Evidence of reduced arbuscular mycorrhizal fungal colonization in multiple lines of bt maize. **American Journal of Botany**, v. 99, p. 700–707, 2012.
- COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 10 ed. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo/Núcleo Regional Sul, 2004. 400p.
- COSTA, F.M.; SILVA, N.C.A.; OGLIARI, J.B. Corn diversity in Southern Brazil: indication of a microcenter of *Zea mays* L. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 2015. (em revisão)
- CTNBio – Comissão Técnica Nacional De Biossegurança. **Parecer técnico nº 2053/2009**. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/14106.html>>. Acesso em 13 Jan. 2012.
- DANIELSEN, L.; THÜRMER, A.; MEINICKE, P.; BUÉE, M.; MORIN, E.; MARTIN, F.; PILATE, G.; DANIEL, R.; POLLE, A.; REICH, M. Fungal soil communities in a young transgenic poplar plantation form a rich reservoir for fungal root communities. **Ecology and Evolution**, v.2, p.1935–1948, 2012.
- DIAS, A. C. F.; DINI-ANDREOTE, F.; TAKETANI, R.G.; TSAI, S. M.; AZEVEDO, J. L.; MELO, I.S.; ANDREOTE, F.D. Archaeal communities in the sediments of three contrasting mangroves. **Journal Soils Sediments**, v.11, p.1466–1476, 2011.
- DOYLE, J.J.; DOYLLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.
- EK-RAMOS, M.J.; ZHOU, W.; VALENCIA, C.U.; ANTWI, J.B.; KALNS, L.L.; MORGAN, G.D. et al. Spatial and Temporal Variation in Fungal Endophyte Communities Isolated from Cultivated Cotton (*Gossypium hirsutum*). **PLoS ONE**, v.8, 2013.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro, RJ). **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. – Rio de Janeiro: EMBRAPA-SPI, 2006. 306p.
- EZCURRA, E.; ORTIZ, S.; SOBERON-MAINERO, J. Evidence of gene flow from transgenic maize to local varieties in Mexico. **Lmos and the environment: An international conference**. 2002.

- FAO: **FAO Statistical yearbook**. Roma. 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e.PDF>>. Acesso em: 15 Out. 2014.
- GANLEY RJ, SNIEZKO RA, NEWCOMBE G. Endophyte-mediated resistance against white pine blister rust in *Pinus monticola*. **Forest Ecology and Management**, v. 255, p. 2751–2760, 2008.
- HAMILTON, E.W.; FRANK, D.A. Can plants stimulate soil microbes and their own nutrient supply? Evidence from a grazing tolerant grass. **Ecology**, v.82, p. 2397-2402, 2001.
- HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. **Paleontologia Electronica**, v.4, 9 pp., 2001.
- IVERSEN, M.; GRØNSBERG, I.M.; van den BERG, J.; FISCHER, K.; AHETO, D.W.; BØHN, T. Detection of Transgenes in Local Maize Varieties of Small-Scale Farmers in Eastern Cape, South Africa. **PLoS ONE**, v. 9, e116147, 2014.
- JACOBSON, K.; MYHR, A.I. GM Crops and Smallholders: Biosafety and Local Practice. **Journal of Environment & Development**, v.22, p. 104-124, 2012.
- JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013. **ISAAA Brief**, n. 46. ISAAA: Ithaca, NY.
- JOHNSTON-MONJE, D. & RAIZADA, M.N. Conservation and Diversity of Seed Associated Endophytes in *Zea* across Boundaries of Evolution, Ethnography and Ecology. **PLoS ONE**, v. 6, e20396, 2011.
- KAVAMURA, V.N.; SANTOS, S.N.; SILVA, J.L.; PARMA, M.M.; ÁVILA, L.A.; VISCONTI, A. et al. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, v. 168, p. 183-191, 2013.
- KIRINO, P. Farmers and Food Security. IFA – FAO Agriculture Conference: Rome - Italy, 2003. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 05 Jul. 2014.
- KIST, V.; ALBINO, V.S.; MARASCHIN, M.; OGLIARI, J.B. Genetic variability for carotenoid content of grains in a composite maize population. **Scientia Agricola**, v. 1, p. 480-487, 2014.
- KUHNEN, S.; DIAS, P.; OGLIARI, J.B.; MARASCHIN, M. Brazilian Maize Landraces Silks as Source of Lutein: An Important Carotenoid in the Prevention of Age-Related Macular Degeneration, **Food and Nutrition Sciences**, v.3, p.1609-1614, 2012.

- LI, X.; RUI, J.; MAO, Y.; Yannarell, A.; MACKIE, R. Dynamics of the bacterial community structure in the rhizosphere of a maize cultivar. **Soil Biology and Biochemistry**, v.68, p.392–401, 2014.
- LI, X.; YANG, L.; ZHANG, J.; WANG, S.; SHEN, K.; PAN, L.; ZHANG, D. Simplex and Duplex Polymerase Chain Reaction Analysis of Herculex® RW (59122) Maize Based on One Reference Molecule Including Separated Fragments of 5_ Integration Site and Endogenous Gene. **Journal of AOAC International**, v. 92, p. 1472-1483, 2009.
- LOGARES, R.; SUNAGAWA, S.; SALAZAR, G.; CORNEJO-CASTILLO, F.M.; FERRERA, I.; SARMENTO, H. et al. Metagenomic 16S rDNA Illumina tags are a powerful alternative to amplicon sequencing to explore diversity and structure of microbial communities. **Environmental Microbiology**, v. 16, p. 2659–2671, 2014.
- LOHN, A. F. Metaboloma parcial de milho crioulo submetido a diferentes graus de fluxo gênico por cultivares geneticamente modificadas. **Dissertação** (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.
- MARTÍN, J.A.; WITZELL, J.; BLUMENSTEIN, K.; ROZPEDOWSKA, E.; HELANDER, M.; SIEBER, T.N.; GIL, L. Resistance to Dutch Elm Disease Reduces Presence of Xylem Endophytic Fungi in Elms (*Ulmus* spp.). **PLoS ONE**, v.8, 2013.
- MARTINS, P.F.; CARVALHO, G.; GRATÃO, P.L; DOURADO, M.N.; PILEGGI, M.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, R.A. Effects of the herbicides acetochlor and metolachlor on antioxidant enzymes in soil bacteria. **Process Biochemistry**, v.46, p.1186–1195, 2011.
- NAVEED, M.; MITTERA, B.; REICHENAUERB, T.G.; WIECZOREKC, K.; SESSITSCHA, A. Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by *Burkholderia phytofirmans* PsJN and *Enterobacter* sp. FD17. **Environmental and Experimental Botany**, v.97, p. 30 – 39, 2014.
- OGLIARI, J.B.; KIST, V.; CANCI, A. **The participatory genetic enhancement of a local maize variety in Brazil**. In: de Boef WS, Subedi A, Peroni N, Thijssen M, O’Keeffe E (ed) Community biodiversity management, promoting resilience and the conservation of plant genetic resources, 1rd edn. Abingdon, Oxon, p. 265-71, 2013.
- ØVREÅS, L., FORNEY, L., DAAE, F.L., TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by

- denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3367-3373, 1997.
- PEÑUELAS, J.; TERRADAS, J. The foliar microbiome. **Trends in Plant Science**, v.19, p.278-280, 2014.
- PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S.S. **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer Verlag, 1991. p. 179-197.
- PHILLIPS, R.P.; FINZI, A.C.; BERNHARDT, E.S. Enhanced root exudation induces microbial feedbacks to N cycling in a pine forest under long-term CO₂ fumigation. **Ecology Letters**, v.14, p. 187-194, 2011.
- PRAKAMHANG, J.; MINAMISAWA, K.; TEAMTAISON, K.; BOONKERD, N.; TEAUMROONG, N. The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). **Applied Soil Ecology**, v.42, p.41-149, 2009.
- QUIST, D.; CHAPELA, I.H. Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. **Nature**, 414 (6863), p. 541-543, 2001.
- RANGJAROEN, C.; RERKASEM, B.; TEAUMROONG, N.; SUNGTHONG, R.; LUMYONG, S. Comparative study of endophytic and endophytic diazotrophic bacterial communities across rice landraces grown in the highlands of northern Thailand. **Archives of Microbiology**, v. 196, p. 35-49, 2014.
- RASCHE, F.; VELVIS, H.; ZACHOW, C.; BERG, G.; VAN ELSAS, J.D.; SESSITSCH, A. Impact of transgenic potatoes expressing anti-bacterial agents on bacterial endophytes is comparable with the effects of plant genotype, soil type and pathogen infection. **Journal of Applied Ecology**, v.43, p.555- 556, 2006.
- REDMAN, R.S.; KIM, Y.; WOODWARD, C.J.D.A.; GREER, C.; ESPINO, L.; DOTY, S.L.; RODRIGUEZ, R.J. Increased Fitness of Rice Plants to Abiotic Stress Via Habitat Adapted Symbiosis: A Strategy for Mitigating Impacts of Climate Change. **Plos One**, v.6, n.7, 2011.
- REDMAN, R.S., SHEEHAN KB, STOUT TG, RODRIGUEZ RJ, HENSON JM. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. **Science**, v.298, p.1581, 2002.
- ROESCH, L.F.W.; OLIVARES, F.L.; PASSAGLIA, L.M.P.; SELBACH, P.A.; SÁ, E.L.S.; CAMARGO, F.A.O. Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant

- genotype, ontogeny and nitrogen-supply. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, p. 967–974, 2006.
- SHAHZAD, T.; CHENU, C.; GENET, P.; BAROT, S.; PERVEEN, N.; MOUGIN, C.; FONTAINE, S. Contribution of exudates, arbuscular mycorrhizal fungi and litter depositions to the rhizosphere priming effect induced by grassland species. **Soil Biology & Biochemistry**, v.80, p. 146-155, 2015.
- STUART, R.M.; ROMÃO, A.S.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Culturable endophytic Wlamentous fungi from leaves of transgenic imidazolinone-tolerant sugarcane and its non-transgenic isolines. **Archives of Microbiology**, v.192, p.307-313, 2010.
- TRUTER, J.; H. Van HAMBURG; J. Van Den BERG. Comparative Diversity of Arthropods on Bt Maize and Non-Bt Maize in two Different Cropping Systems in South Africa. **Environmental Entomology**, v.43, p.197-208, 2014.
- VAINIO, E.J. & HANTULA, J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. **Mycological Research**, v. 104, p. 927-936, 2000.
- Van LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M.; PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual review of Phytopathology**, v. 36, p. 453-483, 1998.
- WOOD, D. & LENNÉ, J.M. The conservation of agrobiodiversity on-farm: questioning the emerging paradigm. **Biodiversity and Conservation**, n.6, p.109-129, 1997.
- WORCHEL, E.R.; GIAUQUE, H.E.; KIVLIN, S.N. Fungal Symbionts Alter Plant Drought Response. **Microbial Ecology**, v. 65, p.671–678, 2013
- ZAIN, N. M. M.; MOHAMAD, R. B.; SIJAM, K.; MORSHED, M.M.; AWANG, Y. Effects of selected herbicides on soil microbial populations in oil palm plantation of Malaysia: A microcosm experiment. **African Journal of Microbiology Research**, v.7, p. 367-374, 2013.
- ZVI, M.M.B.; SHKLARMAN, E.; MASCI, T.; KALEV, H.; DEBENER, T.; SHAFIR, S.; OVADIS, M.; Vainstein, A. *PAPI* transcription factor enhances production of phenylpropanoid and terpenoid scent compounds in rose flowers. **New Phytologist**, v.195, 2012.

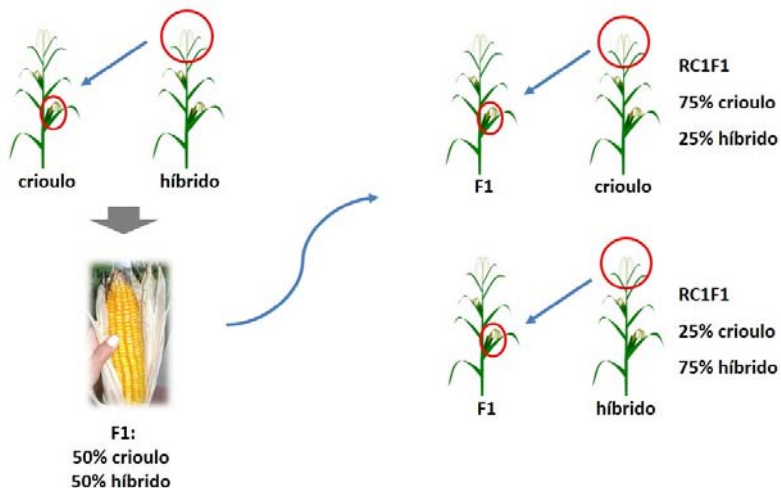
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Entender o papel dos transgenes na composição da comunidade de microrganismos endofíticos em populações de milho, com diferentes *backgrounds* genéticos, não é uma tarefa trivial. A interação entre as áreas de *Conservação de Recursos Genéticos* e a *Microbiologia* gerou resultados inéditos e relevantes apresentados nesse trabalho. Além disso, o material genético aqui gerado, ou seja, as populações de milho com introgressões de transgenes, poderão ser utilizadas em muitos outros estudos, os quais terão a possibilidade de analisar e interpretar resultados, evitando a etapa laboriosa de geração de populações de milho a campo.

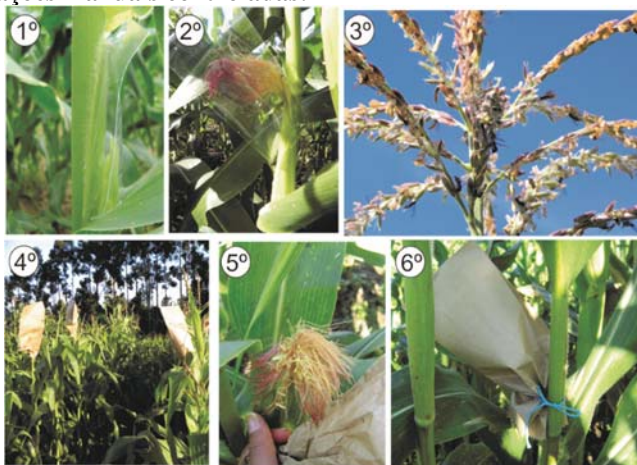
Assim como outros trabalhos do grupo NEABio, esse também tem por objetivo levar novas informações aos agricultores familiares da região Oeste catarinense. Assim, na oportunidade de uma nova visita à região os resultados aqui obtidos serão divulgados. Dessa forma, será possível discutir ainda mais com os agricultores a importância da conservação das variedades de milho crioulo e os cuidados em relação as lavouras de milho transgênico.

Considerando que foram constatadas alterações na comunidade de endofíticos das folhas do milho crioulo devido a introgressão de transgenes, o próximo passo seria avaliar as populações em diferentes condições de ambiente, com o intuito de associar a resposta da planta a estresses bióticos e abióticos, com as alterações causadas nos endofíticos foliares do milho crioulo. Assim, esses e outros resultados futuros do NEABio poderão servir de base para inferir sobre as normas de coexistência entre milho transgênico e convencional.

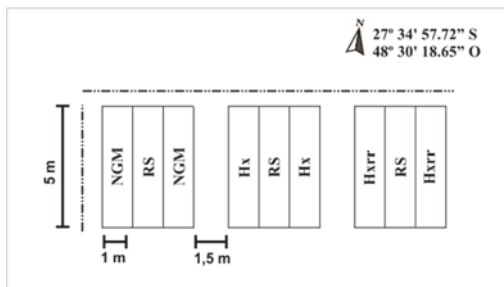
APÊNDICE A - Desenvolvimento das populações com diferentes *backgrounds* genéticos



Polinizações manuais controladas:



1° Verificar o aparecimento das espigas e cobrir com saco plástico; 2° Observar o período mais propício para a polinização; 3° Pendão aberto em ponto de coletar o pólen; 4° Ensacar os pendões; 5° Polonizar, virando o pólen sobre a espiga que estava encapada; 6° Cobrir a espiga com saco de papel e amarrar até a colheita.

APÊNDICE B - Croqui e fotos do primeiro ensaio a campo

APÊNDICE C - Croqui e foto do segundo ensaio a campo

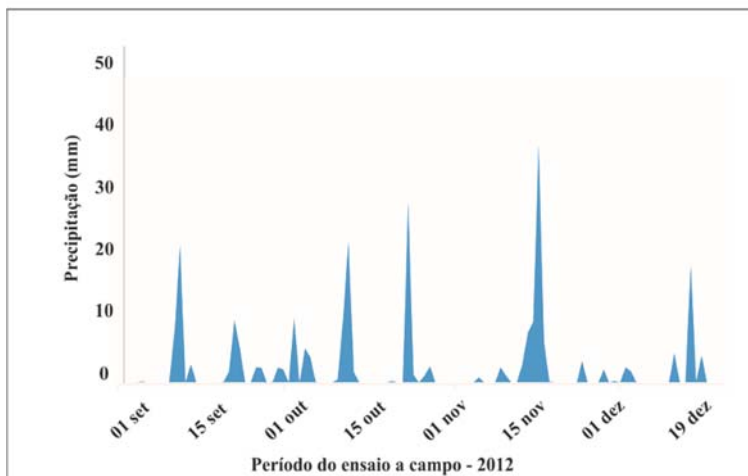
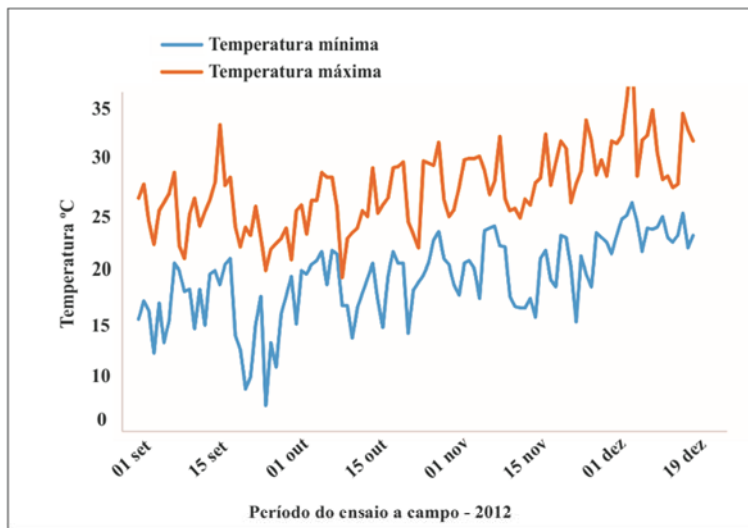


* A área em destaque cinza refere-se às linhas utilizadas para as coletas de folha para avaliações do Capítulo 1. A área em destaque verde refere-se às linhas utilizadas para as coletas de folha para análises do Capítulo 2.



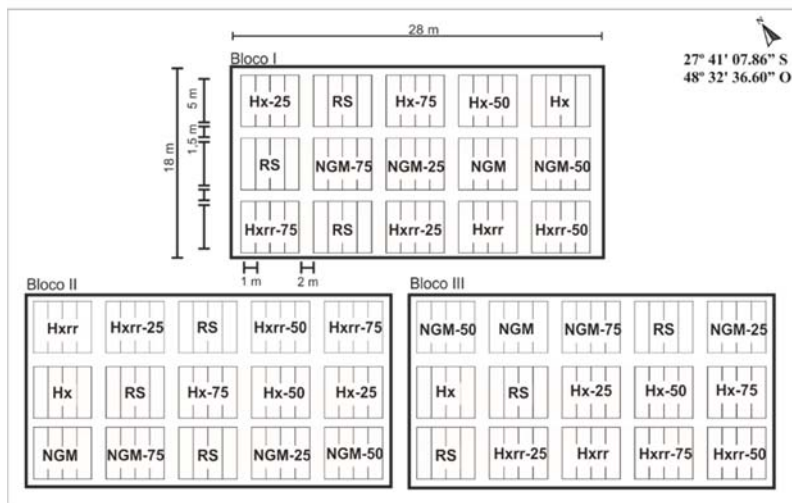
APÊNDICE D - Dados meteorológicos do segundo ensaio a campo

* Referentes ao segunda ensaio de geração de tratamentos, descrito no Capítulo 1.



APÊNDICE E - Croqui e fotos do experimento

* Referentes ao experimento descrito no Capítulo 2.



* RS – milho crioulo Rosado; NGM – híbrido não transgênico; Hx – transgênico com evento TC1507; Hxrr - transgênico com evento TC1507 combinado com o evento NK603. Populações de RS seguidos pelos números 25, 50 ou 75 correspondem a % do material genético do híbrido.

Fotos da área experimental:

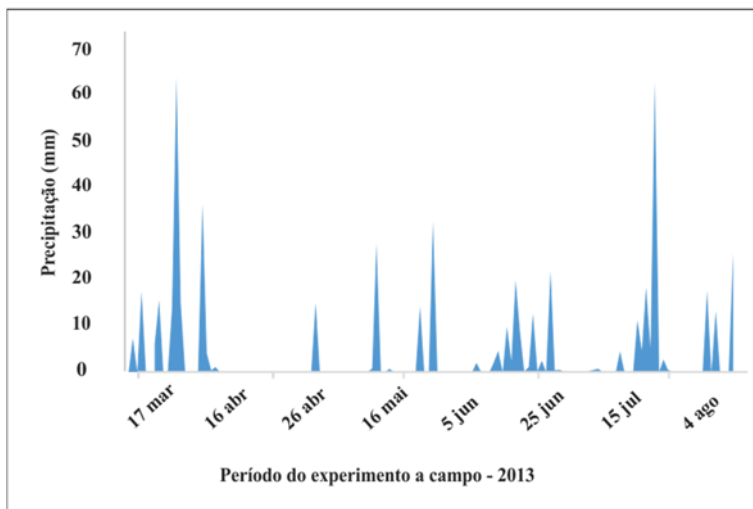
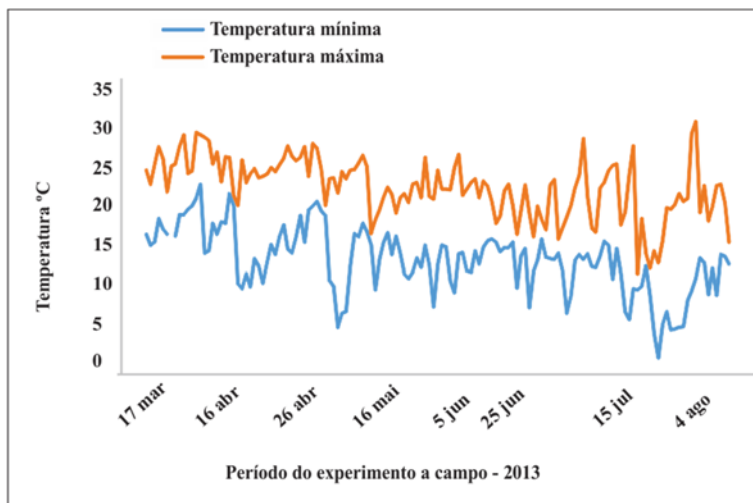


... Continuação Apêndice E:



APÊNDICE F - Dados meteorológicos da área do experimento

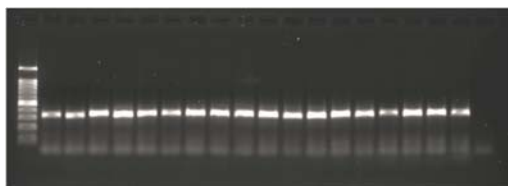
* Dados referentes ao período do experimento descrito no Capítulo 2.



APÊNDICE G - Quantidade e qualidade do DNA das amostras compostas

* Amostras compostas a partir do DNA de 10 plantas coletadas durante o experimento realizado no Capítulo 2.

Amostra	ng μl^{-1}	260/280
Bloco I		
RS	976,2	1,99
NGM	971,5	1,97
NGM-75	486,3	1,93
NGM-50	547,3	1,86
NGM-25	485,7	1,90
Hx	908,7	1,95
Hx-75	528,8	1,89
Hx-50	551,6	1,85
Hx-25	525,0	1,88
Hxrr	1019,0	1,95
Hxrr-75	864,0	2,05
Hxrr-50	796,4	2,05
Hxrr-25	816,4	2,06
Bloco II		
RS	749,8	1,95
NGM	971,2	1,95
NGM-75	1048,3	1,97
NGM-50	1020,6	2,05
NGM-25	1136,3	1,99
Hx	1013,5	1,94
Hx-75	748,2	1,82
Hx-50	945,9	1,95
Hx-25	988,6	1,95
Hxrr	988,1	1,93
Hxrr-75	1028,8	1,99



* Imagem do gel de agarose com o produto de PCR (FF390 e FR1 GC), amplificação em torno de 390 pb. O último poço corresponde ao controle negativo com água.

Hxrr-50	790,2	1,97
Hxrr-25	788,7	1,94
Bloco III		
RS	919,2	2,01
NGM	1099,5	1,94
NGM-75	1058,1	1,96
NGM-50	1024,9	1,99
NGM-25	1112,7	2,03
Hx	978,0	1,96
Hx-75	811,5	2,04
Hx-50	1087,7	2,02
Hx-25	991,9	1,95
Hxrr	977,9	2,00
Hxrr-75	920,4	2,02
Hxrr-50	1453,0	2,00
Hxrr-25	854,9	2,07

ANEXO A - Análise química do solo

* Referente ao solo coletado no experimento realizado no Capítulo 2, descrito na página 107. As amostras 1, 2 e 3 referem-se a amostras compostas dos blocos 1, 2 e 3, respectivamente.



UNIVERSIDADE DO OESTE DE SANTA CATARINA - UNOESC
 LABORATÓRIO DE FÍSICA DO SOLO
 Rua Benjamim Colla 289 - Bairro Senhor Bom Jesus
 CEP - 89620-000 - CAMPOS NOVOS - SC
 e-mail: labsolos.cmv@unoesc.edu.br
 Fone / Fax: (49) 3541 6321

Relatório de Análise de Solo

Nome: Kelly Justin da Silva

CPF:

Endereço:

Município: Florianópolis - SC

Data de Recebimento: 15/02/2013

Data da Expedição: 20/02/2013

NUM.	PROTOCOLO	MATRÍCULA	ARGILA %	pH H ₂ O	Índice SMP	P mg dm ⁻³	K mg dm ⁻³	M.O. %
1	07/13	-	8	6,5	5,4	13,5	24	3,8
2	08/13	-	8	5,7	5,5	4,6	32	3,9
3	09/13	-	8	5,8	5,6	8,6	26	3,8

Argila determinada pelo método do densímetro; pH em água 1:1; P e K determinados pelo método Mehlich I; M.O. por digestão úmida.


NUM.	Al _{trac.} cmol _c dm ⁻³	Ca _{trac.} cmol _c dm ⁻³	Mg _{trac.} cmol _c dm ⁻³	Al+H cmol _c dm ⁻³	CTC cmol _c dm ⁻³	% SAT da CTC		RELAÇÕES		
						BASES	Al	Ca/Mg	Ca/K	Mg/K
1	0,0	5,6	4,0	8,9	17,5	50	0,0	1,1	74,1	65,2
2	0,1	4,6	4,0	7,6	13,8	45	1,6	1,2	40,3	34,2
3	0,0	3,2	2,6	6,6	12,5	47	0,0	1,2	48,1	39,1

Ca, Mg, Al, Mn e Na trocáveis extraídos com KCl 1 mol L⁻¹; S-SO₄ extraído com CaHPO₄ 500 mg L⁻¹ de P; Zn e Cu extraídos com HCl 0,1 mol L⁻¹; B extraído com água quente.

NUM.	S mg dm ⁻³	Zn mg dm ⁻³	Cu mg dm ⁻³	B mg dm ⁻³	Mn mg dm ⁻³	Fe g dm ⁻³	Na mg dm ⁻³	OUTRAS DETERMINAÇÕES

Consulte um agrônomo para obter as recomendações de adubação

NUM.	IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA
1	K1
2	K2
3	K3


 Eng. Agr. Dr. Analu Mantovani
 CREA/SC 060944-4
 Responsável Técnico