

Diana Marcela Morales Londoño

**EFEITOS DO MILHO TRANSGÊNICO SOBRE ASPECTOS
MORFOFISIOLÓGICOS DA ASSOCIAÇÃO MICORRÍZICA E
SOBRE A DIVERSIDADE DOS FUNGOS MICORRÍZICOS
ARBUSCULARES**

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; área de concentração em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr Paulo E. Lovato

Coorientador: Prof. Dr. Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares

Florianópolis
2016

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

Londoño, Diana Marcela Morales
Efeitos do milho transgênico sobre aspectos
morfofisiológicos da associação micorrizica e sobre a
diversidade de fungos micorrizicos arbusculares / Diana
Marcela Morales Londoño ; orientador, Paulo Lovato ;
coorientador, Cláudio Roberto Fonseca Sousa Soares. -
Florianópolis, SC, 2016.
148 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. Fungos micorrizicos.
3. Transgênicos. 4. Milho crioulo. I. Lovato, Paulo. II.
Fonseca Sousa Soares, Cláudio Roberto. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Recursos Genéticos Vegetais. IV. Título.

Efeitos do milho transgênico sobre aspectos
morfofisiológicos da associação micorrízica e sobre a
diversidade de fungos micorrízicos arbusculares

por

Diana Marcela Morales Londoño

Tese julgada e aprovada em 24/06/2016, 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.

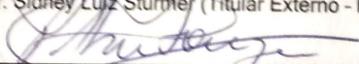
Banca Examinadora:



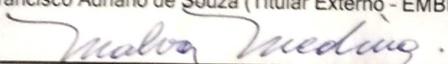
Prof. Dr. Paulo Emilio Lovato (Presidente - CCA/UFSC)



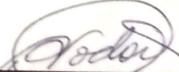
Prof. Dr. Sidney Luiz Stürmer (Titular Externo - FURB/SC)



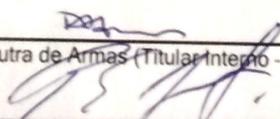
Dr. Francisco Adriano de Souza (Titular Externo - EMBRAPA/MG)



Profª. Drª. Malva Isabel Medina Hernández (Titular Externo - CCB/UFSC)



Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari (Titular Interno - CCA/UFSC)



Dr. Rafael Dutra de Armas (Titular Interno - CCA/UFSC)

Prof. Dr. Paulo Emilio Lovato (Coordenador do Programa)

Florianópolis, junho de 2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES**, pela bolsa de estudo concedida, pelo programa Estudante-Convênio (PEC-PG) e à Universidade Federal de Santa Catarina em particular aos professores do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais pelo espaço de formação.

Aos meus orientadores, Paulo Emílio Lovato e Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares pela dedicação e os espaços para a discussão. Sempre ficarei muito grata por seus ensinamentos e pela motivação para fazer do trabalho de pesquisa uma tarefa comprometida com o aprendizado e com a produção do conhecimento.

Aos colegas e amigos, integrantes do laboratório de Ecologia do Solo e Microbiologia do Solo, em especial a: Anabel González Hernández, Edenilson Meyer, Rafael de Armas, Kelly Justin, David González, Shantau Stoffel, Emanuelle Pille, Andressa Canei, Vanessa Tedesco, Marcos Leandro dos Santos, Marcelo Betancur e Alceu Kunze pela ajuda durante os experimentos e as análises, sem vocês não tivesse sido possível a realização deste trabalho.

A minha família que sempre esteve presente, mesmo desde longe, muito obrigada pela paciência, a escuta e o incentivo.

Aos todos os amigos que me acompanharam durante este tempo, por serem a minha família no Brasil, a Luz Adriana Sánchez, mesmo estando longe, a Natalia Pérez, Helena y Miguel, Edison, Jaime, Diego, a todos vocês, meu mais sincero agradecimento pelo apoio em todos os momentos.

A José Bran pelo apoio, a força e a solidariedade.

“We have become, by the power of a glorious evolutionary accident called intelligence, the stewards of life's continuity on earth. We did not ask for this role, but we cannot abjure it, We may not be suited to it, but here we are.”

(Stephen Jay Gould, 1985)

RESUMO

A área plantada com culturas transgênicas cresceu rapidamente desde a primeira liberação comercial em 1996, sendo Brasil o segundo país com maior área plantada com este tipo de lavouras. Nas plantas transgênicas, há expressão constitutiva das proteínas recombinantes, que são liberadas no ambiente da rizosfera, através dos exsudatos da raiz, ou através da decomposição dos resíduos de colheita. Dessa forma, os microrganismos da rizosfera, como os fungos micorrízicos arbusculares, entram em contato com aquelas proteínas. A presente pesquisa avaliou os efeitos da transgenia sobre o desenvolvimento da simbiose e sobre a diversidade dos FMA em cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos convencionais (DKB 240 e Fórmula) e dois transgênicos (DKB 240 VT-Pro e Fórmula TL). Para avaliar o desenvolvimento da simbiose, realizaram-se dois ensaios independentes, o primeiro durante os meses de maio a julho de 2013 e o segundo durante os meses de fevereiro a abril de 2015. As plantas de milho foram inoculadas com *Rhizophagus clarus* (Rc) e *Gigaspora margarita* (Gm) e comparadas com plantas sem inoculação. Foram avaliadas a porcentagem de colonização, número de esporos, teor e acúmulo de fósforo e biomassa vegetal, 30 e 60 dias após a inoculação. Não houve efeitos consistentes da transgenia sobre nenhuma das variáveis estudadas, porém a espécie de FMA e o genótipo de milho influenciaram o desenvolvimento da simbiose. O genótipo Fórmula (isolinha e transgênico), apresentou resposta negativa à inoculação, com um decréscimo médio de 29% na biomassa e 30% no teor de P das plantas inoculadas com Rc. Por outro lado, o milho crioulo apresentou resposta positiva, com aumento médio de 17% e 14% nas mesmas variáveis. O genótipo DKB apresentou efeitos negativos, positivos e neutros. Posteriormente, em experimento realizado a campo, avaliamos a diversidade de FMA associada a rizosfera de plantas de milho crioulo, o híbrido convencional DKB 240 e o transgênico DKB 240 VT-Pro. O desenho foi de blocos inteiramente casualizados, com seis repetições. As coletas foram realizadas antes da instalação do experimento (linha base para comparação), e em três estágios fenológicos da cultura, vegetativo (V3), durante a formação das flores (R1) e durante a formação dos grãos (R3). As avaliações foram

realizadas mediante identificação morfológica dos esporos e pela amplificação parcial do gene 28S rDNA, com posterior separação dos amplicons mediante electroforese em gel com gradiente denaturante (DGGE), a partir de amostras de solo e de raiz. A análise dos dados foi realizada utilizando o índice de similaridade de Sørensen e a análise de variância multivariada não paramétrica (PERMANOVA). Foram identificadas 20 espécies de FMA com os gêneros *Acaulospora*, *Glomus* e *Dentiscutata*, apresentando o maior número de espécies. Não houve diferenças na composição da comunidade de FMA entre os genótipos testados, assim como também não foram detectadas diferenças causadas pela transgenia. Por outro lado, as comunidades de FMA estiveram influenciadas pelo estágio fenológico do milho, sendo que, tanto nas comunidades do solo, como nas da raiz, houve maior similaridade entre os estágios adjacentes e as diferenças aumentaram com o passar do tempo. O maior índice de similaridade (47% e 43% respectivamente) foi observado entre o estágio V3 e R1.

Palavras-chave: Colonização micorrízica, DGGE, composição da comunidade de FMA.

ABSTRACT

Surface with genetically modified (GM) crop's has grown rapidly since their first commercial release in 1996, and Brazil has the second largest area with those plants. The constitutive expression of recombinant proteins in GM plants leads to their release into the rhizosphere environment through root exudates, or by residue decomposition. Thus, rhizosphere microorganisms, such as arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), come in contact with those proteins. This study evaluated the development of symbiosis and AMF diversity in five maize genotypes: one landrace, two conventional hybrids (DKB 240 and Formula) and two GM hybrids (DKB 240 VT-Pro and Formula TL). Symbiosis response was evaluated in two separate experiments: one from May to July 2013 and other, from February to April 2015. Plants were inoculated with *Rhizophagus clarus* (Rc) and *Gigaspora margarita* (Gm) and compared to plants without inoculation. We evaluated the percentage of colonization, spore number, phosphorous accumulation and plant biomass 30 and 60 days after inoculation. There were no consistent effects of GM crops on any of the variables analyzed, but AMF species and maize genotype, affected the symbiosis development. Formula genotype (isoline and GM), had a negative response to inoculation, with an average decrease of 29% in biomass, and 30% in P content in plants inoculated with Rc. On the other hand, the maize landrace showed a positive response, with an average increase of 17% and 14% in the same variables. DKB genotype showed negative, positive and neutral effects.

Afterwards, an experiment was carried out in field conditions to assess AMF community composition associated with rhizosphere of landrace, conventional hybrid (DKB 240) and GM maize plants (DKB 240 VT-pro). The experimental design was a completely randomized block design with six replications. Samples were collected before the experiment installation (baseline for comparison), and in three phenological stages, vegetative (V3) during flower formation (R1), and during grain formation (R3). The evaluations performed in soil and root samples were spore morphological identification and partial amplification of the 28S rDNA gene, with subsequent separation of

amplicons by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Data analysis was performed using the Sørensen similarity index and non-parametric multivariate-ANOVA (PERMANOVA). We identified 20 AMF species, and *Acaulospora*, *Glomus* and *Dentiscutata* were the genera with the highest number of species. There were no differences in AMF community composition among genotypes, meotjer dofferences sie tp GM. However, AMF communities were influenced by phenological stage. Band patterns were different in all stages in both soil and root communities, differences were smaller between adjacent stages and were increasing over time. The greater similarity (47% and 43% respectively) was found between stages V3 and R1.

Key words: Arbuscular mycorrhizal colonization, DGGE, AMF community composition.

Lista de Figuras

Capítulo I

Figura 1: Biomassa, 30 (A) e 60 (B) dias após a emergência, de plantas de cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos (T), inoculados com *Gigaspora margarita* (Gm), *Rhizophagus clarus* (Rc), ambos os fungos (Gm + Rc) ou sem inoculação (NI). Médias seguidas pela mesma letra, dentro do fator Genótipo, não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste Skott-Knott 5%.....70

Figura 2. Teor de fósforo, 30 (A) e 60 (B) dias após a emergência, de plantas de cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos (T), inoculados com *Gigaspora margarita* (Gm), *Rhizophagus clarus* (Rc), ambos os fungos (Gm + Rc) ou sem inoculação (NI). Médias seguidas pela mesma letra, dentro do fator Genótipo, não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste Skott-Knott 5%.....71

Figura 3: Acúmulo de fósforo em cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos (T), inoculados com *Gigaspora margarita* (GM), *Rhizophagus clarus* (RC) , ambos fungos (GM + RC) ou sem inoculação (NI), 30 (A) e 60 (B) dias após a emergência das plantas. Médias seguidas pela mesma letra, dentro do fator Genótipo, não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste Skott-Knott 5%.....72

Figura 4: Porcentagem de colonização micorrízica, 30 dias após a emergência, de plantas de cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos (T), inoculados com *Gigaspora margarita* (Gm), *Rhizophagus clarus* (Rc), ambos os fungos (Gm + Rc). Valores de p para os contrastes ortogonais entre os genótipos.....73

Figura 5: Porcentagem de colonização micorrízica, 60 dias após a emergência, de plantas de cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos (T), inoculados com *Gigaspora margarita* (Gm), *Rhizophagus clarus* (Rc), ambos os fungos (Gm + Rc). Valores de p para os contrastes ortogonais entre os genótipos.....74

Figura 6. Biomassa da parte aérea em cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos (T), inoculados

com *Rhizophagus clarus* (Rc) ou sem inoculação (NI), 30 (A) e 60 (B) dias após a emergência das plantas. Médias seguidas pela mesma letra, dentro do fator Genótipo, não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste Skott-Knott 5%.....76

Figura 7. Biomassa da raiz em cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos, 30 e 60 dias após a emergência das plantas. Médias seguidas pela mesma letra, dentro de cada fator, não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste Skott-Knott 5%.....77

Figura 8. Teor de fósforo em cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos (T), inoculados com *Rhizophagus clarus* (Rc) ou sem inoculação 30 dias após a emergência das plantas. Médias seguidas pela mesma letra, dentro do fator genótipo, não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste Skott-Knott 5%.....77

Figura 9. Teor de fósforo em milhos inoculados com *Rhizophagus clarus* (Rc) ou sem inoculação (NI), 60 dias após a emergência das plantas. Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste Skott-Knott 5%.....78

Figura 10. Acúmulo de fósforo em cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos, inoculados com *Rhizophagus clarus* (Rc) ou sem inoculação (NI), 30 (A) e 60 (B) dias após a emergência das plantas. Médias seguidas pela mesma letra, dentro do fator genótipo, não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste Skott-Knott 5%.....78

Figura 11: Porcentagem de colonização, 30 dias após a emergência das plantas, em cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos (T), inoculados com *Rhizophagus clarus*. Valores de p para os contrastes ortogonais entre os genótipos de milho.....80

Figura 12: Densidade de esporos 60 dias após a emergência das plantas, em cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos (T), inoculados com *Rhizophagus clarus*. Valores de p para os contrastes ortogonais entre os genótipos de milho.....81

Figura 13: Teor de clorofila em folhas, 30 e 60 dias após a emergência das plantas, em cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos (T).....82

Figura 14: Teor de carboidratos solúveis nas raízes, 30 e 60 dias após a emergência das plantas, em cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos (T), inoculados com *Rhizophagus clarus* (Rc) ou sem inoculação (NI).....83

Capítulo II

Figura 1: Croqui da área experimental implantada na fazenda da Ressacada, contendo seis blocos e três tratamentos [três genótipos de milho: DKB 240-I (isolinha); DKB 240-T (transgênico) e crioulo]...110

Figura 2: Plantas de milho durante a coleta em estágio vegetativo (A) e durante o estágio de floração (B). Forma de retirada das plantas (C) e de separação da parte aérea e do sistema radicular (D).....111

Figura 3: Porcentagem de colonização micorrízica em raízes de três genótipos de milho: transgênico (DKB-T), seu híbrido convencional isogênico (DKB-I) e milho crioulo, em experimento a campo, avaliada em três estágios fenológicos: vegetativo (V3), produção de inflorescências (R1) e desenvolvimento dos grãos (R3).....117

Figura 4: Número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares em amostras de solo rizosférico de três genótipos de milho: transgênico (DKB-T), seu híbrido convencional isogênico (DKB-I) e um milho crioulo, em experimento a campo, antes da instalação do experimento (AIE) e na última coleta, quando as plantas apresentavam grãos em desenvolvimento (R3).....118

Figura 5: Frequência relativa de espécies de fungos micorrízicos arbusculares em três genótipos de milho, um transgênico (DKB-T), o híbrido convencional isogênico (DKB-I) e um milho crioulo, em experimento a campo, avaliada em duas épocas: antes da instalação do experimento (barras pretas) e na última coleta durante a formação do grão (barras cinzas).....121

Figura 6: Análise canônica de coordenadas principais para as comunidades de fungos micorrízicos arbusculares provenientes de solo rizosférico de plantas de milho, antes da instalação do experimento (AIE) e em três estágios fenológicos, vegetativo (V3), em floração (R1) e durante o desenvolvimento dos grãos (R3).....124

Figura 7: Análise canônica de coordenadas principais para as comunidades de fungos micorrízicos arbusculares provenientes de raízes de plantas de milho em três estágios fenológicos, vegetativo (V3), em floração (R1) e durante o desenvolvimento dos grãos (R3).....125

Apêndices

Figura S1: Imágenes em microscopia óptica das 20 de morfoespécies de fungos micorrízicos arbusculares identificadas em amostras de solo rizosférico de três genótipos de milho: transgênico (DKB-T), híbrido convencional isogênico (DKB-I) e um milho crioulo, em experimento a campo.....143

Figura S2: Imagem dos géis de DGGE obtidos a partir de amostras de solo rizosférico de três genótipos de milho: isolinha (DKB-I), Crioulo e transgênico (DKB-T). Em cada gel podem ser observados os seis blocos experimentais e duas amostras por parcela (plantas amostradas de forma independente). AIE (amostragem feita antes da instalação do experimento), Estágio V3 (estágio vegetativo), B (Blocos, 1 a 6).....145

Figura S3: Imagem dos géis de DGGE obtidos a partir de amostras de solo rizosférico de três genótipos de milho: isolinha (DKB-I), Crioulo e transgênico (DKB-T). Em cada gel podem ser observados os seis blocos experimentais e duas amostras por parcela (plantas amostradas de forma independente). R1 (floração), R3 (desenvolvimento dos grãos) , B (Blocos, 1 a 6).....146

Figura S4: Imagem dos géis de DGGE obtidos a partir de amostras de raiz de três genótipos de milho: isolinha (DKB-I), Crioulo e transgênico (DKB-T). Em cada gel podem ser observados os seis blocos experimentais e duas amostras por parcela (plantas amostradas de forma independente). Estágio V3 (estágio vegetativo), R1 (floração), B (Blocos, 1 a 6).....147

Figura S5: Imagem dos géis de DGGE obtidos a partir de amostras de raiz de três genótipos de milho: isolinha (DKB-I), Crioulo e transgênico (DKB-T). Em cada gel podem ser observados os seis blocos experimentais e duas amostras por parcela (plantas amostradas de forma independente). R3 (desenvolvimento dos grãos), B (Blocos, 1 a 6)...148

Lista de tabelas

Capítulo I

Tabela 1. Temperaturas médias mensais do ar, durante a condução do experimento (Maio a Julho de 2013).....	63
Tabela 2. Temperaturas médias mensais do ar, durante a condução do experimento (Fevereiro a Abril de 2015).....	66
Tabela 3. Comprimento total, área superficial, volume e diâmetro médio do sistema radicular de cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos (T).....	84
Tabela 4. Comprimento total, por categorias diamétricas, de cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos (T).....	84
Tabela 5. Volume, por categorias diamétricas, de cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos (T)...	85

Capítulo II

Tabela 1: Frequência relativa de morfoespécies de fungos micorrízicos arbusculares em amostras de solo rizosférico de três genótipos de milho: transgênico (DKB-T), híbrido convencional isogênico (DKB-I) e um milho crioulo, em experimento a campo, antes da instalação do experimento (AIE) e na última coleta durante a formação do grão (R3).....	119
Tabela 2. Número de bandas obtidas a partir de amplicons da região 28S de fungos micorrízicos arbusculares, avaliados mediante PCR-DGGE, a partir de amostras de solo e de raiz em experimento com três genótipos de milho, um crioulo, o híbrido convencional DKB-I e o transgênico DKB-T, antes da instalação do experimento (AIE), e em três estágios fenológicos, vegetativo (V3) durante a floração (R1) e durante o desenvolvimento dos grãos (R3). Média ± (Intervalo de confiança 95%).....	122
Tabela 3. Resultados da PERMANOVA de medidas repetidas para as comparações entre comunidades de FMA associadas a solo e raízes de três genótipos de milho, um crioulo, o híbrido convencional DKB-I e o transgênico DKB-T, em três estágios fenológicos: vegetativo (V3), durante a floração (R1) e durante o desenvolvimento dos grãos (R3). 123	

Apêndices

Tabela S1: Altura, diâmetro e biomassa de cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos (T), inoculados com *Gigaspora margarita* (Gm), *Rhizophagus clarus* (Rc), ambos os fungos (Gm + Rc) ou sem inoculação (NI), 30 dias após a emergência das plantas..139

Tabela S2: Altura, diâmetro, biomassa e teor de fósforo em cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos (T), inoculados com *Gigaspora margarita* (Gm), *Rhizophagus clarus* (Rc), ambos os fungos (Gm + Rc) ou sem inoculação (NI), 60 dias após a emergência das plantas.....139

Tabela S3: Altura, diâmetro e biomassa de cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos (T), inoculados com *Rhizophagus clarus* (Rc), ou sem inoculação (NI), 30 dias após a emergência das plantas.....140

Tabela S4: Altura, diâmetro e biomassa de cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos (T), inoculados com *Rhizophagus clarus* (Rc) ou sem inoculação (NI), 60 dias após a emergência das plantas.....141

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	25
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	29
2.1 A cultura do milho.....	29
2.2 O milho transgênico.....	30
2.2.1 O milho com genes de resistência a insetos.....	31
2.2.2 O milho tolerante a herbicidas.....	32
2.2.3 Os eventos BT11 e MON 89034.....	33
2.3 O milho transgênico e o ambiente da rizosfera.....	35
2.4 Os fungos micorrízicos arbusculares.....	37
2.4.1 Ciclo de vida dos FMA.....	38
2.4.2 Avaliação da composição da comunidade de FMA.....	40
2.4.3 Uso da técnica de PCR-DGGE para a avaliação da composição da comunidade de FMA.....	41
3. HIPÓTESES E OBJETIVOS.....	55
3.1 Hipóteses.....	55
3.2 Objetivo Geral.....	55
3.3 Objetivos específicos.....	55
CAPITULO I.....	57
GRAU DE COLONIZAÇÃO E DESEMPENHO DA SIMBIOSE MICORRÍZICA ARBUSCULAR EM PLANTAS DE MILHO TRANSGÊNICO, SUAS ISOLINHAS (HÍBRIDOS CONVENCIONAIS) E MILHO CRIOULO.....	57
1. APRESENTAÇÃO.....	59
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	61

2.1 Experimento I – Influência dos eventos MON 89034 e Bt11 sobre o desenvolvimento da simbiose micorrízica em relação às isolinhas e um milho crioulo.....	61
2.1.1 Material biológico utilizado.....	61
2.1.2 Delineamento e montagem do experimento.....	62
2.1.3 Avaliações e análise estatística.....	64
2.2 Experimento II - Desenvolvimento da simbiose micorrízica entre <i>Rhizophagus clarus</i> e os genótipos de milho MON 89034, Bt11, suas isolinhas e um milho crioulo.....	65
2.2.1 Material biológico utilizado.....	65
2.2.2 Delineamento experimental.....	66
2.2.3 Avaliações e análise estatística.....	66
3. RESULTADOS.....	69
3.1 Experimento I – Influência dos eventos MON 89034 e Bt11 sobre o desenvolvimento da simbiose micorrízica em relação à isolinha e ao milho crioulo.....	69
3.1.1 Crescimento das plantas.....	69
3.1.2 Porcentagem de colonização.....	72
3.2 Experimento II - Desenvolvimento da simbiose micorrízica entre <i>Rhizophagus clarus</i> e genótipos de milho contendo os eventos MON 89034, Bt11, suas isolinhas e um milho crioulo.....	74
3.2.1 Crescimento das plantas.....	75
3.2.2 Colonização micorrízica e densidade de esporos.....	79
3.2.3 Características fisiológicas.....	81
3.3 Caracterização do sistema radicular.....	83
4. DISCUSSÃO.....	87

4.1 Efeitos da transgenia sobre a colonização micorrízica e a resposta à inoculação.....	87
4.2 Colonização e resposta à inoculação com FMA entre híbridos de milho convencionais e transgênicos e um milho crioulo.....	89
4.3 Efeitos da transgenia sobre o desenvolvimento de <i>Gigaspora margarita</i> e <i>Rhizophagus clarus</i>	95
5. CONCLUSÕES.....	97
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
CAPITULO II.....	105
DIVERSIDADE E COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES ASSOCIADOS A PLANTAS DE MILHO TRANSGÊNICO, A ISOLINHA (HÍBRIDO CONVENCIONAL) E UM MILHO CRIOULO.....	105
1. APRESENTAÇÃO.....	107
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	109
2.1 Área de estudo.....	109
2.2 Material biológico utilizado.....	109
2.3 Delineamento e montagem do experimento.....	109
2.4 Avaliações.....	112
2.4.1 Colonização micorrízica, número de esporos e potencial de inóculo.....	112
2.4.2 Avaliação da comunidade de FMA.....	112
Determinação das morfoespécies.....	112
2.5 Análise estatística.....	114
3. RESULTADOS.....	117
3.1 Colonização micorrízica, número de esporos e potencial de inóculo.....	117

3.2 Avaliação da comunidade de FMA associada ao milho crioulo, a cultivar isogênica e o transgênico.....	119
3.2.1 Morfoespécies.....	119
3.2.2 Electroforese em gradiente desnaturante.....	122
Comparações entre os genótipos e os estágios fenológicos:.....	123
4. DISCUSSÃO:.....	127
5. CONCLUSÕES.....	131
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	133
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	137
APÊNDICE A.....	139
APÊNDICE B.....	143
Avaliação da comunidade de FMA associada ao milho crioulo, a cultivar isogênica e o transgênico.....	143

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Durante a última década a área plantada com culturas transgênicas no mundo cresceu de forma acelerada, alcançando, em 2015, um total de 200 milhões de hectares. O Brasil é o segundo país com maior área plantada com estas culturas, sendo as principais soja, milho e algodão. O milho é um dos alimentos primordiais da dieta atual, sendo uma das principais fontes energéticas nos países com menor ingresso *per capita* e, portanto, um componente fundamental da segurança alimentar de milhões de pessoas no mundo.

Apesar do acelerado crescimento da área plantada com este tipo de culturas, ainda são pouco estudados os impactos ambientais, econômicos e culturais que sua liberação comercial pode causar. Quanto ao meio ambiente, uma das principais preocupações são os efeitos que as plantas transgênicas podem ter sobre os organismos não alvo e os efeitos da introdução dos transgenes e das proteínas recombinantes nos ecossistemas.

A transgenia implica a inserção de sequências quiméricas de DNA, isto é, de sequências compostas por partes do genoma de organismos diferentes, geralmente de vírus e de bactérias, além das sequências de interesse. Os efeitos que esses transgenes possam ter, sobre o meio ambiente e a saúde humana precisam ser estudados de forma rigorosa pela comunidade científica (NODARI e GUERRA, 2000). Grande parte dos estudos avaliando a segurança das plantas e dos alimentos transgênicos baseia-se no conceito de “equivalência substancial”, que diz que “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 dá resposta a todas as questões referentes à segurança das plantas geneticamente modificadas, por exemplo, não considera que o cultivo dessas plantas causa a introdução dos transgenes no ecossistema e, portanto, a interação deles com outros organismos, incluindo aqueles mais distantes na cadeia trófica. Além disso, o conceito de equivalência substancial está em desacordo com o

“princípio de precaução” proclamado no Protocolo de Cartagena (2000) o qual, ante produtos ou tecnologias que possam representar riscos à saúde humana ou ao meio ambiente, exorta a adoção de medidas protetoras, mesmo na ausência de evidência científica sobre os riscos.

A expressão constitutiva das proteínas recombinantes conduz à introdução dessas proteínas no ambiente do solo, aonde são liberadas nos exsudatos da raiz. A rizosfera, ou área adjacente à raiz é uma das zonas metabolicamente mais ativas do solo, os exsudatos liberados pelas plantas são aproveitados por milhões de microrganismos que habitam essa região e que atuam em processos ecossistêmicos fundamentais, como a ciclagem de nutrientes e a estruturação do solo. Dentre esse conjunto de microrganismos associados a rizosfera das plantas, um grupo de fungos recebe particular atenção. São os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), os quais, além de crescerem e se desenvolverem na rizosfera, colonizam a zona cortical das raízes gerando uma intrincada rede de interconexões entre as plantas. Os FMA translocam nutrientes às raízes e recebem carbono em troca, sendo essa a única fonte de energia que usam para o seu crescimento, por essa razão desenvolvem relações mutualísticas com as plantas que colonizam. Os FMA não só contribuem com a nutrição das plantas, também estão relacionados com efeitos benéficos na proteção contra estresses de caráter biótico, como o ataque de patógenos ou herbívoros, e abióticos como o estresse hídrico. Estudos avaliando os efeitos dos cultivos transgênicos sobre os organismos do solo e em particular sobre as micorrizas arbusculares não são conclusivos, mostrando resultados divergentes, que parecem estar relacionados com o tipo de inserto transgênico, a fase fenológica da planta e as condições ambientais. Sendo o Brasil um país com tão ampla produção de culturas transgênicas e, simultaneamente, com uma enorme diversidade biológica, são escassos os estudos avaliando a interação entre plantas transgênicas e os FMA, e dada essa lacuna de conhecimento, o presente estudo avaliou os efeitos de vários genótipos de milho transgênicos sobre o desenvolvimento da simbiose micorrízica e sobre a diversidade dos FMA associados a essas plantas, com a

intenção de aportar elementos de discussão ao debate sobre a segurança das culturas transgênicas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura do milho

O milho é um dos grãos mais importantes na atualidade, sendo usado na alimentação humana e animal e na produção de etanol para combustível. É uma das principais fontes de proteína e carboidratos para alimentação humana, sendo a terceira cultura alimentar mais importante do mundo, atrás do arroz e do trigo, junto aos quais participa no suplemento do 42% das calorias e 37% das proteínas da dieta humana. Em alguns países da América Latina e África é a principal fonte proteica da população de mais baixa renda (REEVES; THOMAS; RAMSAY, 2016).

A domesticação de plantas da família Poaceae, que resultaram nos cereais, ocorreu há aproximadamente dez mil anos, sendo que no caso do milho, a domesticação data de aproximadamente sete mil anos, quando comunidades de Mesoamérica começaram a utilizar, consumir e domesticar uma gramínea do gênero *Zea*, o teosinto (MURPHY, 2007). Desde então, tem acontecido uma grande diversificação genética da espécie em razão do manejo e uso que as diferentes populações humanas deram a essa cultura, gerando o que hoje é definido como variedades crioulas de milho. Uma variedade crioula possui uma origem histórica, distingue-se fenotipicamente de outras variedades, frequentemente contem maior diversidade genética por ser produto de polinização aberta e não tem sido submetida a melhoramento genético formal. Além disso, e talvez de maior importância, uma variedade crioula está adaptada às condições locais e está fortemente associada a um sistema de produção camponês (VILLA et al., 2005). Variedades crioulas são a fonte de caracteres que os melhoristas usam para produzir os milhos híbridos, que são o produto de linhas puras, cruzadas de maneira controlada. Os híbridos geralmente possuem um fenótipo homogêneo, mas suas sementes não produzem, necessariamente, plantas com as mesmas características (MAIZE PROJECT, 2016). Atualmente são cultivadas no mundo mais de 2500 variedades comerciais, dentre as quais os híbridos dominam o mercado de sementes (REEVES; THOMAS; RAMSAY, 2016).

A área mundial plantada com milho é de 185 milhões de ha, com uma produção total de 972 milhões de toneladas (USDA, 2015). O Brasil é o terceiro maior produtor de milho no mundo, com 84 milhões de toneladas durante o ano agrícola de 2015/2016, a maior safra de milho na história do país. Essa cultura ocupa um total de 15,5 milhões de ha, se configurando como a segunda cultura com maior importância no mercado nacional, depois da soja (BRASIL, 2016). Cerca de 60% do milho consumido no país é destinado à elaboração de ração animal; o consumo para alimentação humana ocupa o segundo lugar, com aproximadamente 30% do consumo interno, e a produção de etanol está em terceiro lugar, com aproximadamente 10% do consumo nacional. O país não produz só para abastecer seu mercado interno; no mercado mundial o Brasil situa-se como país exportador de grãos, movimentando anualmente mais de 28 milhões de toneladas de milho, fato que o consolida como o segundo país com maior volume de exportação desse cereal (CONAB, 2016).

O Brasil é também, o segundo maior produtor de culturas transgênicas, atrás dos Estados Unidos. No ano de 2015 o país semeou uma área total de 44 milhões de hectares com soja, milho e algodão transgênicos, e foi aprovada a liberação de um novo evento de eucalipto para cultivo comercial. Do total da área destinada a cultura do milho (safra e safrinha), uma porcentagem expressiva (81%) correspondeu a milho transgênico. Plantas transgênicas resistentes a insetos e simultaneamente tolerantes a herbicidas foram as mais usadas durante o período 2014-2015, o segundo lugar foi ocupado pelas plantas resistentes a insetos e por último aquelas que só expressam tolerância a herbicidas (ISAAA, 2015).

2.2 O milho transgênico

Plantas transgênicas são organismos modificados pela inserção de segmentos do material genético de organismos forâneos graças a transferência de DNA por transformação, usando técnicas de engenharia genética (LURQUIN, 2002). Por outro lado, o melhoramento clássico de plantas, usa a diversidade genética das populações de uma espécie para

modelar o fenótipo mediante o cruzamento seletivo de parentais com as características desejadas (CROSBIE et al., 2016).

Na construção de um transgênico são utilizados três elementos básicos, reunidos em um cassete de expressão: o promotor, que controla a expressão do gene recombinante; a região codificadora, que contém a informação genética codificando a proteína de interesse; e a região terminadora, que sinaliza o final do processo de transcrição do gene recombinante. O promotor mais utilizado é o PcaMV 35S, derivado do vírus do mosaico da couve-flor, o elemento terminador mais utilizado é o NOS-t, derivado do gene da nopalina sintase do plasmídeo Ti da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* (HOLDEN et al., 2010). A região codificadora depende da proteína de interesse, que no caso das culturas de milho transgênico atualmente mais comercializadas podem ser as proteínas formadoras de cristais, proteínas recombinantes Cry (*r*-Cry), que conferem resistência ao ataque de insetos, ou das proteínas recombinantes PAT (*r*-PAT) e EPSPS (*r*-EPSPS), no caso da tolerância a herbicidas.

Plantas transgênicas com diferentes cassetes de expressão são denominadas de eventos transgênicos. Os eventos podem ser simples, quando são desenhados para a expressão de uma ou mais proteínas transgênicas, a partir da inserção separada dos genes recombinantes, em diferentes cassetes de expressão, ou piramidados, quando a planta transgênica expressa duas ou mais proteínas recombinantes e foi obtida por cruzamento de parentais com eventos simples (FERMENT et al., 2015). Atualmente existem 55 eventos transgênicos liberados para comercialização no Brasil, aprovados pela CTNBio – Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Do total de eventos, nove são de soja, 32 de milho, há 12 de algodão, um de feijão e um de eucalipto (CNTBio, 2015).

2.2.1 O milho com genes de resistência a insetos

Plantas transgênicas, resistentes a insetos tiveram a inserção de genes recombinantes da bactéria *Bacillus thuringiensis*, razão pela qual também são denominadas plantas Bt. Em resposta a situações de estresse ambiental, as bactérias Gram positivas do gênero *Bacillus*

formam uma estrutura celular denominada endósporo que, no caso do *B. thuringiensis*, caracteriza-se por exibir cristais proteicos. Uma das proteínas que conformam o cristal são tóxicas para os insetos, daí seu amplo uso como inseticidas biológicos (BRAVO et al., 2013).

Os cristais proteicos do Bt interagem com receptores na membrana celular do intestino dos insetos, formando poros que causam desequilíbrios osmóticos e lise celular. A ação inseticida de proteínas Cry tem sido comprovada contra lepidópteros, coleópteros, dípteros e himenópteros, além de ácaros, nematoides, platelmintos e protozoários (DE MAAGD et al., 2003). Após o ingresso da proteína no trato digestivo do organismo sensível, o suco digestivo dissolve os cristais mediante a ação de algumas proteases, que separam o extremo N terminal da proteína. O núcleo inseticida, resultante desta proteólise é responsável pela toxicidade, e uma vez localizado no intestino do animal, liga-se aos receptores de membrana nas células do epitélio. Diferentes tipos de proteínas Cry causam infecção em diferentes ordens de insetos. O pH do intestino, as proteases que liberam a toxina e as moléculas receptoras de membrana estão implicadas nos mecanismos de especificidade exibidos por essa toxina (DE MAAGD et al., 2003).

Existem diversos eventos de milho Bt que incorporam diferentes genes cry recombinantes, segundo o grupo de insetos alvo para o qual foram desenhados. Cada evento transgênico possui um cassete de expressão com sequências de DNA recombinante provenientes de diferentes subespécies de *B. thuringiensis*. Os principais genes utilizados para milho Bt são *r-cry1A(b)*, *r-cry1A(c)*, *r-cry1f* e *r-cry2Ab2* (CTNBio, 2010).

2.2.2 O milho tolerante a herbicidas

Os herbicidas do grupo de inibidores da biossíntese de aminoácidos, como o glifosato e o glifosinato de amônia, atuam mediante o bloqueio da síntese proteica, matando as plantas por deficiências severas dessas macromoléculas. As enzimas alvo desse tipo de herbicidas são: a enzima aceto-lactato sintase (ALS) importante na via metabólica de produção de leucina, valina e isoleucina; a enzima 5-

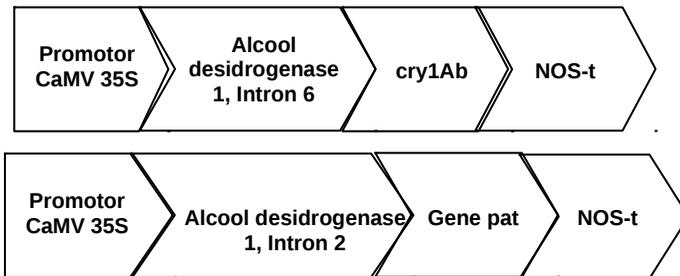
enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSP), que atua na via da produção de aminoácidos aromáticos como triptofano, fenilalanina e tirosina; e a enzima glutamina sintase (GS), que catalisa a biossíntese de L-glutamina em um processo mediado pela assimilação de moléculas de amônia livres no cloroplasto. No caso do glifosato, a morte da planta acontece por inibição da enzima EPSP e posterior decréscimo dos aminoácidos aromáticos. Por outro lado, o glifosinato de amônia atua mediante a inibição da GS, sua ação herbicida é produto da bioacumulação das moléculas de amônia e consequente ruptura da membrana do cloroplasto, o que impede a fotossíntese e causa a morte da planta (TAN; EVANS; SINGH, 2006).

O milho tolerante a herbicidas possui mecanismos que impedem o ataque dos herbicidas as enzimas alvo ou que ativam vias de degradação dos mesmos antes que ocasionem dano a planta. O milho resistente ao glifosato foi transformado mediante inserção do gene EPSPS da bactéria *Agrobacterium sp.* cepa CP4 que codifica uma enzima EPSP menos sensível a ação do glifosato que a enzima endógena, mantendo a síntese de aminoácidos graças à enzima recombinante. Por outro lado, plantas tolerantes ao glifosinato de amônia degradam este herbicida até compostos não tóxicos para a planta. A degradação é realizada pela ação da enzima PAT obtida do genoma das bactérias *Streptomyces viridochromogenes* ou *S. hygroscopicus* (TAN; EVANS; SINGH, 2006).

2.2.3 Os eventos BT11 e MON 89034

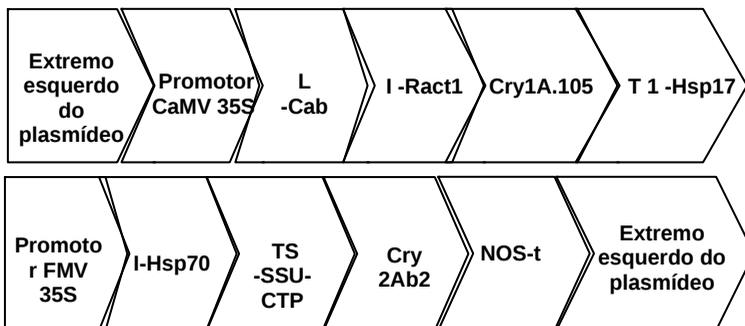
O evento Bt11 foi modificado mediante inserção de dois genes: *r-cry* 1Ab e *r-pat*, para conferir resistência a insetos e tolerância a glifosinato de amônia, respectivamente. O inserto transgênico (Figura 1), introduzido no genoma do milho mediante técnicas de biobalística, expressa uma versão truncada da proteína *r-Cry* 1Ab com 615 aminoácidos (a proteína bacteriana contém 1155 aminoácidos), obtida a partir da bactéria *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1, e uma versão completa da enzima *r-PAT* (BCH, 2016a).

Figura 1. Esquema do inserto para milho transgênico, do evento Bt11.



O evento MON-89034 foi desenvolvido pelo método de transformação mediada por *Agrobacterium* e expressa as proteínas inseticidas *r*-Cry1A.105 e *r*-Cry2Ab2 (Figura 2). *r*-Cry1A.105 é uma proteína modificada desenhada com os domínios um e dois da proteína *r*-Cry1Ab ou *r*-Cry1Ac, o domínio três da proteína *r*-Cry1F e a porção C-terminal de *r*-Cry1Ac. A proteína *r*-Cry2Ab2 é derivada da bactéria *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki*. O transgênico foi desenvolvido para controlar um espectro maior de insetos englobando os gêneros *Ostrinia*, *Diatrea*, *Spodoptera* e *Helicoverpa* (BCH, 2016b).

Figura 2. Esquema do inserto para milho transgênico, do evento MON89034.



2.3 O milho transgênico e o ambiente da rizosfera

O rápido aumento da área cultivada com transgênicos no mundo, até o ano 2015, bem como a falta de conhecimento sobre a forma pela qual os genes exógenos ou as proteínas recombinantes podem afetar as interações das plantas cultivadas com outros organismos, tem levado ao interesse da comunidade científica em avaliar os efeitos das culturas transgênicas sobre organismos não alvo. As plantas transgênicas poderiam afetar os organismos do solo de duas formas: diretamente, se os efeitos dependessem da atividade da proteína e sua acumulação no ambiente; ou de forma indireta se decorressem das mudanças na composição bromatológica dos tecidos da planta, de mudanças no padrão de exsudação ou ainda de modificações fisiológicas ou bioquímicas decorrentes da inserção dos genes exógenos (ICOZ; STOTZKY, 2008).

As plantas de milho Bt expressam de maneira constitutiva as proteínas recombinantes em todos seus órgãos ainda que de maneira diferenciada, exibindo em geral as maiores concentrações nas folhas e as menores nos grãos (KAMATH et al., 2010).

Diferentes trabalhos demonstraram a liberação de proteínas *r*-Cry 1Ab nos exsudatos radiculares de plantas de milho Bt durante todo seu ciclo de vida (SAXENA; FLORES; STOTZKY, 2002; SAXENA et al., 2004). Por outra parte, também foi demonstrada a liberação da proteína *r*-Cry no solo, a partir da decomposição dos resíduos de colheita, das fezes de animais alimentados com rações contendo milho Bt e das fezes de organismos decompositores, como minhocas (ICOZ; STOTZKY, 2008). As proteínas *r*-Cry são adsorvidas pela matéria orgânica, pelas partículas de argila e por complexos organominerais do solo, permanecendo nesse ambiente depois da retirada das culturas transgênicas (HELASSA; QUIQUAMPOIX; STAUNTON, 2013). Há, na literatura, relatos de alta persistência dessas proteínas recombinantes no solo, com tempos variando de dois a oito meses e alguns autores relatam a capacidade inseticida das proteínas adsorvidas, demonstrada mediante ensaios larvicidas (SAXENA et al., 2004; CHEN; CHEN; WU, 2012). No solo, a quantidade de proteínas Cry de origem

recombinante varia de 1 a 27 ng g⁻¹ de solo, dependendo das condições ambientais, textura do solo, tipo de proteína expressa, evento transgênico e duração dos estudos em questão (MIETHLING-GRAFF; DOCKHORN; TEBBE, 2010; HÖSS et al., 2011; WANG et al., 2013). Essa quantidade é relativamente baixa quando comparada com a concentração encontrada nas folhas, que varia de 12,5 a 72 ug g⁻¹ de tecido (SZÉKÁCS et al., 2012). A adsorção das proteínas *r*-Cry está inversamente relacionada à precipitação e diretamente ao conteúdo de argila, e parece não ter relação com o pH do solo (XUE; DIAZ; THIES, 2014).

Além das possíveis alterações pleiotrópicas causadas pela transgenia, as plantas tolerantes a herbicidas podem sofrer mudanças na composição ou abundância dos microrganismos associados à rizosfera devidos à aplicação do herbicida. Diferentes trabalhos têm demonstrado a susceptibilidade de alguns grupos de bactérias e fungos que são afetados pela aplicação de glifosato e glifosinato de amônia por possuírem as enzimas alvo desses herbicidas (BUSSE et al., 2001).

Estudos avaliando o impacto das plantas transgênicas sobre a microbiota do solo apresentam resultados discrepantes, revelando em alguns casos efeitos deletérios (SINGH; SINGH; DUBEY, 2014; VELASCO et al., 2013; CASTALDINI et al., 2005; FLORES; SAXENA; STOTZKY, 2005; XUE et al., 2005; HENRI H. DINEL, 2003) e em outros, nenhum efeito (ZENG et al., 2014; LONDOÑO-R; TARKALSON; THIES, 2013; LAWHORN; NEHER; DIVELY, 2009; DEVARE; JONES; THIES, 2004) sobre a diversidade e a abundância dos microrganismos no solo e na rizosfera das plantas transgênicas, quando comparadas com suas variedades isogênicas (contraparte sem modificações genéticas).

Tais discrepâncias podem estar relacionadas a dois tipos de fatores. O primeiro tipo é a resposta diferenciada de grupos de microrganismos com diferentes graus de resiliência frente a mudanças do ambiente da rizosfera. O segundo tipo, no caso de estudos realizados a campo, envolve fatores relacionados ao sistema de manejo (uso de fertilizantes, agrotóxicos, aração, etc.) que podem mascarar os possíveis efeitos da transgenia (HART et al., 2009). Vem daí a importância de estudar os microrganismos da rizosfera, que estão em íntima relação com a planta,

e conceber desenhos experimentais que permitam avaliar a planta em condições controladas, a fim de separar os efeitos do manejo agrônomo. Desde esse ponto de vista, os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são um grupo de interesse, pois estabelecem simbiose mutualística com as plantas, colonizam a zona cortical das raízes e dependem completamente da planta simbiote para se reproduzir. Esses fungos podem permanecer em contato direto com as proteínas recombinantes durante grande parte do seu ciclo de vida e por essa razão, e como contemplado no Protocolo de Cartagena sobre Biosegurança, são prioritários no momento de avaliar os possíveis impactos que as culturas transgênicas têm sobre os organismos não alvo (ANDOW; HILBECK, 2004).

2.4 Os fungos micorrízicos arbusculares

Os FMA são fungos biotróficos obrigatórios, de reprodução assexual, que dependem de organismos simbióticos compatíveis para crescer e se reproduzir (SOUZA et al., 2010). Tratam-se de fungos cosmopolitas do solo, que formam simbioses mutualísticas com aproximadamente 90% das espécies vegetais (SMITH; READ, 2008). Encontram-se em relações simbióticas com organismos autotróficos, formando micorizas arbusculares com plantas vasculares, briófitas e pteridófitas, bem como endocitosimbioses com cianobactérias (SCHÜBLER; SCHWARZOTT; WALKER, 2001)

O tipo de simbiose estabelecida por estes fungos e as plantas simbióticas geralmente é de tipo mutualista. O mutualismo é um tipo de interação na qual os dois organismos envolvidos aumentam seu *fitness* em comparação a uma situação em que não se estabelece a simbiose (BEGON, 2006). No caso da simbiose micorrízica, a interação entre os simbiotes se estabelece com base na troca de nutrientes. Os FMA formam micélio tanto no interior quanto fora das raízes, permitindo a ampliação do volume de solo explorado pelas mesmas, com conseqüente aumento na absorção de nutrientes como P, N e alguns micronutrientes como Cu e Mn (READ; PEREZ-MORENO, 2003). Em contrapartida, os FMA obtêm carbono, principalmente sacarose, da planta simbiótica. Esse carbono constitui sua única fonte de energia,

uma vez que os FMA não possuem a capacidade de degradar o C do solo (GIANINAZZI-PEARSON, 1996; LIU, 2010).

Os FMA são importantes na manutenção de vários serviços ecossistêmicos, não só na ciclagem de nutrientes como acima explicado, mas também na agregação do solo, resultado da intensa produção de hifas e da secreção de glomalina. Esta glicoproteína aumenta a cimentação das partículas, e portanto tem efeitos diretos sobre a formação dos macroagregados do solo (VILELA et al., 2014; WILSON et al., 2009). Os FMA também contribuem para o estabelecimento e crescimento das plantas em ambientes com teores elevados de elementos traço, contribuem na melhor resposta a estresse hídrico e na proteção a estresses de tipo biótico, como, por exemplo, a exposição a patógenos (POZO; AZCÓN-AGUILAR, 2007; DALLA-COSTA; SETE, 2010).

2.4.1 Ciclo de vida dos FMA

Em plantas vasculares, a colonização ocorre na região cortical da raiz e está mediada por fatores genéticos, morfológicos e funcionais. A interação entre os simbioses começa ainda antes de terem o primeiro contato físico. Os propágulos, estruturas a partir das quais os FMA podem crescer, encontram-se no solo, podendo estabelecer novas simbioses quando as condições de umidade e temperatura o permitirem (SOUZA et al., 2010). As hifas que começam a crescer a partir desses propágulos podem, eventualmente, interceptar uma raiz, e ao entrar em contato com a epiderme desse órgão, formam uma estrutura diferenciada chamada hifopódio, que faz a penetração da raiz e conduz o fungo até a região cortical. Há diferentes tipos de propágulos a partir dos quais os FMA podem crescer e colonizar as plantas. Os esporos, que são estruturas de resistência com uma espessa parede celular, e os fragmentos de hifas do micélio externo ou de raízes colonizadas ainda vivas, podem dar origem a uma nova colonização da raiz. A possibilidade de germinação a partir de diferentes tipos de propágulos é uma característica intrínseca de algumas famílias, sendo que a família Gigasporaceae só estabelece novas simbioses a partir da germinação dos esporos (HART; KLIRONOMOS, 2002).

No córtex, no espaço entre a parede e a membrana da célula vegetal, as hifas se diferenciam em arbúsculos, que são circundados por uma

membrana de origem vegetal chamada de membrana periarbuscular. Os arbúsculos são hifas muito ramificadas que permitem a troca de nutrientes e metabólitos entre os simbioses, mas os mecanismos que governam sua formação e desenvolvimento ainda não estão elucidados (KIRIACHEK et al., 2009). Na região cortical da raiz também são formadas as vesículas, que atuam no armazenamento de nutrientes por parte do fungo. Essas estruturas apresentam forma ovalada e geralmente podem ser encontradas nos espaços intercelulares. Entretanto, nem todas as espécies de glomeromicetos formam vesículas; na família Gigasporaceae há formação de estruturas análogas denominadas de células de armazenamento (MORTON; BENNY, 1990). Simultaneamente ao crescimento intrarradicular, acontece o crescimento do micélio externo: hifas que se expandem a partir da raiz e exploram o solo. Algumas dessas hifas são denominadas de absorptivas, por fazerem o transporte dos nutrientes (KIRIACHEK et al., 2009). O micélio externo conecta as raízes das plantas em uma rede subterrânea, pela qual se desenvolve a troca constante de nutrientes e onde parece acontecer uma troca de sinais entre as plantas (SELOSSE et al., 2006).

São poucos os estudos sobre autoecologia das diferentes espécies de FMA, porém há vários trabalhos demonstrando haver diferenças no comportamento de colonização, crescimento e reprodução dentro do *Phylum* (FITTER, 2009). Em geral, as espécies do grupo podem ser classificadas segundo a teoria da seleção *r/k*, dependendo da forma pela qual alocam os recursos em crescer ou se reproduzir. Espécies de estratégia *r* se caracterizam pela rápida germinação, colonização intrarradicular abundante, micélio externo com crescimento reduzido e produção de muitos esporos de tamanho pequeno. Tal estratégia é comum entre espécies da família Glomeraceae. Por outro lado, as espécies de estratégia *k* apresentam um crescimento mais lento, menor velocidade de colonização, expansão prolífica do micélio externo que contrasta com baixas porcentagens de colonização interna e produção de poucos esporos, mas que apresentam maior tamanho. Esta estratégia de vida é comum entre as espécies da família Gigasporaceae (HART; READER, 2002; FITTER, 2009).

2.4.2 Avaliação da composição da comunidade de FMA

Os processos fisiológicos envolvidos no estabelecimento da simbiose são sensíveis a fatores bióticos e abióticos. Entre os fatores bióticos estão o genótipo da planta simbiote e características relacionadas à estrutura e à morfologia das raízes, além da composição de espécies da microbiota da rizosfera. Entre os fatores abióticos destacam-se as condições climáticas e as características físico-químicas do solo, a luminosidade que condiciona a produção de fotoassimilados, a temperatura do solo e do ar, o pH, a salinidade e práticas agrônômicas como fertilização, irrigação e sistema de manejo do solo (GIANINAZZI-PEARSON, 1996; LIU; WANG, 2003; LIU, 2010; VARMA, 2008)

As espécies de FMA podem apresentar afinidade ou tolerância diferenciada às condições bióticas e abióticas relatadas, que por essa via podem modelar a composição da comunidade de FMA. Exemplos de como as comunidades de FMA reagem frente a diferentes condições são apresentadas por Oliveira et al (2009), que demonstraram variações da composição de espécies de FMA entre genótipos de milho com diferentes capacidades de absorção de fósforo. Sasvári & Posta (2010) demonstraram diferenças na composição filogenética dos FMA que colonizaram as raízes de plantas de milho em diferentes densidades de cultivo. Pode-se então inferir que a análise de comunidades é uma importante ferramenta para avaliar o impacto que têm sobre os FMA, as práticas agrícolas, como aração, fertilização e uso de agrotóxicos, o que suscita a investigação do possível impacto da liberação das proteínas recombinantes no ambiente da rizosfera.

O estudo de comunidades de FMA tem sido realizado mediante o uso de técnicas morfológicas e, mais recentemente, de técnicas moleculares para a identificação de espécies. A classificação dos Glomeromicetos, feita com base em características morfológicas dos esporos, avalia características subcelulares como número e aparência das camadas da parede celular, cor e tamanho, que permitem a classificação de gêneros e espécies (RAAB, et al., 2006). Entretanto, o limitado número de características morfológicas e a superposição das mesmas têm feito com que a classificação dos FMA gerada por este método resulte no agrupamento de alguns clados não monofiléticos, como no caso do

gênero *Glomus* (*sensu lato*), que foi reclassificado com base, principalmente, em características genéticas (SCHWARZOTT; WALKER; SCHÜßLER, 2001). Perante tais dificuldades, os métodos moleculares se configuram como uma ferramenta que pode ajudar na definição dos grupos morfológicamente menos divergentes. Além disso, a amplificação de diferentes regiões do DNA nuclear, principalmente das regiões que codificam para as subunidades do ribossomo, são empregadas para a definição de filotipos ou unidades taxonômicas operacionais, usadas principalmente nos estudos de comunidades (KRÜGER et al., 2012; WALKER et al., 2007). Migrando entre os conceitos morfológico e filogenético de espécie, a taxonomia dos glomeromicetos tem mudado muito na última década. A última proposta de classificação, define os grupos com base em características morfológicas e moleculares, resultando em quatro ordens, 11 famílias e 26 gêneros com aproximadamente 215 espécies descritas (REDECKER et al., 2013).

2.4.3 Uso da técnica de PCR-DGGE para a avaliação da composição da comunidade de FMA

Diferentes técnicas da biologia molecular podem ser usadas para avaliar a identidade de uma espécie ou isolado de FMA, inclusive para estabelecer a composição de espécies de uma determinada comunidade. Em geral essas técnicas podem levar à identidade taxonômica dos FMA, como no caso do sequenciamento pelo método Sanger ou dos sequenciamentos de nova geração (Ion Torrent, Pirosequenciamento, Illumina, etc), ou podem produzir um perfil da comunidade (técnicas de *fingerprinting*), como no caso das técnicas baseadas no uso de agentes desnaturantes (DGGE e SSPC) ou em enzimas de restrição (T-RFLP), que resultam em perfis de bandas mediante os quais podem ser diferenciados arranjos que equivalem a comunidades distintas. As bandas assim obtidas podem ser posteriormente purificadas e os organismos identificados mediante técnicas de sequenciamento (GORZELAK, et al., 2012).

A técnica da PCR-DGGE (reação em cadeia da polimerase seguida de eletroforese em gel com gradiente desnaturante) faz parte desse conjunto de técnicas moleculares permitindo a separação eletroforética

de produtos da PCR obtidos a partir de amostras complexas, ou seja, de amostras de comunidades de organismos vivos, por exemplo de bactérias e fungos do solo. Na década de 1990 essas técnicas foram introduzidas no campo da ecologia molecular microbiana, e desde então auxiliam vários avanços nessa área do conhecimento. Na técnica da PCR-DGGE, a separação das bandas acontece devido às diferenças na estrutura das sequências de nucleótidos dos organismos, em particular, da relação entre os conteúdos de citosina e guanina (C-G). Os agentes desnaturantes contidos no gel de corrida quebram mais rapidamente as duplas pontes de hidrogênio das ligações adenina – timina (A-T) do que as triplas pontes de hidrogênio das ligações G-C, acarretando em padrões distintos de migração no gel de poliacrilamida baseado na composição de nucleotídeos de cada organismo presente na amostra (GASPAROTTO et al., 2010).

Perguntas de pesquisa relacionadas à ecologia de comunidades frequentemente procuram respostas sobre a composição, diversidade, abundância e riqueza das espécies associadas a diferentes ecossistemas (BEGON, 2006). Como todas as técnicas de fingerprinting, a PCR-DGGE é usada para elucidar mudanças na composição de uma comunidade. No entanto, para obter a identidade das espécies presentes numa determinada amostra devem ser acoplados outros procedimentos, como a clonagem e o sequenciamento. Por isso, inferências sobre diversidade, abundância ou riqueza não devem ser feitas com base no número ou intensidade das bandas no gel da DGGE (BENT; FORNEY, 2008; GORZELAK et al., 2012). Contudo, essa técnica é rápida e de custo relativamente baixo, o que permite o processamento de um número maior de amostras de maneira simultânea, permitindo a identificação de amostras de maior interesse, que posteriormente podem ser analisadas mais exaustivamente (GASPAROTTO et al., 2010).

A análise de comunidades de FMA mediante uso da PCR-DGGE foi introduzida por KOWALCHUK, et al. (2002). Esses autores extraíram DNA a partir de esporos de FMA previamente identificados, depois compararam o padrão de migração de bandas obtidas a partir do material genético dos esporos e de amostras de solo e raízes de *Ammophila arenaria*, uma planta de ocorrência em dunas. Esse estudo demonstrou que os padrões de migração dos fungos eram conservados, mas também

evidenciou que uma mesma espécie de FMA pode produzir mais de uma banda. Tal foi o caso da espécie *Rhizophagus clarus*, que apresentou duas bandas, mesmo na extração feita a partir de um único esporo, demonstrando que o número de bandas não representa o número de taxa na amostra estudada. Esse estudo demonstrou a eficiência da PCR-DGGE na diferenciação entre as comunidades de FMA associadas a plantas saudáveis e doentes, fatores que os autores queriam comparar visando à conservação da planta. Assim como naquele estudo, outros trabalhos têm demonstrado a utilidade dessa técnica na discriminação de comunidades de FMA, em solos provenientes de diferentes ecossistemas (LIANG et al., 2008), plantas com diferentes aptidões para absorção de fósforo (OLIVEIRA et al., 2009), sob diferentes manejos agrícolas (TIAN et al., 2013) e arranjos de comunidades de FMA em solos sob aplicação de inseticidas biológicos (IPSILANTIS; SAMOURELIS; KARPOUZAS, 2012), entre outras situações de interesse na biologia desses fungos.

Uma das principais vantagens associadas ao uso dessa técnica é que possibilita a avaliação de comunidades de FMA no interior de fragmentos de raiz (JIE; LIU; CAI, 2013). A comparação de caracteres das estruturas fúngicas desenvolvidas no interior da raiz não permite a identificação de nenhuma hierarquia taxonômica se usados métodos baseados na morfologia, razão pela qual, até o desenvolvimento das técnicas moleculares, esse tipo de estudo era impossível. Da mesma maneira, o uso da PCR-DGGE permite a identificação de um maior número de taxa em amostras de solo, uma vez que estimações feitas com base em esporos podem subestimar a verdadeira diversidade, pela possível presença de espécies de FMA não esporulantes no momento da amostragem (LIANG et al., 2008; SAKS et al., 2014).

A escolha da região do DNA a ser amplificada é de fundamental importância, pois define o nível de resolução taxonômica do trabalho (GORZELAK et al., 2012). A maioria dos estudos com comunidades de FMA utiliza iniciadores que amplificam o DNA ribossomal, porque os genes naquela região apresentam sequências codificantes altamente conservadas, como as presentes nas subunidades 18S e 28S rDNA, tendo também regiões não codificantes e de maior variabilidade, como os espaçadores intergênicos (ITS). Ao apresentarem regiões com alto

nível de homologia entre taxa próximos, os genes rDNA são amplamente utilizados em estudos filogenéticos (STOCKINGER; KRÜGER; SCHÜßLER, 2010). Van Tuinen et al. (1998) relataram a maior variabilidade dos domínios D1 e D2 compreendidos na região do gene rDNA 28S, o que se constituiu como uma vantagem sobre o uso do rDNA 18S, uma vez que o primeiro conseguia resolver diferenças entre taxa do gênero *Glomus* (*sensu lato*), oferecendo uma maior resolução taxonômica. Essa região do rDNA só apresenta uma desvantagem em relação à região do 18S, aquela é menos utilizada que esta. Contudo as bases de dados contendo sequencias da região do 28S crescem em número de dados e há maior número de sequencias dessa região disponíveis para comparação (GOLLOTTE; VAN TUINEN; ATKINSON, 2004).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDOW, D. A.; HILBECK, A. Science-based risk assessment for nontarget effects of transgenic crops. **BioScience**, v. 54, n. 7, p. 637–649, 2004.
- BCH, Biosafety Clearing House, MON-89Ø34-3 - YieldGard™ VT Pro™ Modified Organism Information, 2016 a. Disponível em: <http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=43773>. Acesso em Janeiro de 2015.
- BCH Biosafety Clearing House. SYN-BTØ11-1 - YieldGard™ Modified Organism Information, 2016 b. Disponível em: <http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=14797>. Acesso em Janeiro 2015.
- BEGON, M. **Ecology: from individuals to ecosystems**. 4th ed ed. Malden, MA: Blackwell Pub, 2006.
- BENT, S. J.; FORNEY, L. J. The tragedy of the uncommon: understanding limitations in the analysis of microbial diversity. **The ISME journal**, v. 2, n. 7, p. 689–695, 2008.
- CROSBIE, T. M. et al. **Plant breeding: past, present, and future**. Plant breeding: the Arnel R. Hallauer international symposium. **Anais...**Wiley Online Library, 2006
- BRASIL, I. Levantamento sistemático de produção agrícola. [s.l: s.n.].
- BRAVO, A. et al. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity: Evolution of Bt toxins. **Microbial Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 17–26, jan. 2013.
- BUSSE, M. et al. Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. **Soil Biology & Biochemistry**, p. 1777–1789, 2001.
- CARTAGENA PROTOCOL. Cartagena Protocol on biosafety to the convention on biological diversity, 2000. Disponível em <http://bch.cbd.int/protocol>. Acesso em 2012.
- CASTALDINI, M. 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, n. 11, p. 6719–6729, 2005.
- CHEN, Z. H.; CHEN, L. J.; WU, Z. J. Relationships among persistence of *Bacillus thuringiensis* and Cowpea trypsin inhibitor proteins, microbial properties and enzymatic activities in rhizosphere soil after repeated cultivation with transgenic cotton. **Applied Soil Ecology**, v. 53, p. 23–30, fev. 2012.
- CTNBIO. Plantas geneticamente modificadas aprovadas para comercialização no Brasil. Disponível em: <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/12482.html>. Acesso em: fev. 2016.
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Perspectivas para a Agropecuária. Produtos de Verão** v.3, Sexto Levantamento 2013/2014. P.1-83. Brasília, 2015.
- DALLA-COSTA, M.; PAULO EMÍLIO; SETE, P. Micorrização e indução de quitinases e β -1,3-glucanases e resistência à fusariose em porta-enxerto de videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira - PAB**, v. 45, n. 4, 2010.
- DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in genetics: TIG**, v. 17, n. 4, p. 193–199, 2001.
- DEVARE, M. H.; JONES, C. M.; THIES, J. E. Effect of Cry3Bb transgenic corn and tefluthrin on the soil microbial community. **Journal of Environmental Quality**, v. 33, n. 3, p. 837–843, 2004.
- FITTER, A. H. Natural selection and the evolutionary ecology of the arbuscular mycorrhizal fungi (Phylum Glomeromycota). **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 9, p. 2465–2480, 2009.
- FLORES, S.; SAXENA, D.; STOTZKY, G. Transgenic Bt plants decompose less in soil than non-Bt plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1073–1082, 2005.
- GASPAROTTO, F. A. et al. Técnicas moleculares aplicadas ao estudo de micorrizas. In: SIQUEIRA, J. O. et al. (Eds.). **Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil**. 1. ed. Lavras, MG: Editora UFLA, 2010. p. 551–582.

- GIANINAZZI-PEARSON, V. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. **The Plant Cell**, v. 8, n. 10, p. 1871, 1996.
- GOLLOTTE, A.; VAN TUINEN, D.; ATKINSON, D. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising roots of the grass species *Agrostis capillaris* and *Lolium perenne* in a field experiment. **Mycorrhiza**, v. 14, n. 2, p. 111–117, 2004.
- GORZELAK, M. A. et al. Molecular approaches for AM fungal community ecology: A primer. **Journal of Microbiological Methods**, v. 90, n. 2, p. 108–114, 2012.
- HART, M. M. et al. Separating the effect of crop from herbicide on soil microbial communities in glyphosate-resistant corn. **Pedobiologia**, v. 52, n. 4, p. 253–262, 2009.
- HART, M. M.; READER, R. J. Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v. 153, n. 2, p. 335–344, 2002.
- HART, M.; KLIRONOMOS, J. Colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi using different sources of inoculum. **Mycorrhiza**, v. 12, n. 4, p. 181–184, 2002.
- HELASSA, N.; QUIQUAMPOIX, H.; STAUNTON, S. Structure, Biological Activity and Environmental Fate of Insecticidal Bt (*Bacillus thuringiensis*) Cry Proteins of Bacterial and Genetically Modified Plant Origin. In: XU, J.; SPARKS, D. L. (Eds.). **Molecular Environmental Soil Science. Progress in Soil Science**. [s.l.] Springer Netherlands, 2013. p. 49–77.
- HENRI H. DINEL, M. M. S. Extractable soil lipids and microbial activity as affected by Bt and non Bt maize grown on a silty clay loam soil. **Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes**, v. 38, n. 2, p. 211–9, 2003.
- HOLDEN, M. J. et al. The use of 35S and Tnos expression elements in the measurement of genetically engineered plant materials. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 6, p. 2175–2187, 2010.

- HÖSS, S. et al. Assessing the risk posed to free-living soil nematodes by a genetically modified maize expressing the insecticidal Cry3Bb1 protein. **Science of The Total Environment**, v. 409, n. 13, p. 2674–2684, 2011.
- ICOZ, I.; STOTZKY, G. Fate and effects of insect-resistant Bt crops in soil ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 3, p. 559–586, 2008.
- IPSILANTIS, I.; SAMOURELIS, C.; KARPOUZAS, D. G. The impact of biological pesticides on arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 45, p. 147–155, 2012.
- ISAAA. Biotech Facts & Trends Brazil (J. Clive, Ed.), 2015. Disponível em: http://www.isaaa.org/resources/publications/biotech_country_facts_and_trends/download/Facts%20and%20Trends%20-%20Brazil.pdf. Acesso em Maio de 2016.
- JIE, W.; LIU, X.; CAI, B. Diversity of Rhizosphere Soil Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Various Soybean Cultivars under Different Continuous Cropping Regimes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e72898, 2013.
- KAMATH, S. P. et al. Quantification of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab protein in tissues of YieldGard® (MON810) corn hybrids tested at multiple field locations in India. **Crop Protection**, v. 29, n. 9, p. 921–926, 2010.
- KIRIACHEK, S. G. et al. Regulation of arbuscular mycorrhizae development. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 1, p. 1–16, 2009.
- KOWALCHUK, G. A.; DE SOUZA, F. A.; VAN VEEN, J. A. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 3, p. 571–581, 2002.
- LAWHORN, C. N.; NEHER, D. A.; DIVELY, G. P. Impact of coleopteran targeting toxin (Cry3Bb1) of Bt corn on microbially mediated decomposition. **Applied Soil Ecology**, v. 41, n. 3, p. 364–368, 2009.

- LIANG, Z. et al. A DGGE-cloning method to characterize arbuscular mycorrhizal community structure in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 4, p. 956–966, 2008.
- LIANG, Z. et al. A DGGE-cloning method to characterize arbuscular mycorrhizal community structure in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 4, p. 956–966, 2008.
- LIU, R.; WANG, F. Selection of appropriate host plants used in trap culture of arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycorrhiza**, v. 13, n. 3, p. 123–127, 2003.
- LIU, W. Do genetically modified plants impact arbuscular mycorrhizal fungi? **Ecotoxicology**, v. 19, n. 2, p. 229–238, 2010.
- LONDOÑO-R, L. M.; TARKALSON, D.; THIES, J. E. In-field rates of decomposition and microbial communities colonizing residues vary by depth of residue placement and plant part, but not by crop genotype for residues from two Cry1Ab Bt corn hybrids and their non-transgenic isolines. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 57, p. 349–355, 2013.
- LURQUIN, P. F. **High tech harvest: understanding genetically modified food plants**. [s.l.] Basic Books, 2004.
- MAIZE PROJECT. Genetic Diversity of Maize, 2009. Disponível em <http://maize.uga.edu/index.php?loc=diversity>. Acesso em 23 de Junio de 2013.
- MIETHLING-GRAFF, R.; DOCKHORN, S.; TEBBE, C. C. Release of the recombinant Cry3Bb1 protein of Bt maize MON88017 into field soil and detection of effects on the diversity of rhizosphere bacteria. **European Journal of Soil Biology**, v. 46, n. 1, p. 41–48, 2010.
- MORTON, J. B.; BENNY, G. L. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. **Mycotaxon**, v. 37, p. 471–491, 1990.
- MURPHY, D. J. **People, plants, and genes: the story of crops and humanity**. Oxford?; New York: Oxford University Press, 2007.

- NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Avaliação de riscos ambientais de plantas transgênicas. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 18, n. 1, p. 81–116, 2001.
- OLIVEIRA, C. A. et al. Assessment of the mycorrhizal community in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) genotypes contrasting for phosphorus efficiency in the acid savannas of Brazil using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **Applied Soil Ecology**, v. 41, n. 3, p. 249–258, 2009.
- POZO, M. J.; AZCÓN-AGUILAR, C. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, Special Issue on Biotic Interactions Edited by Jane Glazebrook and Jurriaan Ton. v. 10, n. 4, p. 393–398, 2007.
- RAAB, P. A.; BRENNWALD, A.; REDECKER, D. Mitochondrial large ribosomal subunit sequences are homogeneous within isolates of *Glomus* (arbuscular mycorrhizal fungi, Glomeromycota). **Mycological Research**, v. 109, n. 12, p. 1315–1322, dez. 2005.
- READ, D. J.; PEREZ-MORENO, J. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems—a journey towards relevance? **New Phytologist**, v. 157, n. 3, p. 475–492, 2003.
- REDECKER, D. et al. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). **Mycorrhiza**, v. 23, n. 7, p. 515–531, 2013.
- REEVES, T. G.; THOMAS, G.; RAMSAY, G. **Save and grow in practice: maize, rice and wheat. A guide to sustainable cereal production**. 1. ed. Rome: Food & Agriculture Organization (FAO), 2016.
- SAKS, Ü. et al. Root-colonizing and soil-borne communities of arbuscular mycorrhizal fungi in a temperate forest understorey. **Botany**, v. 92, n. 4, p. 277–285, 2014.
- SASVÁRI, Z.; POSTA, K. Effect of different plant densities on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi community in a long-term maize monocrop system. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 8, n. S1, p. 123–130, 2010.
- SAXENA, D. et al. Larvicidal Cry proteins from *Bacillus thuringiensis* are released in root exudates of transgenic *B. thuringiensis* corn,

- potato, and rice but not of *B. thuringiensis* canola, cotton, and tobacco. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 383–387, 2004.
- SAXENA, D.; FLORES, S.; STOTZKY, G. Vertical movement in soil of insecticidal Cry1Ab protein from *Bacillus thuringiensis*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 111–120, 2002.
- SCHÜBLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, v. 105, n. 12, p. 1413–1421, 2001.
- SCHWARZOTT, D.; WALKER, C.; SCHÜBLER, A. Glomus, the Largest Genus of the Arbuscular Mycorrhizal Fungi (Glomales), Is Nonmonophyletic. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 21, n. 2, p. 190–197, 2001.
- SELOSSE, M.-A. et al. Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses? **Trends in Ecology & Evolution**, v. 21, n. 11, p. 621–628, nov. 2006.
- SINGH, A. K.; SINGH, M.; DUBEY, S. K. Rhizospheric fungal community structure of a Bt - brinjal and a near isogenic variety. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, n. 3, p. 750–765, 2014.
- SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal Symbiosis**, 3.ed. Amsterdam; Boston: Academic Press, 2008.
- SOT (Society of Toxicology). The safety of genetically modified foods produced through biotechnology. **Toxicology Science**, v.71, p.2-8. 2003.
- SOUZA, F. A. et al. Classificação e taxonomia de fungos micorrízicos arbusculares e sua diversidade e ocorrência no Brasil. In: SIQUEIRA, J. . et al. (Eds.). **Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil**. Lavras: UFLA, 2010. p. 15, 75.
- SOUZA, F. A. et al. Classificação e taxonomia de fungos micorrízicos arbusculares e sua diversidade e ocorrência no Brasil. In: SIQUEIRA, J. et al. (Eds.). **Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil**. Lavras: UFLA, 2010. p. 15, 75.
- STOCKINGER, H.; KRÜGER, M.; SCHÜBLER, A. DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v. 187, n. 2, p. 461–474, 2010.

- SZÉKÁCS, A. et al. Inter-laboratory comparison of Cry1Ab toxin quantification in MON 810 maize by enzyme-immunoassay. **Food and Agricultural Immunology** v. 23, n. 2, p. 99–121, 2012.
- TAN, S.; EVANS, R.; SINGH, B. Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. **Amino Acids**, v. 30, n. 2, p. 195–204, 2006.
- TIAN, H. et al. Impact of long-term nitrogen fertilization and rotation with soybean on the diversity and phosphorus metabolism of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi within the roots of maize (*Zea mays* L.). **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 164, p. 53–61, 2013.
- USDA. Maiz producción mundial 2016/2017, 2016. Disponível em <https://www.produccionmundialmaiz.com/>. Acesso em Fevereiro de 2016.
- VARMA, A. (ED.). **Mycorrhiza**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008.
- VELASCO, A. G.-V. et al. Increased microbial activity and nitrogen mineralization coupled to changes in microbial community structure in the rhizosphere of Bt corn. **Applied Soil Ecology**, v. 68, p. 46–56, 2013.
- VILELA, L. A. F. et al. Arbuscular mycorrhizal fungus in microbial activity and aggregation of a Cerrado Oxisol in crop sequence. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 1, p. 34–42, 2014.
- VILLA, T. C. C. et al. Defining and identifying crop landraces. **Plant Genetic Resources: characterization and utilization**, v. 3, n. 3, p. 373–384, 2005.
- WANG, Y. et al. Determination of the movement and persistence of Cry1Ab/1Ac protein released from Bt transgenic rice under field and hydroponic conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 58, p. 107–114, 2013.
- WILSON, G. W. T. et al. Soil aggregation and carbon sequestration are tightly correlated with the abundance of arbuscular mycorrhizal fungi: results from long-term field experiments. **Ecology Letters**, v. 12, n. 5, p. 452–461, 2009.

XUE, K. et al. Changes in soil microbial community structure associated with two types of genetically engineered plants analyzing by PLFA. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 17, n. 1, p. 130–134, 2005.

3. HIPÓTESES E OBJETIVOS

3.1 Hipóteses

A presente pesquisa testou as seguintes hipóteses:

Ao modificar o *background* genético da planta, a transgenia tem efeitos sobre a porcentagem de colonização micorrízica e a resposta da planta à inoculação com FMA.

A associação micorrízica depende da identidade genética da planta simbiote (espécie ou cultivar), e em decorrência disso há diferenças no desempenho da simbiose entre genótipos de milho híbridos ou crioulos, que tem diferentes históricos de seleção.

A transgenia pode afetar de diferentes maneiras os FMA que apresentam diferentes estratégias ecológicas.

A composição da comunidade de FMA no solo e na rizosfera de plantas de milho é influenciada pela identidade genética da planta simbiote, as modificações genéticas sofridas pelo milho transgênico e o estágio fenológico da cultura.

3.2 Objetivo Geral

Avaliar a influência do genótipo e da transgenia de plantas de milho sobre aspectos morfofisiológicos da associação micorrízica e sobre a diversidade taxonômica de fungos micorrízicos arbusculares.

3.3 Objetivos específicos

Avaliar a porcentagem de colonização micorrízica de dois milhos transgênicos (DKB 240 VT pro e Formula TL) suas contrapartes isogênicas (híbridos convencionais de milho DKB 240 e Fórmula) e uma variedade de milho crioulo (Pixurum).

Comparar o desempenho da simbiose de dois milhos transgênicos (DKB 240 VT pro e Formula TL) suas contrapartes isogênicas (híbridos convencionais de milho DKB 240 e Fórmula) e uma variedade de milho crioulo (Pixurum), pela avaliação do crescimento vegetal e da absorção de fósforo.

Caracterizar a composição da comunidade de fungos micorrízicos associada às raízes e ao solo rizosférico de um híbrido de milho transgênico (DKB 240 VT pro), do híbrido convencional (DKB 240) e do milho crioulo (Pixurum) durante os estágios vegetativo e reprodutivo da cultura.

CAPITULO I

GRAU DE COLONIZAÇÃO E DESEMPENHO DA SIMBIOSE MICORRÍZICA ARBUSCULAR EM PLANTAS DE MILHO TRANSGÊNICO, SUAS ISOLINHAS (HÍBRIDOS CONVENCIONAIS) E MILHO CRIOULO

1. APRESENTAÇÃO

A seguir são apresentados dois experimentos realizados em casa de vegetação os quais tiveram como objetivo responder as seguintes perguntas:

Há diferenças no desempenho da simbiose entre plantas de milho transgênicas e sua isolinha?

Há diferenças no desempenho da simbiose micorrízica entre híbridos (isolinhas e transgênicos) e variedades de polinização aberta (crioulas)?

Há efeitos da transgênese sobre o crescimento e desenvolvimento de duas espécies de FMA com estratégias ecológicas contrastantes?

Essas três perguntas estão subordinadas a maiores questionamentos: primeiro, sobre os efeitos deletérios ou não dos transgênicos sobre a simbiose micorrízica; segundo sobre a possibilidade de que a transgênese tenha efeitos diferenciados, segundo o tipo de estratégia ecológica da espécie de FMA avaliada; e finalmente, sobre a possibilidade de que os efeitos sejam decorrentes das características próprias do genótipo, que, em última instância, são o resultado das intenções com as quais foram melhoradas.

Os experimentos abrangeram uma variedade crioula comumente produzida no estado de Santa Catarina, dois híbridos convencionais (isolinhas) e dois transgênicos que produzem diferentes tipos de proteínas recombinantes. Também foram avaliados diferentes estágios fenológicos do milho, em duas épocas do ano (inverno e verão) de forma a testar o maior número de situações possíveis.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Experimento I – Influência dos eventos MON 89034 e Bt11 sobre o desenvolvimento da simbiose micorrízica em relação às isolinhas e um milho crioulo

2.1.1 Material biológico utilizado

Para este experimento foram usadas sementes de cinco genótipos de milho: o genótipo DKB 240 (DKB-I), híbrido convencional, isolinha do milho DKB 240-VT PRO (DKB-T), transgênico que contém o evento MON 89034, com produção simultânea das proteínas recombinantes *r-Cry 1A.105* e *r-Cry 2Ab2*. O híbrido convencional Fórmula (FORM-I), isolinha do milho transgênico Fórmula-TL (FORM-T) que contém evento Bt 11, com produção da proteína recombinante *r-Cry 1Ab* e da proteína *r-PAT*. Por último, o genótipo Pixurum 5 (crioulo), milho crioulo de polinização aberta, amplamente utilizado no Oeste de Santa Catarina pelos agricultores familiares (MPA, 2010).

As sementes de milho foram colocadas em álcool 70% durante três minutos, depois foram colocadas durante dois minutos em hipoclorito de sódio 2,5%, e por último foram lavadas com abundante água destilada. Em seguida, foram pré-germinadas em papel filtro umedecido, acondicionado em placas de Petri, três dias antes da implantação do experimento. As sementes germinadas foram transferidas para vasos (1,5 L) contendo solo autoclavado. Cada vaso recebeu três sementes e, após verificar o crescimento das plantas, foi realizado o desbaste, com o objetivo de deixar em cada vaso uma planta sadia e de boa aparência. A esterilização do solo foi realizada a 121° C durante uma hora, processo que foi repetido após 24 horas de repouso. O solo utilizado neste experimento apresentou as seguintes características: textura arenosa (9% de argila); matéria orgânica 19 g dm⁻³; pH em água 4,7; acidez potencial 5,30 (pelo índice do SMP); P 7,8 mg kg⁻¹; Al trocável 1,7 cmolc L⁻¹; Ca trocável 0,8 cmolc L⁻¹ e Mg trocável 0,3 cmolc L⁻¹.

Para detectar a presença dos transgenes nos híbridos transgênicos e testar a ausência dos mesmos nos híbridos convencionais

(isolinhas) e na variedade de milho crioulo, foram destacados fragmentos de folha, de aproximadamente 5 cm², da parte medial da última folha bem desenvolvida de cada indivíduo utilizado nas avaliações. Esses fragmentos foram armazenados em sacos plásticos a -80 °C. Posteriormente foram agrupados, segundo o genótipo, cada grupo esteve conformado por 32 fragmentos de folha, que foram macerados com água destilada estéril e o sobrenadante foi avaliado para presença da proteína Cry 1Ab utilizando o kit QuickStixTM (Envirologix, Portland, USA) (SAXENA et al., 2004).

Para a inoculação foram utilizados os isolados 14I-UFSC da espécie *Rhizophagus clarus* (Rc), obtido da coleção de FMA do laboratório de Microbiologia do Solo (UFSC, Florianópolis) e o isolado 3.3-UFSC da espécie *Gigaspora margarita* (Gm) obtido da mesma coleção. Ambos isolados foram obtidos a partir de amostras de solo de áreas de mineração de carvão, no município de Criciúma (SC). *Rhizophagus clarus* apresenta esporos com variação fenotípica relativamente grande, podem ser de globosos a irregulares, brancos, amarelos ou marrons, com diâmetro médio de 180 µm. Apresenta vesículas oblongas que frequentemente são formadas perto dos pontos de entrada à raiz. As hifas intrarradiculares variam entre 2 e 5 µm de diâmetro e usualmente crescem em paralelo, formando um padrão de crescimento em “H” quando se conectam entre si. O gênero faz parte da família Glomeraceae e apresenta características de crescimento compatíveis com a estratégia r de crescimento. *Gigaspora margarita* apresenta esporos globosos a subglobosos, brancos a cremes ou amarelos em alguns isolados. Os esporos apresentam diâmetro médio de 321 µm. Esta espécie faz parte da família Gigasporaceae e exhibe características de crescimento típicas de organismos estrategistas k.

2.1.2 Delineamento e montagem do experimento

O experimento foi montado em esquema fatorial 4 x 5 em delineamento em blocos ao acaso com quatro repetições. Os fatores avaliados foram: cinco genótipos de milho (DKB-I, DKB-T, FORM-I, FORM-T e Crioulo) e quatro tratamentos de inoculação [Não inoculado (NI), Rc, Gm e Rc + Gm]. O experimento foi conduzido por um período

de 60 dias (maio a julho de 2013) em casa de vegetação do Laboratório de Microbiologia do Solo da UFSC. As temperaturas médias mensais do período de condução do experimento são apresentadas na tabela 1. O fotoperíodo da casa de vegetação foi ajustado para que as plantas recebessem 12 horas de luz por dia.

Tabela 1. Temperaturas médias mensais do ar, durante a condução do experimento (Maio a Julho de 2013).

	Temperatura do ar (° C)		
	Maio	Junho	Julho
Temperatura média	19,6	18,6	16,0
Temperatura máxima	24,1	22,5	21,3
Temperatura mínima	15,1	14,7	10,8

Os esporos utilizados para inoculação, foram extraídos pelo método de peneiramento úmido seguido de centrifugação em gradiente de sacarose (GERDEMANN; NICOLSON, 1963). A inoculação foi realizada durante a transferência das sementes germinadas para o vaso. Cinquenta esporos, de cada espécie de FMA, separados manualmente com uso de estereoscópio, foram colocados em solução aquosa e aplicados perto da região da radícula do milho. No tratamento Rc+Gm foram colocados 50 esporos de cada espécie.

Os vasos foram suplementados com solução nutritiva para manter o status nutricional da planta. Um dia antes da transferência da semente pré-germinada para o vaso, foram colocados 50 mL de solução completa de Hogland e Arnon (1950). Posteriormente 50 mL da mesma solução, sem P, foram aplicados quatro semanas após a semeadura, e na mesma data foi aplicada solução de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ equivalente a 50 mg L^{-1} de P por vaso. As coletas foram realizadas aos 30 e 60 dias após a emergência das plantas.

2.1.3 Avaliações e análise estatística

As plantas foram cuidadosamente removidas do vaso e foi realizado um corte rente ao solo, para separar o sistema radicular da parte aérea. As raízes foram lavadas em água corrente até a retirada das partículas de solo aderidas. De cada raiz foram cortados segmentos da parte distal, medial e proximal, correspondentes a aproximadamente 1 g cada. Essas raízes foram guardadas em cápsulas, para posterior coloração. A parte aérea foi colocada em sacos de papel e levada a estufa de secagem a 50° C até atingir peso constante.

Avaliação da colonização micorrízica: as raízes armazenadas nas placas de coloração, foram deixadas em KOH 10% (m/v) durante uma noite, com o objetivo de clarear o tecido vegetal; quando necessário, foram colocadas na mesma solução a 90 °C. Em seguida, foram colocadas em HCl 1% (v/v) e depois coradas com azul de tripano, segundo o método descrito por Koske e Gemma (1989). Para avaliação da colonização total, as raízes foram analisadas em estereoscópio, utilizando o método da interseção em placa quadriculada (GIOVANNETTI; MOSSE, 1980).

Avaliação do desempenho das simbioses: para quantificar o efeito da simbiose sobre o desenvolvimento das plantas, em cada coleta foram avaliadas a altura do colmo até o último nó (cm) e o diâmetro (mm) medido a 1,0 cm da superfície do vaso. Também foi registrada a massa seca da parte aérea das plantas.

Depois de seca, uma porção da parte aérea da planta foi retirada e submetida a digestão nítricoperclórica (LATIMER, 2012). No extrato obtido foi feita a determinação do teor de P (g de P kg de massa seca⁻¹) utilizando o método colorimétrico (MURPHY; RILEY, 1962). O acúmulo de P foi calculado multiplicando a massa seca da parte aérea pelo teor de P de cada planta.

A resposta de cada genótipo à simbiose micorrízica foi avaliada segundo os incrementos na massa da parte aérea e no teor de fósforo induzidos pelos FMA (JANOS, 2007).

Análise estatística: Todos os dados foram submetidos a teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias

(Cochran). A porcentagem de colonização total foi transformada com a função raiz quadrada para atingir os pressupostos da ANOVA, após o qual foi avaliada mediante análise de variância, e posterior comparação mediante uso de análises de contrastes ortogonais. Os contrastes testados foram: crioulo vs híbridos; híbrido DKB vs híbrido FORM; DKB-I vs DKB-T e FORM-I vs FORM-T. Os contrastes foram desenhados com o objetivo de testar: a diferença entre o transgênico e a isolinha dentro de cada híbrido, as diferenças entre os dois híbridos e deles com o milho crioulo.

As variáveis altura, diâmetro, biomassa, teor e acúmulo de fósforo foram avaliadas em cada coleta, de forma independente, com o objetivo de isolar a variação produzida pelo crescimento dos organismos avaliados. O modelo utilizado foi o de ANOVA fatorial, comparando os cinco genótipos e todas as condições de inoculação (Rc, Gm, Rc+Gm e NI) mediante teste de separação de médias Skott-Knott 5%.

2.2 Experimento II - Desenvolvimento da simbiose micorrízica entre *Rhizophagus clarus* e os genótipos de milho MON 89034, Bt11, suas isolinhas e um milho crioulo

A montagem deste experimento foi decorrência das perguntas levantadas durante a análises dos resultados do experimento I, principalmente sobre a existência de diferenças na resposta à simbiose micorrízica dos genótipos avaliados e a relação com fatores ambientais, principalmente de temperatura, ou com características fisiológicas de cada genótipo relacionadas à micorrização (quantidade de carboidratos solúveis na raiz e teor de clorofila total).

2.2.1 Material biológico utilizado

Neste experimento foram utilizados os cinco genótipos de milho e o isolado de *Rhizophagus clarus* descritos no experimento anterior. Foram seguidos os mesmos procedimentos de semeadura e inoculação, utilizado o mesmo solo e mantido o mesmo tipo de vaso e as mesmas condições de crescimento e fertilização. Igualmente, foram

realizados os testes de detecção dos transgenes como descritos anteriormente.

2.2.2 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em esquema fatorial 5X2, com quatro repetições. O delineamento experimental foi completamente casualizado. Os fatores avaliados foram: genótipos de milho (DKB-I, DKB-T, FORM-I, FORM-T e Crioulo) e dois tratamentos de inoculação [Não inoculado (NI) e inoculado com *Rhizophagus clarus* (Rc)]. O experimento foi realizado em casa de vegetação durante os meses de fevereiro a abril de 2015. As temperaturas médias mensais são apresentadas na tabela 2. As coletas foram realizadas aos 30 e 60 dias após a emergência das plantas.

Tabela 2. Temperaturas médias mensais do ar, durante a condução do experimento (Fevereiro a Abril de 2015).

	Temperatura do ar (° C)		
	Fevereiro	Março	Abril
Temperatura média	26,1	24,5	22,2
Temperatura máxima	30,1	28,3	23,5
Temperatura mínima	22,1	20,8	20,9

2.2.3 Avaliações e análise estatística

Foram avaliadas a altura da planta, o diâmetro do colmo a biomassa da parte aérea e da raiz, o teor e acúmulo de P e a resposta à micorrização, como já descrito nos ensaios anteriores. Também foram avaliados o número de esporos, o teor de carboidratos solúveis na raiz e o teor de clorofila (A, B e total).

A avaliação do teor de carboidratos solúveis na raiz, foi realizado pelo método do fenol-sulfúrico (DUBOIS et al. 1956). Aproximadamente 0,500 g de matéria fresca de raiz foram maceradas

em nitrogênio líquido (-196 °C), transferidos para tubo Falcon e misturados com 1,5 mL de etanol (80% - mantido em refrigeração). Posteriormente, os tubos foram colocados em banho-maria (70 °C) durante cinco minutos para depois serem centrifugados (400 g, durante 10 minutos) e passados por filtro de fibra de vidro. O ciclo de adição de etanol – banho-maria – centrifugação - filtração foi realizado três vezes e durante a etapa final, o extrato foi ajustado a 5 mL (volume total) com etanol. Estimou-se o teor de carboidratos a partir de plotagem das absorbâncias (490 nm) em uma curva padrão realizada com concentrações conhecidas de glicose. Para tal fim, os extratos foram preparados com água, ácido sulfúrico (96%) e fenol (5% p/v).

Para a determinação dos teores de clorofila foi coletado, em cada indivíduo, um fragmento de folha correspondente a 1,000 g de tecido. As coletas foram realizadas na última folha bem desenvolvida, cuidando sempre de destacar a amostra da parte medial da folha em questão. Cada amostra foi individualizada em tubo de ensaio contendo 7,0 mL de dimetil sulfoxido (DMSO) e colocada em banho-maria a 65 °C durante uma hora, após a qual o sobrenadante foi filtrado e o volume foi ajustado a 10 mL com DMSO. A quantificação da densidade ótica foi realizada em espectrofotômetro a 649 nm e 665 nm, conforme descrito por Hiscox e Israelstam (1979). Foram utilizadas as fórmulas de Lichtenthaler e Wellburn (1994), sendo os dados expressos em µg/ml:

$$\text{Clorofila A} = [12,19 \times (A665) - 3,45 \times (A649)];$$

$$\text{Clorofila B} = [21,99 \times (A649) - 5,32 \times (A665)];$$

$$\text{Clorofila total} = \text{Clorofila A} + \text{Clorofila B}.$$

Onde A649 e A665 correspondem às absorbâncias registradas nos comprimentos de onda 480 nm 645 nm e 665 nm, respectivamente.

Alguns atributos das raízes foram mensurados com o objetivo de caracterizar o sistema radicular de cada um dos genótipos avaliados. Para determinar estas características, as plantas foram crescidas em vasos de 5 L, no mesmo solo com o qual foram realizados os ensaios já

descritos. O solo foi autoclavado a 121° C durante uma hora, processo que foi repetido após 24 horas de repouso. As raízes foram coletadas 30 dias após a emergência das plantas, lavadas com abundante água, secas com papel toalha e armazenadas em sacos plásticos a – 20 °C até a análise. Posteriormente foram escaneadas (Imagery Scan Screen, EPSON XL11000), para esse fim, foram colocadas em uma bandeja transparente contendo água destilada e as ramificações foram separadas manualmente. Foram mensurados o volume, a área superficial, o diâmetro médio, o comprimento total e a quantidade de raízes em diferentes categorias diamétricas de três indivíduos de cada genótipo. As análises dos dados foram realizadas utilizando o software WinRHIZO Pro image analysis system (Régent Instr. Inc.).

Análise estatística: Todos os dados foram submetidos a teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias (Cochran). A porcentagem de colonização foi transformada com a função raiz quadrada para atingir os parâmetros. Como no ensaio anterior, as comparações foram realizadas em cada coleta com o objetivo de isolar a variação produzida pelo crescimento dos organismos avaliados.

As variáveis altura, diâmetro, biomassa, teor e acúmulo de fósforo, teor de clorofila e de carboidratos da raiz foram avaliadas mediante ANOVA fatorial. Os fatores analisados foram o genótipo (Crioulo, DKB-I, DKB-T, FORM-I e FORM-T) e os tratamentos de inoculação (NI e Rc) mediante teste de separação de médias Skott-Knott 5%.

A porcentagem de colonização e o número de esporos foram comparados mediante análises de contrastes ortogonais como explicado no experimento anterior.

3. RESULTADOS

3.1 Experimento I – Influência dos eventos MON 89034 e Bt11 sobre o desenvolvimento da simbiose micorrízica em relação à isolinha e ao milho crioulo

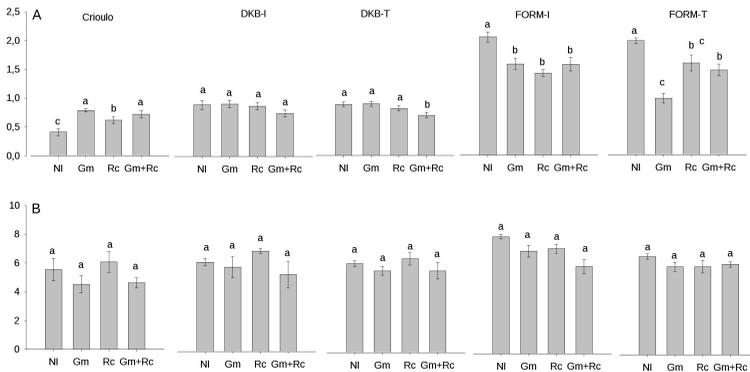
O teste para avaliação da presença da proteína *r-Cry 1Ab* nos genótipos de milho estudados, revelou resultados positivos para os genótipos DKB-T e FORM-T, mas não para suas isolinhas nem para o milho crioulo em todos os testes realizados.

3.1.1 Crescimento das plantas

Os genótipos de milho apresentaram diferenças quanto a altura e diâmetro do colmo. Aos 30 dias, as plantas não inoculadas do genótipo Fórmula apresentaram maior altura e diâmetro ($19,22\text{cm} \pm 0,9$ e $9,4 \pm 0,3$ respectivamente), seguidas pelo genótipo DKB ($18,04 \pm 0,81$ e $5,8 \pm 0,3$) e pelo milho crioulo ($14,6 \pm 1,6$ e $4,55 \pm 0,3$). Para esta coleta, a altura, o diâmetro e a biomassa foram influenciadas pela interação dos fatores (genótipo e tratamento de inoculação) (Tabela S1, Anexo1). A seguir são apresentados só os resultados da variável biomassa (Figura 1), porque tanto altura como diâmetro estiveram altamente correlacionados a essa variável e seguiram o mesmo comportamento.

A biomassa variou entre 0,40g e 2,05g. Nos híbridos convencionais e nos transgênicos, a inoculação não resultou em aumento do crescimento, uma vez que a biomassa das plantas inoculadas foi semelhante, ou até menor, que nas plantas não inoculadas. No milho crioulo a resposta à colonização resultou em maior crescimento nas plantas inoculadas.

Figura 1: Biomassa, 30 (A) e 60 (B) dias após a emergência, de plantas de cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos (T), inoculados com *Gigaspora margarita* (Gm), *Rhizophagus clarus* (Rc), ambos os fungos (Gm + Rc) ou sem inoculação (NI). Médias seguidas pela mesma letra, dentro do fator Genótipo, não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste Skott-Knott 5%.

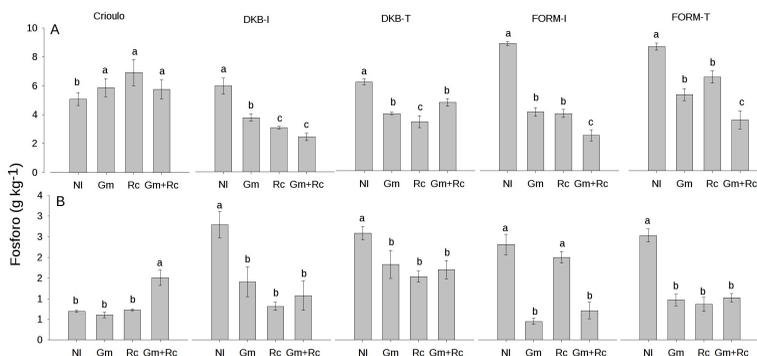


Para a segunda coleta, 60 dias após a emergência, a altura, o diâmetro e a biomassa foram influenciados pelo genótipo e pelo tratamento de inoculação, sem apresentar interação entre os fatores (Tabela S2, Anexo 1). A seguir são apresentados os resultados observados para a variável biomassa. Nesta época, manteve-se a mesma tendência entre os genótipos: Fórmula foi o genótipo com maior biomassa, seguido pelo DKB, estando por último o milho Crioulo. Por outro lado, as plantas não inoculadas e aquelas inoculadas com *Rhizophagus clarus* foram maiores que as demais.

O teor de fósforo foi influenciado, nas duas épocas de coleta, pela interação dos fatores, genótipo e tratamento de inoculação. Aos 30 dias após a emergência, houve maior teor de fósforo nos híbridos convencionais e transgênicos não inoculados, enquanto que no milho crioulo a inoculação favoreceu o incremento deste nutriente (Figura 2). Na segunda coleta o teor de fósforo seguiu o mesmo padrão da coleta anterior. Os híbridos convencionais e transgênicos, não inoculados, apresentaram maior teor de fósforo que as plantas inoculadas com os

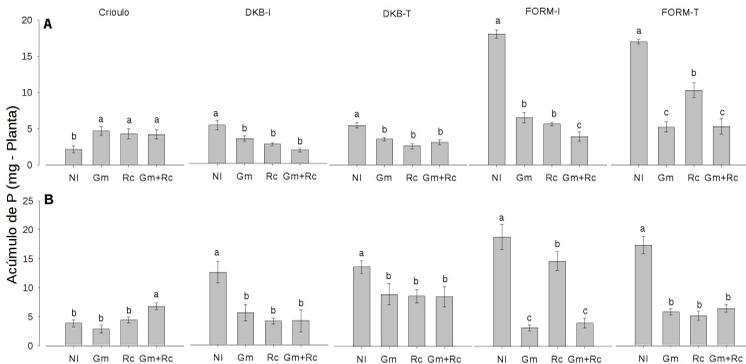
FMA. Em alguns casos, como no DKB-I e no FORM-T, a magnitude dessa diferença foi de 2:1. Para o milho crioulo, houve maior absorção de fósforo nas plantas inoculadas com o consórcio dos dois fungos, enquanto que não houve diferenças entre as plantas inoculadas com Rc ou Gm e aquelas que não receberam inóculo (Figura 2).

Figura 2. Teor de fósforo, 30 (A) e 60 (B) dias após a emergência, de plantas de cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos (T), inoculados com *Gigaspora margarita* (Gm), *Rhizophagus clarus* (Rc), ambos os fungos (Gm + Rc) ou sem inoculação (NI). Médias seguidas pela mesma letra, dentro do fator Genótipo, não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste Skott-Knott 5%.



O acúmulo de fósforo apresentou interação significativa entre os fatores genótipo e tratamento de inoculação, tanto aos 30 como aos 60 dias após a emergência das plantas. Os híbridos Fórmula apresentaram os maiores acúmulos, variando entre 5mg a 20mg por planta; os híbridos DKB e o milho crioulo tiveram acúmulos que variaram entre 2,5mg e 5mg. Novamente houve diferentes respostas à inoculação entre o milho crioulo e os híbridos convencionais e transgênicos: o primeiro continuou apresentando resposta positiva à inoculação, enquanto que no caso dos segundos houve maior acúmulo de fósforo nas plantas não inoculadas (Figura 3)

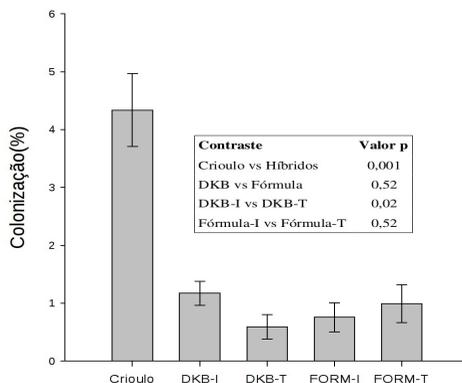
Figura 3: Acúmulo de fósforo em cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos (T), inoculados com *Gigaspora margarita* (GM), *Rhizophagus clarus* (RC), ambos fungos (GM + RC) ou sem inoculação (NI), 30 (A) e 60 (B) dias após a emergência das plantas. Médias seguidas pela mesma letra, dentro do fator Genótipo, não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste Skott-Knott 5%.



3.1.2 Porcentagem de colonização

Trinta dias após a emergência das plantas, a colonização variou entre 0,35% e 8,6%, tendo a maioria das plantas, porcentagens de colonização inferiores a 5%. A análise estatística revelou influência do fator genótipo ($p = 0,001$), sem haver efeitos do tratamento de inoculação nem interação entre os fatores (Figura 4).

Figura 4: Porcentagem de colonização micorrízica, 30 dias após a emergência, de plantas de cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos (T), inoculados com *Gigaspora margarita* (Gm), *Rhizophagus clarus* (Rc), ambos os fungos (Gm + Rc). Valores de p para os contrastes ortogonais entre os genótipos.



Os efeitos do genótipo na porcentagem de colonização, desdobrados mediante análises de contrastes ortogonais, são descritos a seguir.

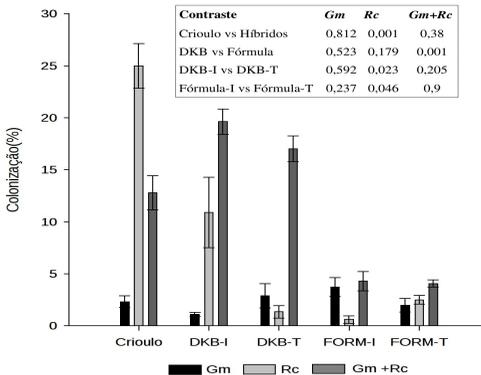
Isolinha vs transgênico: houve diferenças entre o DKB-I e o DKB-T, sendo que neste genótipo, a isolinha foi mais colonizada do que o transgênico (1,17% vs 0,59%). Por outro lado, o genótipo FÓRMULA-I e o FÓRMULA-T não apresentaram diferenças na porcentagem de colonização, que foi de 0,75%, em média.

DKB vs Fórmula e Crioulo vs Híbridos: Os genótipos DKB e Fórmula não apresentaram diferenças significativas entre eles, com uma porcentagem de colonização de 0,70%. Esses genótipos apresentaram porcentagens de colonização mais baixas quando comparados com o milho crioulo, que apresentou valores de 4,3%.

Na segunda coleta, 60 dias após a emergência das plantas, houve efeitos da interação entre o genótipo e o tratamento de inoculação. O desdobramento em contrastes ortogonais (Figura 5) demonstrou diferenças entre genótipos de milho quando foi feita a inoculação com *Rhizophagus clarus* ou com os dois fungos. Com *Rhizophagus clarus*

houve diferenças entre o DKB-I (10,9 %) e o DKB-T (1,3%) e entre o Fórmula-I (0,6%) e o Fórmula-T (2,5%). Além disso, com este fungo, o milho crioulo apresentou a mais alta porcentagem de colonização (13,4%), quando comparado à média dos híbridos (4,4%). Por outro lado, com a inoculação conjunta dos dois FMA, os híbridos DKB (isolinha e transgênico) apresentaram em média, maior colonização (8,6%) que os híbridos Fórmula (2,6%).

Figura 5: Porcentagem de colonização micorrízica, 60 dias após a emergência, de plantas de cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos (T), inoculados com *Gigaspora margarita* (Gm), *Rhizophagus clarus* (Rc), ambos os fungos (Gm + Rc). Valores de p para os contrastes ortogonais entre os genótipos.



3.2 Experimento II - Desenvolvimento da simbiose micorrízica entre *Rhizophagus clarus* e genótipos de milho contendo os eventos MON 89034, Bt11, suas isolinhas e um milho crioulo

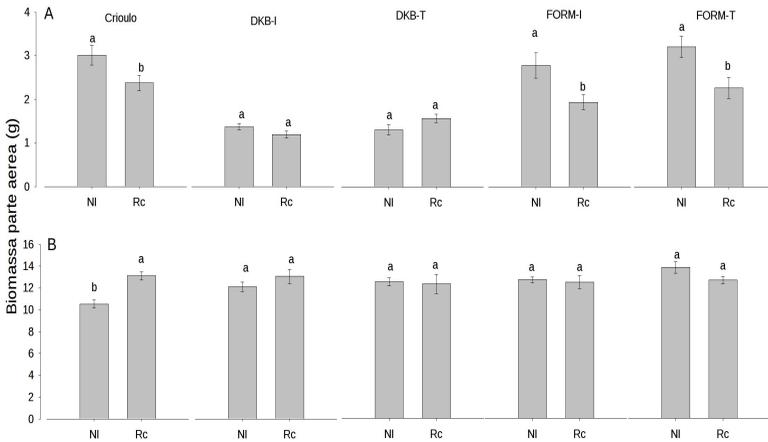
A proteína recombinante Cry 1Ab foi detectada nos genótipos de milho DKB-T e FORM-T mais não nos genótipos DKB-I, FORM-I ou no milho crioulo, em nenhum dos testes realizados.

3.2.1 Crescimento das plantas

Trinta dias após a emergência das plantas, os genótipos já apresentavam diferenças quanto a altura, diâmetro do colmo e biomassa. A altura variou entre 17cm e 27cm, o milho crioulo foi o mais alto ($24,4 \pm 0,4$ cm), seguido pelo genótipo Fórmula ($20,3 \pm 0,3$ cm) e pelo DKB ($18,2 \pm 0,3$ cm). Quanto ao diâmetro, o milho crioulo e o Fórmula foram similares, apresentando uma média de $7,0 \pm 0,2$ cm, seguidos pelo genótipo DKB com $6,2 \pm 0,1$ cm (Tabela S2, Anexo 1). A seguir são apresentados os resultados da variável biomassa, por ser esta uma medida mais abrangente do crescimento e por sintetizar de forma clara o comportamento das outras duas variáveis.

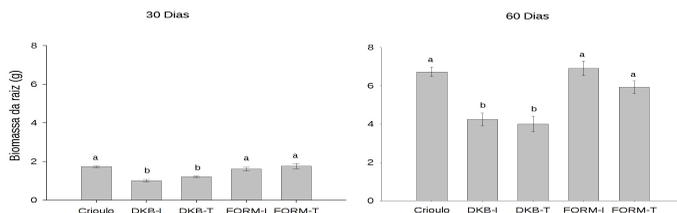
Durante a primeira coleta, a biomassa da parte aérea da planta foi influenciada pela interação dos fatores genótipo e inoculação (Figura 6A). Os híbridos Fórmula e o milho crioulo foram maiores quando não inoculados, e por outro lado os híbridos DKB não apresentaram diferenças de peso entre as plantas inoculadas e não inoculadas. Durante a segunda coleta, a interação entre os fatores se manteve (Figura 6B); nessa ocasião houve diferenças apenas no genótipo crioulo, no qual as plantas inoculadas acumularam maior biomassa.

Figura 6. Biomassa da parte aérea em cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos (T), inoculados com *Rhizophagus clarus* (Rc) ou sem inoculação (NI), 30 (A) e 60 (B) dias após a emergência das plantas. Médias seguidas pela mesma letra, dentro do fator Genótipo, não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste Skott-Knott 5%.



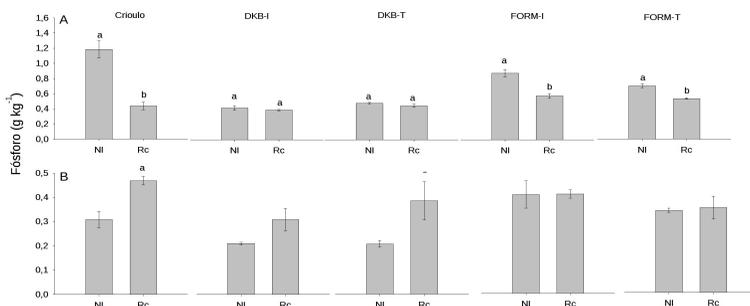
Por outro lado, a biomassa da raiz, em ambas épocas, apresentou efeitos só do genótipo (Figura 7). Nas duas coletas milho crioulo e os híbridos Fórmula tiveram raízes com biomassa semelhante, sendo maiores que as raízes dos híbridos DKB. A inoculação com o fungo *Rhizophagus clarus* não teve efeito sobre a massa das raízes.

Figura 7. Biomassa da raiz em cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos, 30 e 60 dias após a emergência das plantas. Médias seguidas pela mesma letra, dentro de cada fator, não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste Skott-Knott 5%.



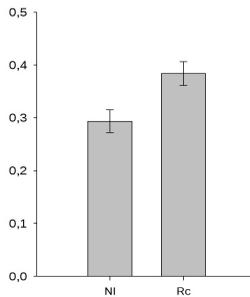
O teor de fósforo apresentou efeitos da interação entre os fatores durante a primeira coleta (Figura 8A). O milho crioulo e os híbridos Fórmula não inoculados apresentaram maior quantidade do nutriente na parte aérea que suas contrapartes inoculadas. Para os híbridos DKB não houve diferenças no teor de fósforo.

Figura 8. Teor de fósforo em cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos (T), inoculados com *Rhizophagus clarus* (Rc) ou sem inoculação 30 dias após a emergência das plantas. Médias seguidas pela mesma letra, dentro do fator genótipo, não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste Skott-Knott 5%.



Durante a segunda coleta, o teor de fósforo foi influenciado pelo genótipo e pela inoculação, sem haver interação entre os dois fatores (Figura 8B). Os híbridos Fórmula e o milho crioulo apresentaram maior concentração de fósforo do que os híbridos DKB. Quanto à inoculação, esta favoreceu o incremento do nutriente no tecido vegetal (Figura 9).

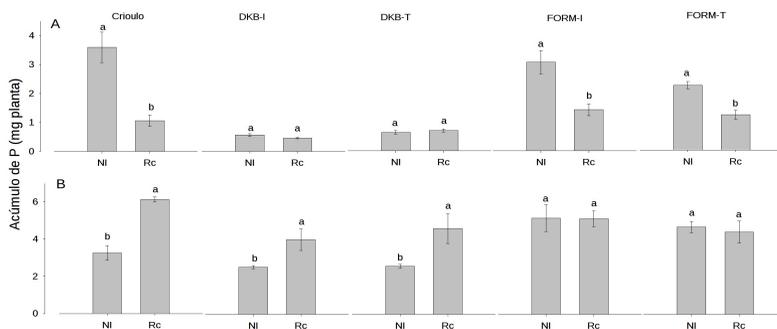
Figura 9. Teor de fósforo em milhos inoculados com *Rhizophagus clarus* (Rc) ou sem inoculação (NI), 60 dias após a emergência das plantas. Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste Skott-Knott 5%.



O acúmulo de fósforo em ambas épocas esteve influenciado pela interação entre o genótipo e a inoculação (Figura 10A e 10B). Na primeira coleta (Figura 11A), o milho crioulo e os híbridos Fórmula apresentaram maior concentração de fósforo nos tecidos da parte aérea quando não inoculados. De outro lado, os híbridos DKB apresentaram conteúdos semelhantes de fósforo em todos os casos. Na segunda coleta (Figura 10B) esse comportamento mudou, o milho crioulo e os híbridos DKB apresentaram uma resposta positiva a inoculação enquanto que os híbridos Fórmula não apresentaram diferenças entre as plantas inoculadas e aquelas que não o foram.

Figura 10. Acúmulo de fósforo em cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos, inoculados com *Rhizophagus clarus* (Rc) ou sem inoculação (NI), 30 (A) e 60 (B) dias após a emergência das

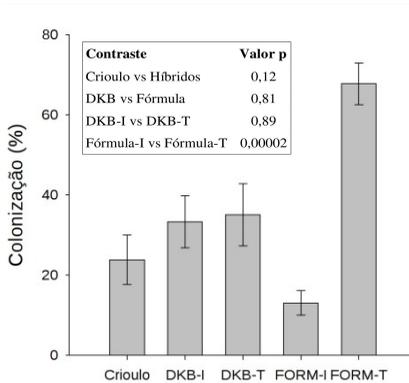
plantas. Médias seguidas pela mesma letra, dentro do fator genótipo, não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste Skott-Knott 5%.



3.2.2 Colonização micorrízica e densidade de esporos

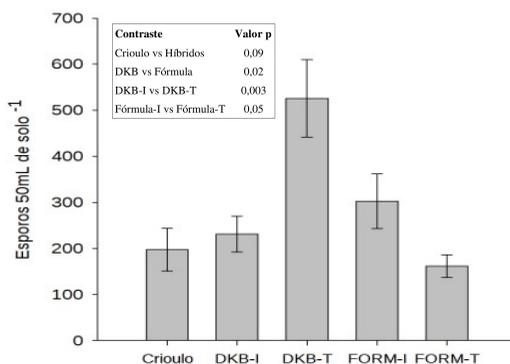
A porcentagem de colonização micorrízica variou entre 10% e 70% na primeira coleta e entre 20% e 70% na segunda coleta. Os controles não inoculados não apresentaram sinais de colonização micorrízica. Aos 30 dias após a emergência das plantas, a colonização foi influenciada pelos genótipos de milho (Figura 11). Na primeira coleta, o contraste Fórmula-I vs Fórmula -T foi o único que apresentou diferenças, sendo que a isolinha apresentou menor colonização do que o transgênico. Durante a segunda coleta não houve diferenças entre a porcentagem de colonização dos diferentes genótipos.

Figura 11: Porcentagem de colonização, 30 dias após a emergência das plantas, em cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos (T), inoculados com *Rhizophagus clarus*. Valores de p para os contrastes ortogonais entre os genótipos de milho.



A produção de esporos variou entre 10 e 20 esporos por 50 mL de solo na primeira coleta e entre 200 e 500 esporos por 50 mL de solo na segunda avaliação. Trinta dias após a emergência das plantas, a densidade de esporos foi semelhante para todos os genótipos. Aos 60 dias, os híbridos DKB apresentaram maior densidade de esporos que os híbridos Fórmula (contraste DKB vs Fórmula). Além disso a isolinha do híbrido DKB apresentou um menor número de esporos que o transgênico (Figura 12)

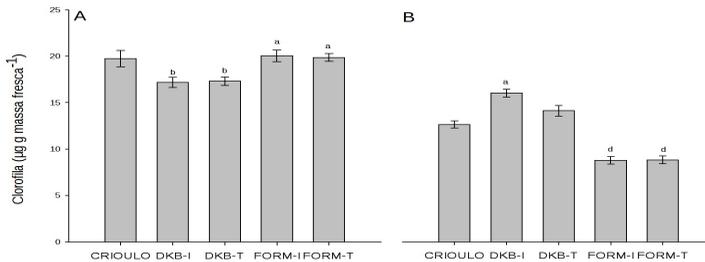
Figura 12: Densidade de esporos 60 dias após a emergência das plantas, em cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos (T), inoculados com *Rhizophagus clarus*. Valores de p para os contrastes ortogonais entre os genótipos de milho.



3.2.3 Características fisiológicas

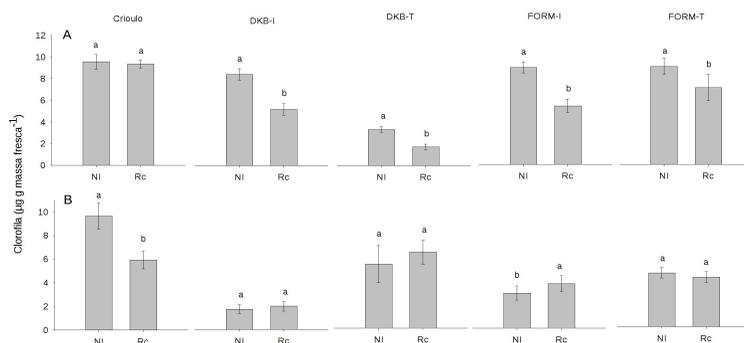
Foram avaliadas características relacionadas à produção de pigmentos fotossintéticos e ao teor de carboidratos solúveis na raiz. Aos 30 dias após a emergência das plantas, o teor de clorofila total variou entre 14 e 23 $\mu\text{g g massa fresca}^{-1}$. Os híbridos Fórmula e o milho crioulo apresentaram os maiores teores de clorofila (Figura 13A). A inoculação com *Rhizophagus clarus* favoreceu o incremento do teor de clorofila total, sendo que a média das plantas inoculadas foi de 19,5 μg de clorofila $\text{g massa fresca}^{-1}$ e sem inoculação foi de 18,2 μg de clorofila $\text{g massa fresca}^{-1}$. Durante a segunda coleta, o teor de clorofila total variou entre 9 e 15 $\mu\text{g g massa fresca}^{-1}$ e toda a variação observada foi decorrente do fator genótipo (Figura 13B).

Figura 13: Teor de clorofila em folhas, 30 e 60 dias após a emergência das plantas, em cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos (T).



O teor de carboidratos solúveis na raiz, na primeira coleta, variou entre 2,7 e 15 mg de glicose g massa fresca⁻¹ e na segunda, entre 3 e 10 mg de glicose g massa fresca⁻¹. Em ambas coletas houve influência da interação entre o genótipo e os tratamentos de inoculação. Durante a primeira coleta, o teor de carboidratos apresentou decréscimos nos híbridos inoculados, entanto que no milho crioulo, a inoculação não causou diferenças (Figura 14A). Por outro lado, durante a segunda coleta cada genótipo teve um comportamento particular como pode ser observado na Figura 14 B.

Figura 14: Teor de carboidratos solúveis nas raízes, 30 e 60 dias após a emergência das plantas, em cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos (T), inoculados com *Rhizophagus clarus* (Rc) ou sem inoculação (NI).



3.3 Caracterização do sistema radicular

O sistema radicular do milho crioulo e dos genótipos DKB apresentou maior comprimento que aquele do genótipo Fórmula. Por outro lado, a média da área superficial, volume e diâmetro foi semelhante em todos os genótipos avaliados (Tabela 3).

Tabela 3. Comprimento total, área superficial, volume e diâmetro médio do sistema radicular de cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos (T).

Genótipo	Comprimento total (cm)	Área superficial (cm ²)	Volume (cm ³)	Diâmetro médio (cm)
Crioulo	2003 ± 126 a	341 ± 12	4,7 ± 0,1	0,5 ± 0,01
DKB-I	2141 ± 86 a	338 ± 21	4,2 ± 0,4	0,5 ± 0,01
DKB-T	2342 ± 377 a	362 ± 56	4,5 ± 0,7	0,5 ± 0,01
FORM-I	1502 ± 35 b	240 ± 8,2	3,1 ± 0,05	0,5 ± 0,01
FORM-T	1480 ± 31 b	264 ± 18	3,7 ± 0,4	0,6 ± 0,02

Na análise do comprimento das raízes por categorias diamétricas, só foram observadas diferenças nas categorias de raízes mais finas. Os genótipos Crioulo e Fórmula apresentaram raízes finas menos compridas que o genótipo DKB (Tabela 4).

Tabela 4. Comprimento total, por categorias diamétricas, de cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos (T).

Genótipo	0,0 - 0,2 (cm)	0,2 - 0,4 (cm)	0,4 - 0,6 (cm)	0,6 - 0,8 (cm)	>0,8 (cm)
Crioulo	142 ± 16 b	404 ± 8 b	102 ± 11	49 ± 0,9	114 ± 33
DKB-I	222 ± 15 a	439 ± 62 a	138 ± 6	65 ± 6	155 ± 5
DKB-T	177 ± 29 a	445 ± 87 a	149 ± 33	71 ± 16	116 ± 8
FORM-I	143 ± 10 b	378 ± 29 b	152 ± 8	81 ± 0,7	99 ± 6
FORM-T	110 ± 7 b	205 ± 31 c	160 ± 1	66 ± 4	96 ± 22

Quanto ao volume ocupado pelas raízes em diferentes classes diamétricas, as raízes do genótipo DKB apresentaram as raízes finas de maior volume, o genótipo Fórmula apresentou um menor volumem de raízes, tanto finas, quanto grossas. Por outro lado, o milho crioulo apresentou maior volume nas raízes grosas do que nas finas (Tabela 5)

Tabela 5. Volume, por categorias diamétricas, de cinco genótipos de milho: um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos (T).

Genótipo	0,0 < D < 0,2 (cm)	0,2 < D < 0,4 (cm)	0,4 < D < 0,6 (cm)	0,6 < D < 0,8 (cm)	D > 0,8 (cm)
Crioulo	0,03 ± 0,003 b	0,25 ± 0,09	0,18 ± 0,02	0,19 ± 0,02	1,83 ± 0,003 a
DKB-I	0,04 ± 0,002 a	0,27 ± 0,04	0,25 ± 0,01	0,25 ± 0,03	1,82 ± 0,003 a
DKB-T	0,04 ± 0,006 a	0,29 ± 0,05	0,27 ± 0,06	0,27 ± 0,05	1,27 ± 0,003 b
FORM-I	0,03 ± 0,002 b	0,24 ± 0,01	0,28 ± 0,02	0,30 ± 0,01	1,16 ± 0,003 b
FORM-T	0,02 ± 0,001 b	0,16 ± 0,03	0,22 ± 0,06	0,25 ± 0,02	0,81 ± 0,003 b

4. DISCUSSÃO

4.1 Efeitos da transgenia sobre a colonização micorrízica e a resposta à inoculação

A hipótese formulada foi que, ao modificar o *background* genético da planta, a transgenia teria efeitos sobre a porcentagem de colonização micorrízica e a resposta da planta à inoculação com FMA. Os resultados obtidos demonstraram efeitos diversos sobre a porcentagem da colonização micorrízica, que dependeram do evento transgênico, da época de avaliação e da espécie de fungo micorrízico inoculado. Quanto ao evento transgênico, o genótipo DKB, transformado com o evento MON 89034, apresentou respostas que variaram entre o efeito negativo do transgênico (primeiro experimento, 30 e 60 dias após a emergência das plantas), até a ausência de efeitos da transgenia (segundo experimento, 30 e 60 dias após a emergência das plantas). Por outro lado, o evento BT11, contido no milho Fórmula, teve porcentagem de colonização micorrízica aumentada nos dois experimentos realizados. No entanto, houve variação segundo a época de coleta, sendo que no primeiro experimento o efeito apareceu aos 60 dias após a emergência das plantas, e no segundo experimento o efeito apareceu na coleta dos 30 dias, para desaparecer aos 60 dias. Esses resultados sugerem a existência de efeitos da transgenia diferenciados para cada evento de transformação, porém transitórios, uma vez que aparecem só em algumas circunstâncias, sendo variáveis entre as épocas de avaliação e os ensaios aqui apresentados.

Outros estudos avaliando o efeito da transgenia sobre a colonização micorrízica em diferentes genótipos de milho também encontraram efeitos transitórios, que dependeram, entre outros fatores, do estágio fenológico da cultura, do tipo de experimento (a campo ou em casa de vegetação), da densidade de esporos usada para a inoculação, da aplicação de fertilizantes e do genótipo de milho estudado (CHEEKE et al., 2011; CHEEKE; ROSENSTIEL; CRUZAN, 2012; FLIEßBACH et al., 2012; VERBRUGGEN et al., 2012). Por exemplo, em experimento avaliando a influência de dois híbridos de milho transformados com os eventos Bt 176 e Bt 11, Turrini et al.

(2005) observaram que houve menor crescimento das hifas préssimbíóticas e diminuição de 36% na formação de haustórios de *Glomus mosseae* em plantas de milho Bt 176, porém não nas plantas sob a influência do evento Bt 11. No estudo citado, a diminuição no número de haustórios não levou à diminuição da porcentagem de colonização entre os genótipos avaliados, e os autores associaram os efeitos observados à maior produção de proteína Cry1Ab por plantas contendo o evento Bt 176. Em outro experimento em casa de vegetação, realizado pelo mesmo grupo de pesquisa e avaliando os mesmos eventos, Castaldini et al (2005) encontraram diminuição na porcentagem de colonização, na formação de arbúsculos e hifas intrarradiculares em plantas de milho Bt 176, confirmando os resultados anteriormente relatados. Nessa segunda vez, porém, vez os efeitos também foram evidenciados em plantas contendo o evento Bt 11, demonstrando que, além da quantidade de proteína recombinante há outros fatores modulando a simbiose com as plantas transgênicas. Em outro estudo quantificando a colonização micorrízica e a densidade de esporos, em experimento em casa de vegetação, ao comparar sete eventos de milho transgênico e suas respectivas isolinhas, Cheeke et al (2012) observaram menor colonização micorrízica em plantas transgênicas, quando comparadas com as isolinhas. Essas diferenças só foram evidenciadas durante as primeiras coletas e desapareceram durante o estágio reprodutivo da planta. Em ensaio subsequente, realizado pelo mesmo grupo de pesquisa e avaliando os mesmos híbridos e os mesmos eventos, desta vez cultivados a campo, não se encontraram efeitos da transgenia sobre a porcentagem da colonização micorrízica em nenhuma das condições avaliadas (CHEEKE et al., 2013).

Os efeitos transitórios observados nos experimentos avaliando a resposta dos FMA às plantas de milho Bt podem estar relacionados à multiplicidade e complexidade dos fatores determinantes para o estabelecimento da simbiose, os quais passam pelas características do solo, da planta, do ambiente e do fungo. Diferenças no estabelecimento dos microcosmos experimentais, no tipo de solo usado, na quantidade de proteína recombinante sendo expressa pelo milho, o status fisiológico das plantas e a identidade genética das mesmas são fatores que podem

explicar a variabilidade de resultados relatados (TURRINI; SBRANA; GIOVANNETTI, 2015)

Além disso, as espécies de bactérias *Bacillus thuringiensis* e *Streptomyces viridochromogenes*, de cujo genoma foram tomados os genes de resistência a insetos e tolerância a herbicidas, ocorrem de forma natural no solo (MARTIN; TRAVERS, 1989; WILLIAMS et al., 1983), e portanto há um histórico de coexistência entre a microbiota do solo e as proteínas Cry e PAT que estas bactérias expressam, o que pode ser um fator que modula a resposta desses microrganismos às proteínas recombinantes expressadas pelas plantas transgênicas.

Outros estudos têm encontrado efeitos deletérios do cultivo de plantas transgênicas sobre a microbiota do solo, mas na maioria dos casos, os efeitos relatados foram alterações na composição da comunidade de bactérias. Por exemplo, Xue et al. (2005) encontraram mudanças na proporção de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas na rizosfera de plantas de milho Bt e de suas variedades isogênicas. Castaldini et al. (2005) encontraram diferenças na diversidade de eubactérias associadas à rizosfera de plantas de milho Bt e suas contrapartes isogênicas, assim como diferenças na diversidade de bactérias do solo, após a aplicação de resíduos vegetais de plantas de milho Bt. (HENRI H. DINEL, 2003; FLORES; SAXENA; STOTZKY, 2005; CASTALDINI et al., 2005). Dessa maneira, diferentes microrganismos do solo parecem exibir níveis variáveis de sensibilidade frente à presença de plantas transgênicas. Contudo, as avaliações de risco ambiental relacionadas a introdução de plantas transgênicas devem ser realizadas caso a caso e pesquisas devem ser feitas para tentar esclarecer as razões dos efeitos transitórios aqui relatados.

4.2 Colonização e resposta à inoculação com FMA entre híbridos de milho convencionais e transgênicos e um milho crioulo.

Independentemente da presença do transgene, os resultados de ambos experimentos demonstraram respostas diferenciadas entre os híbridos e o milho crioulo frente à inoculação com FMA. A resposta à associação micorrízica é definida como o incremento no crescimento e

na absorção de P por parte das plantas, como resultado da simbiose com FMA (JANOS, 2007). Efeitos positivos da inoculação são definidos pelo maior acúmulo de biomassa ou fósforo das plantas quando são inoculadas com esses fungos. Efeitos negativos são observados quando há menor biomassa ou acúmulo desse nutriente, decorrentes da inoculação, e há efeitos neutros quando existe uma relação equivalente em crescimento e acúmulo de fósforo entre plantas inoculadas e aquelas que não receberam inóculo.

Os resultados do primeiro ensaio mostraram uma forte diferença entre o desempenho da simbiose do milho crioulo, que frente a inoculação apresentou efeitos positivos ou em alguns casos neutros. Isso contrastou com os efeitos negativos, e em menor medida neutros, que apresentaram os híbridos, tanto transgênicos, quanto convencionais, particularmente o genótipo Fórmula. Nesse ensaio, as diferentes respostas ficaram mais evidentes quando a inoculação foi realizada com *Rhizophagus clarus*, provavelmente porque a simbiose com esse fungo conseguiu se desenvolver melhor que com *Gigaspora margarita*, fato que será discutido mais adiante.

Geralmente os estudos de inoculação do milho com FMA tem demonstrado efeitos positivos sobre o crescimento e a absorção de P na parte aérea da planta (CAMPOS; ANDRADE; CASSIOLATO, 2010; SAWERS; GUTJAHR; PASZKOWSKI, 2008; KAEPLER et al., 2000; KHALIL; LOYNACHAN; TABATABAI, 1994), mas resultados negativos decorrentes da simbiose com FMA já foram relatados por vários pesquisadores (CHEEKE; ROSENSTIEL; CRUZAN, 2012; HOEKSEMA et al., 2010). Situações nas quais o estado não simbiótico é mais vantajoso ocorrem quando a quantidade de carbono, que a planta está repassando para o fungo, representa um gasto maior que o benefício recebido pelo fornecimento de fósforo ou de outros nutrientes. Neste último caso, o fungo comporta-se como um dreno de carbono. Nesse contexto, vários pesquisadores propõem o conceito de continuum parasitismo-mutualismo, para explicar de forma mais realística as relações planta-FMA (SMITH; SMITH, 2014).

As causas que levam ao comportamento parasítico dos FMA podem ser diversas: entre elas, as condições ambientais que limitam o

crescimento da planta simbiote, que podem ter um papel fundamental na explicação desse fenômeno (JONES; SMITH, 2004; VEIGA et al., 2011). Na presente pesquisa, no primeiro experimento os decréscimos observados na altura, diâmetro e biomassa das plantas micorrizadas podem estar associados a fatores ambientais decorrentes da época na qual foi realizado o ensaio (maio-julho), meses nos quais há maiores quedas na temperatura noturna e menor luminosidade. O desenvolvimento do milho é altamente dependente da temperatura do ar, a qual determina a velocidade de crescimento e marca as fases fenológicas da cultura (BERGAMASCHI; MATZENAUER, 2014). Dias mais frios causam menor desenvolvimento foliar, o que pode também ter efeitos sobre a capacidade fotossintética, fazendo com que a produção primária diminua. Plantas que, além de distribuir os fotossintatos para as funções metabólicas básicas, repassam carbono para o simbiote, encontram-se em desvantagem, em épocas em que fatores ambientais, como a temperatura, limitam a área foliar e por tanto a fotossíntese. No presente trabalho o efeito das condições ambientais sobre o desenvolvimento do milho foi evidente e se observou que o acúmulo de biomassa e a altura das plantas durante o segundo experimento em ambas épocas atingiu valores que dobraram as médias do primeiro experimento.

A influência da identidade genética da planta simbiote – em nível de espécie, variedade ou cultivar - tem sido apontada como um dos fatores bióticos mais importantes para o sucesso da simbiose com FMA. No nível de espécie, o milho é reconhecido por ser uma planta micotrófica que apresenta taxas de colonização que podem variar de 10 a 95% (AN et al., 2010; CAMPOS; ANDRADE; CASSIOLATO, 2010; CHU et al., 2013; SERRALDE; RAMÍREZ, 2013). A amplitude dessa variação está marcadamente influenciada pela variedade ou cultivar e pelas condições de disponibilidade de nutrientes, principalmente P, o qual apresenta uma forte regulação sobre o estabelecimento da simbiose (SIQUEIRA, 2010). Por exemplo, variedades crioulas respondem melhor à inoculação em condições de baixo teor de P no solo (CHU et al., 2013; WRIGHT et al., 2005). Por outro lado, as variedades melhoradas, tem um comportamento mais errático, já que podem apresentar maior grau de colonização em solos com alto ou baixo teor de

P, dependendo do híbrido em questão (AN et al., 2010; CHU et al., 2013; WRIGHT et al., 2005).

Para verificar se os efeitos negativos da inoculação com FMA, principalmente com *Rhizophagus clarus*, estiveram modulados por condições ambientais, principalmente de temperatura, ou se decorreram de aspectos relacionados a características próprias do genótipo de milho, foi realizado o segundo experimento (fevereiro – abril), repetindo-se um subgrupo dos tratamentos testados no primeiro ensaio. As respostas dos diferentes genótipos de milho durante este segundo experimento foram um pouco diferentes, principalmente pelo fato de todos os genótipos apresentarem uma maior porcentagem de colonização (50% em média). Neste segundo ensaio, o genótipo Fórmula continuou apresentando efeitos negativos ou em algumas ocasiões neutros, da inoculação com *Rhizophagus clarus*. Por outro lado, o genótipo DKB oscilou entre os efeitos neutros e positivos, enquanto o milho crioulo apresentou a mais ampla variação, sendo que na coleta dos trinta dias apresentou efeitos negativos, mas no final do experimento acumulou maior biomassa e fósforo quando inoculado com *Rhizophagus clarus*.

Vários trabalhos relataram diferenças no desempenho da simbiose entre plantas da mesma espécie, ou ainda do mesmo cultivar, quando associadas com diferentes fungos (TAWARAYA, 2003; ROGER et al., 2013). Provavelmente as razões pelas quais algumas espécies, ou algumas variedades dentro da mesma espécie, apresentam tais diferenças frente ao desempenho da simbiose, estejam relacionadas com características morfológicas ou ainda fisiológicas, principalmente da raiz. Características morfológicas da raiz que melhoram a absorção de P do solo, como comprimento de raiz, número de pelos radiculares e maior biomassa radicular, estão negativamente relacionadas com o desempenho da simbiose. Por essa razão, espécies ou variedades, com sistemas radiculares maiores e mais ramificados apresentam menor colonização micorrízica que aquelas com raízes menos desenvolvidas (TAWARAYA, 2003). A caracterização do sistema radicular dos cinco genótipos estudados evidenciou que os genótipos Fórmula e Crioulo possuem sistemas radiculares mais enxutos com raízes mais volumosas e compridas nas categorias diamétricas maiores, características que

como mencionado anteriormente, estão correlacionadas de forma positiva com a formação de micorriza arbuscular e que no caso do milho crioulo, podem explicar a maior colonização e responsividade desse genótipo à inoculação. No entanto, o genótipo Fórmula, mesmo tendo raízes com ditas características, comportou-se de forma completamente diferente ao milho crioulo, sendo o menos responsivo dos genótipos avaliados, fato que pode estar relacionado com o histórico de seleção genética desses fungos. Em geral, os programas de melhoramento genético buscam selecionar genótipos que apresentem alta produção em solos com elevada aplicação de fertilizantes químicos (RENGEL, 2002). No âmbito do sistema radicular, a domesticação e o melhoramento genético tem ocasionado modificações na arquitetura e disposição das raízes da maior parte das plantas cultivadas como também na seleção de transportadores de fósforo endógenos mais eficientes. Neste sentido, a pressão de seleção tem sido aplicada para aumentar o número de raízes seminais e diminuir o geotropismo de modo a aumentar a área de solo explorado; em outras palavras, o melhoramento tem produzido plantas com sistemas radiculares mais desenvolvidos e que provavelmente, não são beneficiados pela simbiose micorrízica, na mesma medida que plantas que dependem dessa simbiose, para aumentar a absorção de nutrientes (DE DORLODOT et al., 2007). Por outro lado, a seleção das culturas de milho pode ter ocasionado a seleção de transportadores endógenos de fósforo mais eficientes que aumentaram a absorção de fósforo da planta (KARANDASHOV e BUCHER, 2005). Os resultados aqui relatados mostraram que o genótipo Fórmula, mesmo tendo um sistema radicular semelhante ao do milho crioulo, apresentou uma responsividade à inoculação muito baixa e até negativa, fato que pode estar relacionado com sua alta capacidade endógena de absorção de fósforo, uma vez que os teores desse nutriente neste genótipo sempre foram maiores em plantas não inoculadas, sugerindo a existência de transportadores de fósforo mais eficientes neste genótipo.

Na presente pesquisa, houve efeitos da inoculação com FMA sobre os teores de clorofila e carboidratos disponíveis na raiz. Na primeira época de coleta a inoculação promoveu aumentos no teor de clorofila em todos os genótipos, ao mesmo tempo que implicou decréscimos do teor de carboidratos para os híbridos. Durante a segunda

coleta não houve efeitos da inoculação, havendo diferenças só entre os genótipos. O teor de clorofila total está relacionado com a taxa fotossintética da planta, uma vez que maiores teores de clorofila promovem maior absorção de luz incidente (BJORKMAN, 1981). O fluxo de energia solar canalizado através da fotossíntese resulta na produção de carboidratos, principalmente sacarose e amido, que são exportados aos diferentes órgãos da planta para dar suporte ao crescimento (PENG et al., 2011), e a disponibilidade de carboidratos está, portanto, relacionada ao desenvolvimento das plantas (GIBSON, 2004). Plantas inoculadas com FMA podem aumentar a taxa fotossintética por dois mecanismos: o primeiro está relacionado com a promoção de crescimento e a melhor condição nutricional em plantas que formam simbiose micorrízico arbuscular. Plantas micorrizadas geralmente conseguem suprir de melhor maneira os micronutrientes essenciais para o bom desempenho dos fotossistemas (SMITH; GIANINAZZI-PEARSON, 1988). Por outro lado, pesquisas recentes apontaram que o dreno de carboidratos em direção ao fungo micorrízico, provoca um mecanismo compensatório de aumento na taxa fotossintética, o que assegura o suprimento de carbono para o desenvolvimento da planta, sendo este um tópico que vem recebendo maior atenção (KASCHUK et al., 2009). Os resultados desta pesquisa permitem evidenciar que a inoculação com FMA produziu duas situações contrastantes para o milho crioulo e para os híbridos. No caso do primeiro, houve aumento do teor de clorofila, não houve efeitos sobre o teor de carboidratos na raiz e o desempenho da simbiose no final do experimento foi positivo, o que indica que o dreno de carbono causado pela simbiose foi compensado pela mobilização de nutrientes e resultou em melhor crescimento das plantas. Para os híbridos, essa relação foi diferente, uma vez que todos eles apresentaram menor conteúdo de carboidratos, e possivelmente maior dreno de carbono, em plantas inoculadas com *Rhizophagus clarus*, e além disso apresentaram menor desempenho da simbiose, oscilando entre respostas neutras a negativas.

Esses resultados indicam que não só as características ambientais, como temperatura e luminosidade, têm um papel importante na modulação do desempenho da simbiose pois características

fisiológicas de cada genótipo podem também determinar os efeitos da mesma, como ocorreu nesta pesquisa com os híbridos e o milho crioulo.

4.3 Efeitos da transgenia sobre o desenvolvimento de *Gigaspora margarita* e *Rhizophagus clarus*.

Independentemente do genótipo de milho, as espécies de FMA avaliadas apresentaram padrões contrastantes de colonização. A porcentagem da colonização, nas plantas inoculadas com *Rhizophagus clarus* foi maior que nas plantas inoculadas com *Gigaspora margarita*, sendo que em alguns casos o primeiro fungo chegou a apresentar porcentagens de colonização seis vezes maiores do que o segundo. Espécies da família Glomeraceae, da qual faz parte o gênero *Rhizophagus*, apresentam um melhor desenvolvimento das estruturas fúngicas intrarradiculares, o que resulta em maior área de raiz colonizada, além de uma intensa produção de hifas, vesículas, arbúsculos e esporos em tempos relativamente curtos. De outro lado, espécies da família Gigasporaceae apresentam um crescimento intrarradicular menor, e portanto menor número de hifas, arbúsculos, células de armazenamento em volta da raiz e poucos esporos, enquanto que micélio extrarradicular é abundante e todas as estruturas apresentam maior tamanho (FITTER, 2009; HART; KLIRONOMOS, 2002; HART; READER, 2002a, 2002b). Ter em conta essas características de crescimento para a avaliação de riscos potenciais das culturas transgênicas é importante, uma vez que espécies que desenvolvem maior parte do micélio no interior das raízes podem ser mais susceptíveis a mudanças no padrão físico-químico da raiz.

Os resultados obtidos também mostraram efeitos diferenciados, ainda que transitórios, da transgenia sobre o desenvolvimento da espécie *Rhizophagus clarus*. Durante o primeiro experimento, esta espécie apresentou diferenças na porcentagem de colonização micorrízica, entre isolinhas e transgênicos dos dois eventos avaliados, razão pela qual foi testado no segundo experimento. Novamente houve efeitos transitórios da transgenia, neste caso de aumento da colonização em plantas

expressando o evento Bt 11 e maior produção de esporos nas plantas expressando o evento MON 89034. Outros estudos avaliando os efeitos de culturas transgênicas sobre FMA descobriram efeitos transitórios sobre a espécie *Funneliformis mosseae* também da família Glomeraceae (CHEEKE et al., 2011; CASTALDINI et al., 2005; TURRINI et al., 2005), mas não há na literatura estudos sobre espécies de outras famílias. Nesta pesquisa, não foram observados efeitos da transgenia sobre a porcentagem da colonização de *Gigaspora margarita*. Para este fungo a porcentagem de colonização foi muito baixa, o que sugere a necessidade de testes de maior duração com este tipo de espécies de crescimento lento.

5. CONCLUSÕES

A transgenia não apresentou efeitos consistentes na colonização micorrízica ou na responsividade das plantas à micorrização, os efeitos observados variaram respeito às épocas de coleta, eventos transgênicos inseridos em cada genótipo de milho e espécie de fungo micorrízico inoculado.

Variedades de milho respondem de forma distinta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares. A resposta está modulada pela identidade genética da planta e também por fatores abióticos. Neste estudo, as plantas de milho crioulo apresentaram-se mais responsivas à inoculação, enquanto que os híbridos estudados apresentaram respostas que variaram de neutras a negativas, em particular o genótipo Fórmula que foi o menos responsivo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AN, G.-H. et al. How does arbuscular mycorrhizal colonization vary with host plant genotype? An example based on maize (*Zea mays*) germplasms. **Plant and Soil**, v. 327, n. 1–2, p. 441–453, fev. 2010.

BERGAMASCHI, H.; MATZENAUER, R. **O milho e o clima**. Porto Alegre: EMATER/RS-Ascar, 2014.

BJORKMAN, O. Responses to different quantum flux densities. In: LANGE, O. L.; NOBEL, P. S.; OSMOND, C. B.; ZIEGLER, H. (Ed.). **Encyclopedia of plant physiology**. Berlin: Springer- Verlag, 1981. p. 57-107.

CAMPOS, D. T. DA S.; ANDRADE, J. A. DA C.; CASSIOLATO, A. M. R. Crescimento e micorrização de genótipos de milho em casa de vegetação. **Bragantia**, v. 69, n. 3, p. 555–562, 2010.

CASTALDINI, M. 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, n. 11, p. 6719–6729, 1 nov. 2005.

CHEEKE, T. E. et al. The influence of fertilizer level and spore density on arbuscular mycorrhizal colonization of transgenic Bt 11 maize (*Zea mays*) in experimental microcosms: Mycorrhizal associations in Bt 11 maize. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 75, n. 2, p. 304–312, fev. 2011.

CHEEKE, T. E.; CRUZAN, M. B.; ROSENSTIEL, T. N. Field Evaluation of Arbuscular Mycorrhizal Fungal Colonization in *Bacillus thuringiensis* Toxin-Expressing (Bt) and Non-Bt Maize. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 13, p. 4078–4086, 1 jul. 2013.

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, n. 4, p. 700–707, 1 abr. 2012.

CHU, Q. et al. Mycorrhizal responsiveness of maize (*Zea mays* L.) genotypes as related to releasing date and available P content in soil. **Mycorrhiza**, v. 23, n. 6, p. 497–505, ago. 2013.

DE DORLODOT, S. et al. Root system architecture: opportunities and constraints for genetic improvement of crops. **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 10, p. 474–481, out. 2007.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–56, 1956.

FITTER, A. H. Natural selection and the evolutionary ecology of the arbuscular mycorrhizal fungi (Phylum Glomeromycota). **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 9, p. 2465–2480, 1 jul. 2009.

FLIEßBACH, A. et al. Effects of conventionally bred and *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize varieties on soil microbial biomass and activity. **Biology and Fertility of Soils**, v. 48, n. 3, p. 315–324, abr. 2012.

FLORES, S.; SAXENA, D.; STOTZKY, G. Transgenic Bt plants decompose less in soil than non-Bt plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1073–1082, 2005.

GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 46, n. 2, p. 235–244, jun. 1963.

GIBSON, S. T. Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signaling network. *Journal of Experimental Botany*, v. 55, n. 395, p. 253–264, 2004.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An Evaluation of Techniques for Measuring Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Infection in Roots. **New Phytologist**, v. 84, n. 3, p. 489–500, 1 mar. 1980.

HART, M. M.; READER, R. Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v. 153, n. 2, p. 335–344, 2002b.

HART, M.; KLIRONOMOS, J. Colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi using different sources of inoculum. **Mycorrhiza**, v. 12, n. 4, p. 181–184, 2002.

HART, M.; READER, R. Does percent root length colonization and soil hyphal length reflect the extent of colonization for all AMF? **Mycorrhiza**, v. 12, n. 6, p. 297–301, 1 dez. 2002a.

HENRI H. DINEL, M. M. S. Extractable soil lipids and microbial activity as affected by Bt and non Bt maize grown on a silty clay loam soil. **Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes**, v. 38, n. 2, p. 211–9, 2003.

HISCOX, J. T; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, n. 12, p. 1332–1334, 1979.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **Circular. California Agricultural Experiment Station**, v. 347, n. 2nd edit, p. 32 pp., 1950.

HOEKSEMA, J. D. et al. A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. **Ecology Letters**, v. 13, n. 3, p. 394–407, mar. 2010.

JANOS, D. P. Vesicular-arbuscular mycorrhizae affect lowland tropical rain forest plant growth. **Ecology**, p. 151–162, 1980.

JONES, M. D.; SMITH, S. E. Exploring functional definitions of mycorrhizas: Are mycorrhizas always mutualisms? **Canadian Journal of Botany**, v. 82, n. 8, p. 1089–1109, ago. 2004.

KAEPPLER, S. M. et al. Variation among Maize Inbred Lines and Detection of Quantitative Trait Loci for Growth at Low Phosphorus and Responsiveness to Arbuscular Mycorrhizal Fungi. **Crop Science**, v. 40, n. 2, p. 358, 2000.

KASCHUK, G. et al. Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses? **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 6, p. 1233–1244, jun. 2009.

KHALIL, S.; LOYNACHAN, T. E.; TABATABAI, M. A. Mycorrhizal Dependency and Nutrient Uptake by Improved and

Unimproved Corn and Soybean Cultivars. **Agronomy Journal**, v. 86, n. 6, p. 949, 1994.

KOSKE, R.E., GEMMA, J.N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. **Mycological Research**, v.92, p.486-505, 1989.

LATIMER, G. W. **Official methods of analysis of AOAC International**. [s.l.] AOAC international, 2012.

LICHTENTHALER, H. K.; WELLBURN, A. R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Transactions**, v. 11, n. 5, p. 591–592, 1983.

MARTIN, P. A.; TRAVERS, R. S. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 10, p. 2437–2442, 1989.

MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 27, p. 31–36, 1962.

PENG, C. C.; XU, Y. H.; XI, R. C.; ZHAO, X. L. Expression, subcellular localization and phytohormone stimulation of a functional sucrose transporter (MdSUT1) in apple fruit. **Scientia Horticulturae**, v. 128, n. 3, p. 206-212, 2011.

RENGEL, Z. Breeding for better symbiosis. **Plant and Soil**, p. 147–162, 2002.

ROGER, A. et al. Relatedness among arbuscular mycorrhizal fungi drives plant growth and intraspecific fungal coexistence. **The ISME journal**, v. 7, n. 11, p. 2137–2146, 2013.

SAWERS, R. J. H.; GUTJAHR, C.; PASZKOWSKI, U. Cereal mycorrhiza: an ancient symbiosis in modern agriculture. **Trends in Plant Science**, v. 13, n. 2, p. 93–97, fev. 2008.

SAXENA, D. et al. Larvicidal Cry proteins from *Bacillus thuringiensis* are released in root exudates of transgenic *B. thuringiensis* corn, potato, and rice but not of *B. thuringiensis* canola, cotton, and

tobacco. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 383–387, 2004.

SERRALDE, A. M.; RAMÍREZ, M. M. Análisis de poblaciones de micorrizas en maíz (*Zea mays*) cultivado en suelos ácidos bajo diferentes tratamientos agronómicos. **Revista Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, v. 5, n. 1, p. 31–40, 2013.

SIQUEIRA, J. O. et al. (Eds.). . **Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil**. 1. ed. Lavras, MG: Editora UFLA, 2010. p. 551–582.

SMITH, F. A.; SMITH, S. E. How harmonious are arbuscular mycorrhizal symbioses? Inconsistent concepts reflect different mindsets as well as results. **New Phytologist**, 2014.

SMITH, S. E.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, v. 39, n. 1, p. 221–244, 1988.

TAWARAYA, K. Arbuscular mycorrhizal dependency of different plant species and cultivars. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 49, n. 5, p. 655–668, out. 2003.

TURRINI, A. et al. Development of a model system to assess the impact of genetically modified corn and aubergine plants on arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, v. 266, n. 1–2, p. 69–75, 1 jan. 2005.

TURRINI, A.; SBRANA, C.; GIOVANNETTI, M. Belowground environmental effects of transgenic crops: a soil microbial perspective. **Research in Microbiology**, v. 166, n. 3, p. 121–131, abr. 2015.

VEIGA, R. S. L. et al. Can Arbuscular Mycorrhizal Fungi Reduce the Growth of Agricultural Weeds? **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p. e27825, 2 dez. 2011.

VERBRUGGEN, E. et al. Provision of contrasting ecosystem services by soil communities from different agricultural fields. **Plant and Soil**, v. 350, n. 1–2, p. 43–55, jan. 2012.

WILLIAMS, S. T. et al. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. **Microbiology**, v. 129, n. 6, p. 1743–1813, 1983.

WRIGHT, D. P. et al. European and African maize cultivars differ in their physiological and molecular responses to mycorrhizal infection. **New Phytologist**, v. 167, n. 3, p. 881–896, 16 jun. 2005.

XUE, K. et al. Changes in soil microbial community structure associated with two types of genetically engineered plants analyzing by PLFA. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 17, n. 1, p. 130–134, 2005.

CAPITULO II

DIVERSIDADE E COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES ASSOCIADOS A PLANTAS DE MILHO TRANSGÊNICO, A ISOLINHA (HÍBRIDO CONVENCIONAL) E UM MILHO CRIOULO

1. APRESENTAÇÃO

A seguir são apresentados os resultados do experimento III que teve por objetivo avaliar, em ensaio a campo, a influência do milho transgênico, sobre a diversidade e composição da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares no solo e nas raízes de milho Bt, sua isolinha e um milho crioulo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

O experimento foi instalado na Fazenda Experimental da Ressacada (CCA-UFSC) em uma área sem registro de cultivo de milho. Inicialmente a área apresentava cobertura vegetal de capoeira e dois anos antes da instalação do experimento foi derrubada para plantação de batata doce e melancia. O solo da área é classificado como Neossolo Quartzarênico Hidromórfico Típico e apresentou as seguintes características: matéria orgânica 87 g dm⁻³, pH em água 5,3; acidez potencial 5,5 (pelo índice do SMP); P 32,6 mg kg⁻¹; K 66,6 mg kg⁻¹.

2.2 Material biológico utilizado

Foram cultivados três genótipos de milho, o híbrido convencional DKB 240 (aqui denominado DKB-I) cultivar isogênica do milho transgênico DKB 240 VT-PRO (DKB-T) e o milho Pixurum 5 (Crioulo), descritos anteriormente. Foi testada a interação desses genótipos de milho com os fungos micorrízicos autóctones, ou seja, aqueles presentes no solo das parcelas experimentais que foram caracterizados por métodos morfológicos e moleculares como explicado no item avaliações.

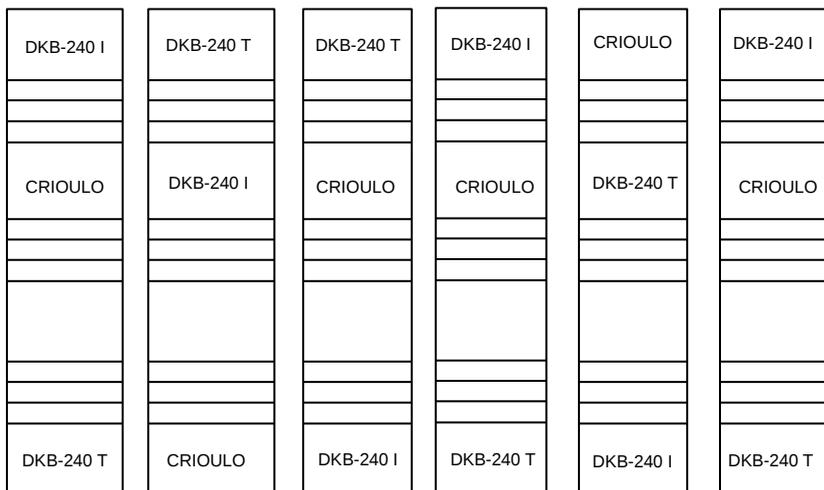
Os genótipos de milho foram testados para determinar a expressão da proteína Cry 1Ab, mediante o uso do kit QuickStixTM (Envirologix, Portland, USA) segundo Saxena et al. (2004).

2.3 Delineamento e montagem do experimento

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso com 6 repetições. Em cada bloco foram instaladas três parcelas experimentais que consistiram de quatro fileiras de milho, cada uma com 4,00 m de comprimento e espaçadas por 90 cm. A distância entre as parcelas foi de 1,80 m e entre os blocos de 2,0 m (Fig. 1). Em cada parcela foi plantado um dos genótipos de milho. As sementes foram colocadas a cada 15 cm

aproximadamente, sendo as duas linhas centrais consideradas a parcela útil para as avaliações.

Figura 1: Croqui da área experimental implantada na fazenda da Ressacada, contendo seis blocos e três tratamentos [três genótipos de milho: DKB 240-I (isolinha); DKB 240-T (transgênico) e crioulo].

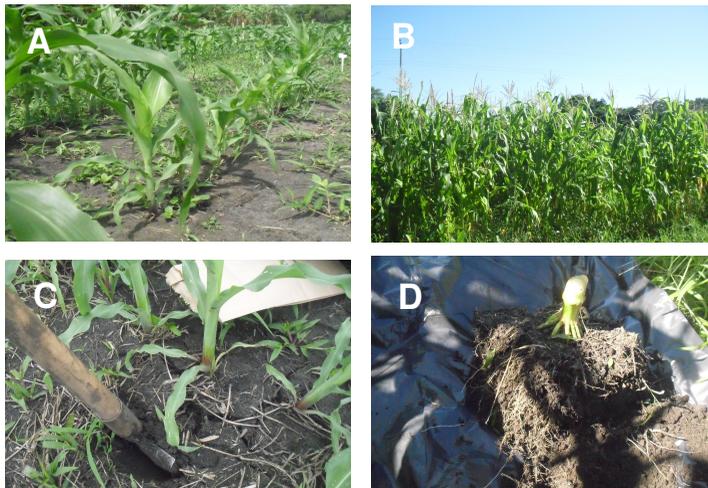


A primeira, das quatro coletas realizadas, foi feita durante a instalação das parcelas (Janeiro/2014) e consistiu da retirada de amostras de solo das linhas centrais (parcela útil). Essas amostras foram utilizadas para posterior avaliação dos atributos químicos e físicos do solo e para a extração de esporos, que permitiu caracterizar a riqueza de FMA no momento zero. As demais coletas foram realizadas durante o ciclo de crescimento do milho, uma em estado vegetativo (Fevereiro/2014), outra durante a floração (Março/2014) e a última durante o preenchimento da espiga (Abril/2014) (figura 2A e 2B). Em cada coleta foram removidas cuidadosamente duas plantas de cada parcela, de modo a preservar o sistema radicular (figura 2C). Depois de removidas, foi realizado um corte rente ao solo com o objetivo de separar a parte aérea e a raiz (figura 2D). Um fragmento foliar da última

folha bem desenvolvida foi retirado e armazenado imediatamente em gelo, para posterior determinação da presença da proteína transgênica Cry 1A-b. O restante da parte aérea foi armazenada em sacos de papel, e levada para estufa de secagem a 50° C até atingir peso constante, para posterior determinação de biomassa seca.

O solo aderido às raízes foi coletado da seguinte forma: uma porção foi acondicionada em sacos plásticos e transportada em gelo até o laboratório, onde foi armazenada a -80 °C. Outra porção de solo foi armazenada a 4 °C para posterior avaliação do número de esporos e potencial de inóculo de FMA. As raízes foram lavadas com abundante água corrente até retirar todas as impurezas e foram coletadas como indicado nos experimentos anteriores, para fazer análise de colonização total. Outra porção da raiz, destinada à extração de DNA, foi armazenada em sacos plásticos, transportados em gelo e armazenados a -80 °C.

Figura 2: Plantas de milho durante a coleta em estágio vegetativo (A) e durante o estágio de floração (B). Forma de retirada das plantas (C) e de separação da parte aérea e do sistema radicular (D).



2.4 Avaliações

2.4.1 Colonização micorrízica, número de esporos e potencial de inóculo

A colonização total e o número de esporos foram avaliados mediante os métodos citados anteriormente. O potencial de inóculo foi estimado pelo método do número mais provável (NMP), segundo descrição apresentada na página da Coleção Internacional de Cultura de Glomeromycota (http://www.furb.br/cicg/det_subpagina.php?id=41). Amostras de solo da última coleta foram submetidas a cinco diluições em séries decimais (10^{-1} a 10^{-5}), utilizando 60 mL do solo da parcela e 540 mL de substrato de areia e vermiculita (1:1) estéril; para obter um total de 600 mL por cada diluição. As diluições assim obtidas foram acondicionadas em tubetes de 100 mL (5 repetições de cada série), e em seguida semeados com *Brachiaria decumbens* e mantidos em casa de vegetação por 30 dias. Além de avaliar o NMP nos três tratamentos (genótipos) nos seis blocos, foi colocado um tratamento referência que consistiu da utilização de solo-inóculo de *Rhizophagus clarus* contendo 350 esporos 50 mL solo⁻¹, isolado este pertencente à coleção de FMA do Laboratório de Microbiologia do Solo da UFSC.

2.4.2 Avaliação da comunidade de FMA

Determinação das morfoespécies

Amostras de esporos de cada parcela pertencentes as coletas inicial e final, foram montadas em lâminas de microscopia para identificar as morfoespécies presentes. Para tal fim, os esporos foram extraídos pelo método de peneiramento úmido e separação em gradiente de sacarose, posteriormente foram passados por peneiras de 90 e 45 μm com o objetivo de fazer uma primeira separação por tamanho. Uma amostra representativa dos esporos obtidos em cada classe de tamanho foi separada e colocada sobre lâmina de microscópio em uma gota de PVLG e outra amostra semelhante, em composição e número de esporos foi colocada na mesma lâmina em uma gota de reagente de Melzer + PVLG. Após esse procedimento, foram colocadas as lamínulas e em

seguida foi aplicada uma pressão suave até conseguir o rompimento da parede dos esporos. A identificação taxonômica das espécies foi realizada com apoio do professor Sidney Luiz Stürmer (FURB, Blumenau), que avaliou várias lâminas escolhidas ao acaso. A identificação seguiu descrições morfológicas disponíveis na página da INVAM (*International Culture Collection of Arbuscular Mycorrhizal Fungi*) (<http://invam.caf.wvu.edu>).

Electroforese em gradiente desnaturante

O material genético das amostras de solo e de raízes foi extraído com o kit *Power Soil® DNA Isolation* (MO BIO, Carlsbad, CA, USA) e *DNeasy®Plant Mini Kit* (QIAGEN, Dusseldorf, Germany), respectivamente, seguindo os protocolos dos fabricantes. Posteriormente foi realizada a amplificação parcial do gene rDNA 28S, utilizando os iniciadores universais para fungos LR1 (5'GCA TAT CAA TAA GCG GAG GA3') e FLR2 (5'GTC GTT TAA AGC CAT TAC GTC3') (TROUVELOT et al., 1999; VAN TUINEN et al., 1998), seguida de uma segunda reação com os iniciadores FLR3 (5' TTG AAA GGG AAA CGA TTG AAG T 3') e FLR4 (5' TAC GTC AAC ATC CTT AAC GAA 3'), específicos para Glomeromycota (GOLLOTTE; VAN TUINEN; ATKINSON, 2004). A reação foi realizada com solução tampão para Taq DNA polimerase, dNTPs 0,2 mmol L⁻¹, MgCl₂ 3 mmol L⁻¹, 1 U DNA polimerase Taq (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 10 mmol L⁻¹ de cada iniciador e 10 ng do DNA extraído. As condições das duas PCR são: 94° C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 93° C por 1 min, 58° C por 1 min, 72° C por 1 min e extensão final de 72° C por 10 min.

A caracterização das comunidades de FMA foi realizada pela técnica da PCR-DGGE: quantidades iguais dos produtos da segunda PCR (200 ng) foram submetidas a eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE). O gel foi preparado com acrilamida:bisacrilamida (8% m/v e 37,5:1, m:m) e o gradiente desnaturante de 15 a 55% foi atingido com soluções de ureia e formamida (ØVREÅS et al., 1997). A eletroforese foi realizada em tampão TAE 1X a 60 °C e 200 V durante 180 min, utilizando-se um sistema "DCode" (BioRad, Hercules, CA, USA). O DNA foi corado com Sybr Green (Life Technologies, São

Paulo, Brasil) e os géis foram documentados em foto documentador GelLogic 220 Pro (Carestream Health, New York, USA). Os amplicons obtidos foram analisados com o programa GEL COMPAR II (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Neste programa foram alinhados os géis obtidos a partir de amostras de solo rizosférico, posteriormente o programa identificou cada banda e por comparação entre as amostras, construiu uma matriz de presença- ausência. O mesmo procedimento foi realizado com os géis obtidos a partir de amostras de raiz. Uma vez gerada esta matriz, as duas repetições de cada parcela foram agrupadas em uma amostra ponderada. Após estes procedimentos foram geradas duas matrizes de presença – ausência, uma pra amostras de solo e outra pra amostras de raízes, que foram utilizadas nas análises subseqüentes.

2.5 Análise estatística.

Os dados de porcentagem de colonização, número de esporos e potencial de inóculo foram analisados em cada época de coleta de forma independente. Foram testados quanto a normalidade e homoscedasticidade e posteriormente submetidos a análise de variância. Quando houve diferenças significativas, as médias foram separadas pelo teste Skott Knott com intervalo de confiança de 95%.

Com a lista de morfoespécies identificadas foi construída uma matriz de presença – ausência e também foi calculada a frequência relativa, que foi usada para avaliar a frequência da espécie nas parcelas de cada genótipo. A fórmula utilizada foi:

$$FR = [NR_{(sp\ X; trat.\ Y)} / NP_{(trat.\ Y)}] \times 100$$

Onde, FR (frequência relativa); $NR_{(sp\ X; trat.\ Y)}$ (número de parcelas do tratamento Y com ocorrência da espécie X; $NP_{(trat.\ Y)}$ (número de parcelas do tratamento = 6).

Para determinar se houve diferenças na composição da comunidade de FMA, associados a cada genótipo ou estágio fenológico, foi realizado o teste não paramétrico de análises multivariada da variância

(PERMANOVA), que testa a resposta simultânea de um conjunto de variáveis a um ou mais fatores, usando a mesma lógica da ANOVA, porém se baseando numa matriz de similaridade e utilizando rotinas de permutação dos dados (ANDERSON 2008). As matrizes de presença-ausência, obtidas a partir dos géis da DGGE e da identificação de morfoespécies, foram utilizadas para calcular matrizes de similaridade mediante o algoritmo de Sørensen. Posteriormente essas matrizes foram submetidas a uma PERMANOVA de medidas repetidas, com 9999 permutações dos resíduos sob um modelo reduzido, no qual os fatores genótipo e estágio fenológico foram tratados como efeitos fixos e os blocos como efeito aleatório. Os fatores que apresentaram efeitos significativos sobre a ordenação das comunidades foram submetidos a análise da homogeneidade da dispersão no espaço multivariado (PERMDISP), com o objetivo de testar a heterogeneidade entre as comunidades de FMA. PERMDISP é um análogo do teste de Levene para a homogeneidade das variâncias e a estatística é testada por permutação dos dados (ANDERSON, 2008). Posteriormente, se o teste PERMDISP não tivesse demonstrado dispersões heterogêneas dos dados, as diferenças mostradas na PERMANOVA foram caracterizadas mediante análise canônica de coordenadas principais (CAP) que é utilizada para discriminar diferenças entre grupos previamente estabelecidos (ANDERSON, 2008).

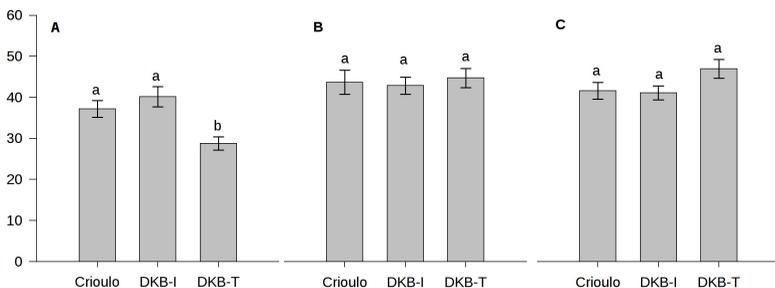
3. RESULTADOS

O teste para detectar a expressão da proteína recombinante Cry1Ab resultou positivo para as plantas transgênicas, enquanto que esta proteína não foi detectada em nenhuma das amostras de milho crioulo ou no híbrido convencional.

3.1 Colonização micorrízica, número de esporos e potencial de inóculo

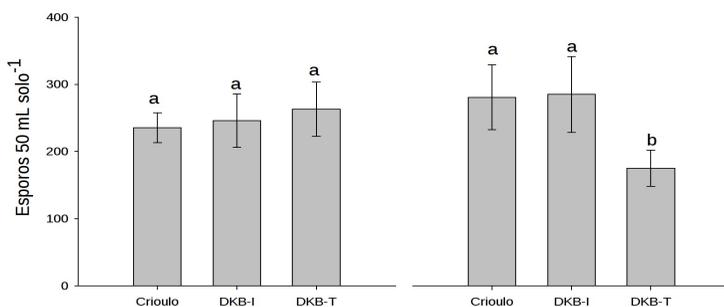
A porcentagem de colonização micorrízica, que variou entre 33% e 44%, foi diferente entre as épocas de avaliação, e só variou entre os genótipos de milho no estágio V3, onde o milho transgênico apresentou menor colonização do que os outros genótipos (Fig.3). Quanto a variação entre estágios fenológicos, no estágio vegetativo houve menor porcentagem de colonização que nos dois estágios reprodutivos (36%; 43% e 44%, respectivamente).

Figura 3: Porcentagem de colonização micorrízica em raízes de três genótipos de milho: transgênico (DKB-T), seu híbrido convencional isogênico (DKB-I) e milho crioulo, em experimento a campo, avaliada em três estágios fenológicos: vegetativo (V3), produção de inflorescências (R1) e desenvolvimento dos grãos (R3).



A densidade de esporos, foi avaliada antes de começar o experimento e durante a coleta final. Houve diferenças no número de esporos dos diferentes genótipos, só na última coleta, aonde o milho transgênico apresentou menor densidade de esporos que os demais. Além disso, observou-se que a densidade de esporos durante o estágio R3 foi 30% maior que antes da instalação do experimento (AIE) (Fig.4).

Figura 4: Número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares em amostras de solo rizosférico de três genótipos de milho: transgênico (DKB-T), seu híbrido convencional isogênico (DKB-I) e um milho crioulo, em experimento a campo, antes da instalação do experimento (AIE) e na última coleta, quando as plantas apresentavam grãos em desenvolvimento (R3)



O potencial de inóculo foi avaliado na última coleta, durante o estágio R3 e não apresentou diferenças entre os genótipos de milho. O potencial de inóculo (média \pm erro padrão da média) no milho crioulo foi de 968 ± 228 propágulos g de solo⁻¹, para a cultivar isogênica DKB-I foi de 1823 ± 571 propágulos g de solo⁻¹ e para o transgênico DKB-T foi de 1361 ± 540 propágulos g de solo⁻¹.

3.2 Avaliação da comunidade de FMA associada ao milho crioulo, a cultivar isogênica e o transgênico.

3.2.1 Morfoespécies

Foram identificadas 20 espécies pertencentes a sete gêneros e quatro famílias (Tabela 1). A família Acaulosporaceae apresentou um maior número de espécies (nove), seguida pela família Gigasporaceae (seis) e pela família Glomeraceae (quatro).

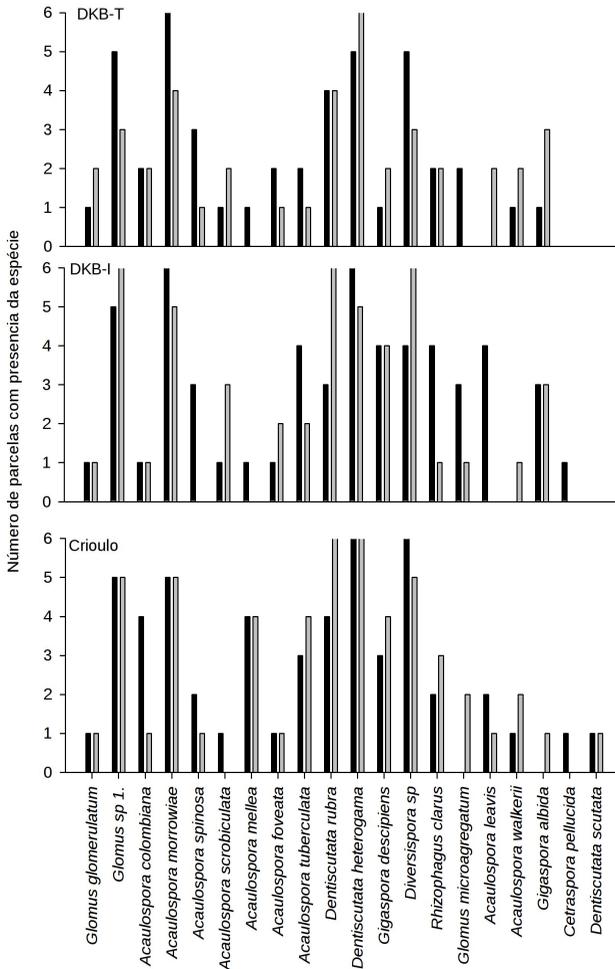
Tabela 1: Frequência relativa de morfoespécies de fungos micorrízicos arbusculares em amostras de solo rizosférico de três genótipos de milho: transgênico (DKB-T), híbrido convencional isogênico (DKB-I) e um milho crioulo, em experimento a campo, antes da instalação do experimento (AIE) e na última coleta durante a formação do grão (R3).

Família	Espécie
Glomeraceae	<i>Glomus glomerulatum</i> Sieverding
	<i>Glomus microaggregatum</i> Koske, Gemma e Oleixa
	<i>Glomus</i> sp 1.
	<i>Rhizophagus clarus</i> C. Walker e Schuessler.
Acaulosporaceae	<i>Acaulospora colombiana</i> (Spain & N.C. Schenck) Kaonongbua, J.B. Morton e Bever.
	<i>Acaulospora morrowiae</i> Spain e Schenck
	<i>Acaulospora spinosa</i> Walker e Trappe
	<i>Acaulospora scrobiculata</i> Trappe
	<i>Acaulospora laevis</i> Gerdemann e Trappe
	<i>Acaulospora mellea</i> Spain & N.C. Schenck
	<i>Acaulospora walkeri</i> Kramadibrata e Hedger
	<i>Acaulospora foveata</i> Trappe e Janos
	<i>Acaulospora tuberculata</i> Janos e Trappe

Família	Espécie
Gigasporaceae	<i>Dentiscutata rubra</i> (Stürmer & J.B. Morton) Oehl, F.A. Souza & Sieverd
	<i>Dentiscutata heterogama</i> (T.H. Nicolson & Gerd.) Sieverd., F.A. Souza & Oehl
	<i>Dentiscutata scutata</i> (C. Walker & Dieder) Sieverd., F.A. Souza & Oehl
	<i>Gigaspora albida</i> N.C. Schenck & G.S. Sm
	<i>Gigaspora decipiens</i> I.R. Hall & L.K. Abbott
	<i>Cetraspora pellucida</i> (T.H. Nicolson & N. C. Schenck) (C. Walker & F.E. Sanders) Oehl, F.A. Souza & Sieverd.
Diversisporaceae	<i>Diversispora sp1</i>

Antes da instalação do experimento (AIE), nas parcelas onde seria cultivado o milho crioulo, não foram detectadas as espécies *Glomus glomerulatum* e *Gigaspora albida*. No estágio R3 não foi registrada nenhuma ocorrência das espécies *Acaulospora scrobiculata* e *Cetraspora pellucida*. Nas parcelas do milho DKB-I não foram detectadas *Acaulospora walkeri* nem *Dentiscutata scutata* antes da instalação do experimento, nem *Acaulospora spinosa*, *Acaulospora laevis*, *Acaulospora mellea*, *Dentiscutata scutata* e *Cetraspora pellucida* no estágio R3. No caso do milho transgênico, as espécies não detectadas AIE foram *Acaulospora laevis*, *Dentiscutata scutata* e *Cetraspora pellucida*; enquanto que no estágio R3, não foram observadas as espécies *Acaulospora mellea*, *Dentiscutata scutata* e *Cetraspora pellucida* (Figura 5).

Figura 5: Frequência relativa de espécies de fungos micorrízicos arbusculares em três genótipos de milho, um transgênico (DKB-T), o híbrido convencional isogênico (DKB-I) e um milho crioulo, em experimento a campo, avaliada em duas épocas: antes da instalação do experimento (barras pretas) e na última coleta durante a formação do grão (barras cinzas).



A análise de Variância Pemuacional Multivariada (PERMANOVA) das comunidades de FMA esporulantes não detectou diferenças significativas entre os genótipos de milho ($P_{(per)} = 0,917$) nem entre as épocas avaliadas ($P_{(per)} = 0,052$) sugerindo uma distribuição aleatória das espécies na área experimental.

3.2.2 Electroforese em gradiente desnaturante

Com o objetivo de avaliar a estrutura das comunidades de FMA no solo rizosférico e nas raízes foram realizadas comparações entre os genótipos de milho (Crioulo, DKB-I e DKB-T) e os estágios fenológicos (V3, R1 e R3). Não houve diferenças entre os genótipos no número de bandas presentes, tanto nas amostras de solo como nas de raiz. Referente as épocas de coleta, nas amostras de solo, houve um aumento no número de bandas apenas do AIE para o estágio R1, mas nas amostras de raiz, o número de bandas permaneceu constante entre os estágios (Tabela 2).

Tabela 2. Número de bandas obtidas a partir de amplicons da região 28S de fungos micorrízicos arbusculares, avaliados mediante PCR-DGGE, a partir de amostras de solo e de raiz em experimento com três genótipos de milho, um crioulo, o híbrido convencional DKB-I e o transgênico DKB-T, antes da instalação do experimento (AIE), e em três estágios fenológicos, vegetativo (V3) durante a floração (R1) e durante o desenvolvimento dos grãos (R3). Média \pm (Intervalo de confiança 95%).

	Número de bandas em amostras de solo				Número de bandas em amostras de raiz			
	Crioulo	DKB-I	DKB-T	Média	Crioulo	DKB-I	DKB-T	Média
AIE	34 \pm (4)	33 \pm (5)	31 \pm (3)	33 \pm (4)	-	-	-	-
V3	41 \pm (2)	37 \pm (3)	36 \pm (3)	38 \pm (3)	19 \pm (1)	20 \pm (1)	17 \pm (1)	19 \pm (1)
R1	50 \pm (2)	32 \pm (4)	44 \pm (3)	42 \pm (3)	20 \pm (2)	18 \pm (2)	20 \pm (2)	20 \pm (2)
R3	35 \pm (2)	45 \pm (4)	30 \pm (3)	37 \pm (3)	20 \pm (2)	23 \pm (3)	22 \pm (2)	22 \pm (2)
Média	40 \pm (3)	37 \pm (4)	35 \pm (3)		20 \pm (1)	20 \pm (1)	20 \pm (1)	

Comparações entre os genótipos e os estágios fenológicos:

A análise de variância permutacional multivariada não detectou diferenças na composição das comunidades de FMA entre os três genótipos estudados, nem no solo nem nas raízes, porém em ambos tipos de amostras foram observadas diferenças nas comunidades de FMA entre os estágios fenológicos da planta (Tabela 3).

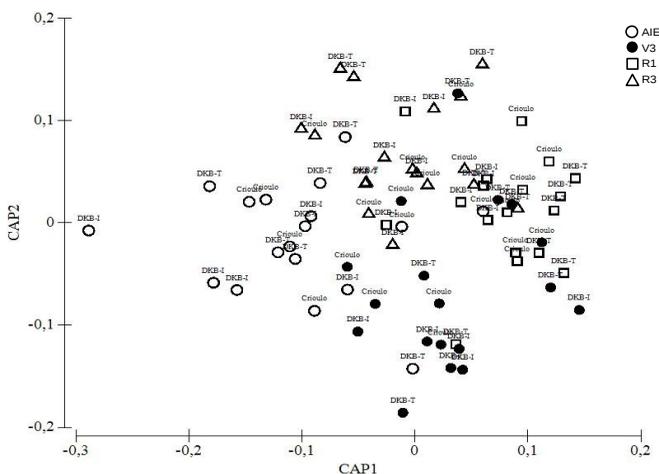
Tabela 3. Resultados da PERMANOVA de medidas repetidas para as comparações entre comunidades de FMA associadas a solo e raízes de três genótipos de milho, um crioulo, o híbrido convencional DKB-I e o transgênico DKB-T, em três estágios fenológicos: vegetativo (V3), durante a floração (R1) e durante o desenvolvimento dos grãos (R3).

Comunidades de FMA no solo			
Fonte de variação	g.l	<i>Pseudo F</i>	<i>P</i> (<i>perm</i>)
Bloco (genótipo)	15	1,159	0,083
Genótipo (G)	2	0,766	0,790
Estágio fenológico (EF)	3	3,309	0,0001
G x EF	6	1,226	0,84
Resíduos	45	-	-
Total	71	-	-
Comunidades de FMA na raiz			
Fonte de variação	g.l	<i>Pseudo F</i>	<i>P</i> (<i>perm</i>)
Bloco (genótipo)	15	1,125	0,19
Genótipo (G)	2	0,748	0,774
Estágio fenológico (EF)	2	2,376	0,002
G x EF	4	0,979	0,491
Resíduos	30	-	-
Total	53	-	-

A homogeneidade da dispersão no espaço multivariado foi testada para o fator estágio fenológico, sendo não significativa para as comunidades obtidas a partir de amostras de solo ($p = 0,068$) e para aquelas obtidas a partir de amostras de raiz ($p = 0,074$).

As comunidades de FMA do solo apresentaram diferenças entre todos os estágios fenológicos como mostrado pela análise canônica de coordenadas principais (CAP; $p < 0,05$): o primeiro eixo diferencia a estrutura de comunidades antes da instalação do experimento e no estágio R1, enquanto que o segundo eixo separa as comunidades do estágio V3 e R3 (Figura 6). Na análise também se evidencia que a comunidade de FMA antes da instalação do experimento foi a mais heterogênea, com as amostras mais dispersas no espaço multivariado, enquanto que no estágio R1 a comunidade foi mais homogênea. Também pode ser constatado que as comunidades do estágio V3 e do estágio R1 foram muito semelhantes entre si (Figura 6).

Figura 6: Análise canônica de coordenadas principais para as comunidades de fungos micorrízicos arbusculares provenientes de solo rizosférico de plantas de milho, antes da instalação do experimento (AIE) e em três estágios fenológicos, vegetativo (V3), em floração (R1) e durante o desenvolvimento dos grãos (R3).



4. DISCUSSÃO:

Este trabalho avaliou a diversidade de FMA em amostras de solo rizosférico e raízes de três genótipos de milho, um transgênico, a isolinha e um milho crioulo, em diferentes estágios fenológicos da cultura, com o objetivo de responder se o genótipo e a transgenia têm efeitos sobre a estrutura das comunidades de FMA.

Na identificação morfológica dos esporos o gênero *Acaulospora* apresentou o maior número de espécies (9), seguido por *Dentiscutata* (3) e *Glomus* (3), e no total foram identificadas 20 espécies. Outros estudos descrevendo as espécies de FMA encontradas na rizosfera de plantas de milho encontraram entre 6 e 27 espécies a maioria pertencentes aos gêneros acima citados (SERRALDE e RAMÍREZ, 2004; MATHIMARAN et al., 2007; TIAN et al., 2011; CASTELLI et al., 2014). Segundo Carrenho et al. (2001), trabalhos avaliando a diversidade de FMA em monoculturas de milho no Brasil, relataram a presença de seis a 22 espécies, sendo que o gênero *Acaulospora* foi o mais frequente, seguido pelo gênero *Glomus* e *Scutellospora*, tal como aconteceu no presente estudo.

Os FMA participam de vários processos dos ecossistemas, particularmente na agregação do solo, a ciclagem dos nutrientes e a resiliência das comunidades vegetais a perturbações bióticas e abióticas (estresse hídrico, ataques por patógenos, etc). A maior diversidade de FMA esta associada a maiores benefícios para a comunidade vegetal, uma vez que uma comunidade mais diversa pode apresentar uma gama de funções mais ampla (KOIDE, 2000). A funcionalidade das espécies, nos ecossistemas, está determinada pelo nicho ecológico e por eventuais adaptações ao ambiente, para os FMA em particular, pela forma de aquisição dos recursos (CRISP e COOK, 2012; POWELL et al., 2009). Por exemplo, há evidências de divergência evolutiva entre grupos de FMA, com diferentes estratégias de colonização, que ocupam predominantemente o espaço da raiz ou o espaço do solo, e tais estratégias estão relacionadas com a capacidade do fungo induzir acúmulo de biomassa e nutrientes na planta simbiótica. Assim, há evidências de diferenças entre as funções que as espécies de FMA

podem desempenhar em um ecossistema. No caso do milho transgênico, é importante avaliar se a transgenia produz efeitos sobre a estrutura da comunidade de FMA associados ao milho transgênico. Em outros termos, é preciso verificar se a modificação genética promove ou inibe o crescimento de algumas espécies de FMA, presentes no solo ou nas raízes dessa cultura, uma vez que tais modificações nas comunidades podem causar mudanças na biodiversidade funcional e assim, acarretar implicações ecológicas subsequentes.

A presente pesquisa não encontrou efeitos dos genótipos sobre a estrutura da comunidade de FMA provenientes de amostras de solo ou de raiz, identificados mediante métodos morfológicos ou moleculares, entre três genótipos de milho. Outros trabalhos avaliando o efeito da transgenia sobre a composição da comunidade de FMA no solo ou nas raízes tem encontrado resultados semelhantes.

Por exemplo, Cheeke et al. (2013), não encontraram diferenças em experimento avaliando o efeito de sete genótipos de milho Bt e suas isolinhas sobre a abundância e diversidade de esporos em diferentes estágios fenológicos da planta. Em experimento posterior, Cheeke et al. (2016) obtiveram os mesmos resultados e conseguiram demonstrar uma alta dependência dessas comunidades à distância separando os blocos aonde foram tomadas as amostras. Esses autores conseguiram determinar que a distâncias maiores do que um metro, as comunidades de FMA foram diferentes.

A comparação das comunidades de FMA em diferentes estágios fenológicos da planta demonstrou que houve diferentes arranjos de comunidades que dependeram desses estágios e isso aconteceu com as amostras provenientes de solo e de raiz. As comunidades de FMA dos estágios reprodutivos, em particular do estágio R1, apresentaram índices de similaridade ao interior do grupo maiores do que nos outros estágios fenológicos. Caso semelhante ocorreu com a análise morfológica dos esporos que, ainda que não apresentaram diferenças na composição da comunidade de FMA, entre as duas épocas avaliadas, antes da instalação do experimento e no final do mesmo, apresentaram um valor de $P_{(per)}$ próximo ao limite (0,052). Isso, somado às diferenças na frequência relativa das espécies, principalmente dos gêneros *Acaulospora* e

Gigaspora, pode ser indício de uma mudança entre as espécies de FMA induzidas pela cultura do milho.

Outros trabalhos avaliando a comunidade de FMA associada a milho transgênico e sua isolinha detectaram, como no presente trabalho, uma influência maior do estágio fenológico da planta do que da transgenia, sobre os arranjos de espécies. Por exemplo, em experimento avaliando a estrutura das comunidades de FMA da família Glomeraceae associadas a plantas de milho contendo os eventos Bt 11, MON 810 e suas respectivas isolinhas, foram detectados diferentes padrões de bandas no gel de DGGE, em decorrência do estágio fenológico da planta (TAN et al., 2011). Por outro lado, em estudo avaliando a comunidade de FMA mediante sequenciamento de última geração, Verbruggen et al. (2012) observaram maior riqueza de espécies e mudanças na abundância de diferentes grupos de FMA encontrados em amostras obtidas aos 104 dias após a emergência das sementes, momento no qual começaram a se desenvolver as espigas. Tais resultados concordam com aqueles encontrados por Tian et al. (2011), que avaliaram comunidades de FMA associadas a plantas de milho (híbridos convencionais) em diferentes sistemas de produção, fazendo uso de métodos morfológicos de classificação de espécies, e encontraram uma maior diversidade de FMA no estágio R1.

Na presente pesquisa, durante os estágios reprodutivos também foi observada a maior porcentagem de colonização micorrízica e a maior densidade de esporos. Resultados semelhantes foram observados por Tian et al. (2011) ao avaliar a dinâmica espaço-temporal dos FMA associados a diferentes sistemas de cultivo de milho, e por Checke et al (2013), que também encontraram aumentos na colonização e esporulação durante os estágios reprodutivos do milho em estudo avaliando a micorrização em plantas transgênicas e suas contrapartes isogênicas. O aumento na colonização micorrízica neste estágio fenológico pode estar associado ao aumento na demanda de fósforo por parte da planta para a formação de flores e frutos (FAGERIA, 2009). Por outro lado o aumento de esporos durante o período R3 pode estar relacionado com a dinâmica da produção de esporos pelos FMA. Esta produção aumenta na medida em que a planta hospedeira cresce,

acumula biomassa e se aproxima a senescência, seguindo um padrão sigmoide (DECLERK et al., 2001; MOREIRA E SIQUEIRA, 2006), e mais pontualmente no milho, com a maior translocação de carbono da planta para o fungo que ocorre durante toda sua fase reprodutiva (GRIGERA et al., 2007).

Assim, o estágio fenológico foi o fator que mais influenciou a estrutura das comunidades de FMA, incluso mais do que o genótipo e do que a expressão da proteína recombinante.

5. CONCLUSÕES

Foram identificadas 20 espécies de FMA no solo rizosférico de diferentes genótipos de milho, sendo o gênero *Acaulospora*, *Glomus* e *Dentiscutata* aqueles mais predominantes independente da presença da transgenia.

Não houve efeitos significativos da transgenia ou do genótipo do milho no potencial de inóculo e na porcentagem de colonização micorrízica. Em relação ao período anterior ao cultivo do milho, houve aumento no número de esporos de FMA no estágio fenológico R3, confirmando o carácter micotrófico do milho.

A comunidade de fungos micorrízicos arbusculares foi mais influenciada pelo estágio fenológico do que pelo genótipo do milho. Houve maior similaridade entre os estágios adjacentes e as diferenças aumentaram com o passar do tempo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, M. J. 2006. Distance-based tests for homogeneity of multivariate dispersions. **Biometrics** 62:245–253.

BEVER, J. D. et al. Arbuscular Mycorrhizal Fungi: More Diverse than Meets the Eye, and the Ecological Tale of Why The high diversity of ecologically distinct species of arbuscular mycorrhizal fungi within a single community has broad implications for plant ecology. **Bioscience**, v. 51, n. 11, p. 923–931, 2001.

CARVALHO, L. M. et al. Spatial variability of arbuscular mycorrhizal fungal spores in two natural plant communities. **Plant and Soil**, v. 251, n. 2, p. 227–236, 2003.

CARRENHO, R. et al. Successive cultivation of maize and agricultural practices on root colonization, number of spores and species of arbuscular mycorrhizal fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 262–270, 2001.

CASTELLI, M. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi diversity in maize under different soil managements and seed treatment with fungicide. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 12, n. 2, p. 486–491, 2014.

CHEEKE, T. E. et al. Spatial soil heterogeneity has a greater effect on symbiotic arbuscular mycorrhizal fungal communities and plant growth than genetic modification with *Bacillus thuringiensis* toxin genes. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 10, p. 2580–2593, maio 2015.

CHEEKE, T. E.; CRUZAN, M. B.; ROSENSTIEL, T. N. Field Evaluation of Arbuscular Mycorrhizal Fungal Colonization in *Bacillus thuringiensis* Toxin-Expressing (Bt) and Non-Bt Maize. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 13, p. 4078–4086, 1 jul. 2013.

CRISP, M. D.; COOK, L. G. Phylogenetic niche conservatism: what are the underlying evolutionary and ecological causes? **New Phytologist**, v. 196, n. 3, p. 681–694, nov. 2012.

DECLERK, S. et al. Modelling the sporulation dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi in monoxenic culture. **Mycorrhiza**, v. 11, n. 5, p. 225–230, 1 out. 2001.

EGAN, C.; LI, D.-W.; KLIRONOMOS, J. Detection of arbuscular mycorrhizal fungal spores in the air across different biomes and ecoregions. **Fungal Ecology**, Fungal ecology beyond boundaries: from communities to the globe. v. 12, p. 26–31, dez. 2014.

FAGERIA, N. K. **The use of nutrients in crop plants**. Boca Raton: CRC Press, 2009.

GOLLOTTE, A.; VAN TUINEN, D.; ATKINSON, D. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising roots of the grass species *Agrostis capillaris* and *Lolium perenne* in a field experiment. **Mycorrhiza**, v. 14, n. 2, p. 111–117, abr. 2004.

GRIGERA, M. S. et al. Distribution of the arbuscular mycorrhizal biomarker C16:1cis11 among neutral, glyco and phospholipids extracted from soil during the reproductive growth of corn. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 7, p. 1589–1596, jul. 2007.

GU, M. et al. Expression analysis suggests potential roles of microRNAs for phosphate and arbuscular mycorrhizal signaling in *Solanum lycopersicum*. **Physiologia Plantarum**, v. 138, n. 2, p. 226–237, fev. 2010.

HARIKUMAR, V. S. Arbuscular mycorrhizal associations in sesame under low-input cropping systems. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 61, n. 3, p. 347–359, 4 mar. 2015.

KOIDE, R. T. Functional complementarity in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: FORUM Commentary. **New Phytologist**, v. 147, n. 2, p. 233–235, ago. 2000.

LEKBERG, Y. et al. Role of niche restrictions and dispersal in the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. **Journal of Ecology**, v. 95, n. 1, p. 95–105, jan. 2007.

MANGAN, S. A.; ADLER, G. H. Consumption of arbuscular mycorrhizal fungi by terrestrial and arboreal small mammals in a

Panamanian cloud forest. **Journal of Mammalogy**, v. 81, n. 2, p. 563–570, 2000.

MASER, C.; TRAPPE, J. M.; NUSSBAUM, R. A. Fungal-small mammal interrelationships with emphasis on Oregon coniferous forests. **Ecology**, p. 799–809, 1978.

MATHIMARAN, N. et al. Impact of agricultural management on arbuscular mycorrhizal fungal communities in Kenyan ferralsol. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 119, n. 1–2, p. 22–32, fev. 2007.

MOREIRA, F. M. .; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2a. ed. Lavras, MG: UFLA, 2006.

ØVREÅS, L. et al. 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**, v. 63, n. 9, p. 3367–3373, 1997.

POWELL, J. R. et al. Phylogenetic trait conservatism and the evolution of functional trade-offs in arbuscular mycorrhizal fungi. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 276, n. 1676, p. 4237–4245, 7 dez. 2009.

SAXENA, D. et al. Larvicidal Cry proteins from *Bacillus thuringiensis* are released in root exudates of transgenic *B. thuringiensis* corn, potato, and rice but not of *B. thuringiensis* canola, cotton, and tobacco. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 383–387, 2004.

SERRALDE, A. M.; RAMÍREZ, M. M. Análisis de poblaciones de micorrizas en maíz (*Zea mays*) cultivado en suelos ácidos bajo diferentes tratamientos agronómicos. **Revista Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, v. 5, n. 1, p. 31–40, 2013.

TAN, F. et al. Assessment of the arbuscular mycorrhizal fungal community in roots and rhizosphere soils of Bt corn and their non-Bt isolines. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 12, p. 2473–2479, dez. 2011.

TIAN, H. et al. Spatio-temporal dynamics of an indigenous arbuscular mycorrhizal fungal community in an intensively managed maize agroecosystem in North China. **Applied Soil Ecology**, v. 47, n. 3, p. 141–152, mar. 2011.

TIAN, H. et al. Spatio-temporal dynamics of an indigenous arbuscular mycorrhizal fungal community in an intensively managed maize agroecosystem in North China. **Applied Soil Ecology**, v. 47, n. 3, p. 141–152, mar. 2011.

TROUVELOT, S. et al. Visualization of ribosomal DNA loci in spore interphasic nuclei of glomalean fungi by fluorescence in situ hybridization. **Mycorrhiza**, v. 8, n. 4, p. 203–206, 1 jan. 1999.

VAN TUINEN, D. et al. Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. **Molecular Ecology**, v. 7, n. 7, p. 879–887, 1998.

VERBRUGGEN, E. et al. Provision of contrasting ecosystem services by soil communities from different agricultural fields. **Plant and Soil**, v. 350, n. 1–2, p. 43–55, jan. 2012.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A microbiota do solo é um importante componente da agrobiodiversidade, seu manejo e conservação são aspectos fundamentais para a implementação de sistemas de produção, que impulsionem relações mais harmônicas entre os seres humanos e a natureza. Os fungos micorrízicos arbusculares são organismos chave nos processos ecossistêmicos, tanto pelas suas funções na ciclagem dos nutrientes como por seu papel na estruturação do solo. Os resultados desta pesquisa demonstraram que mesmo não havendo diferenças nas comunidades de FMA associadas a genótipos de milho, incluso transgênicos, a identidade genética da planta foi um fator determinante no desempenho da simbiose, sugerindo que plantas com histórico de seleção em sistemas de cultivo com baixo uso de fertilizantes podem aproveitar melhor a simbiose micorrízica e por tanto o seu cultivo pode contribuir a conservação destes fungos. Por outro lado, agricultores familiares que plantam milho crioulo, podem ser beneficiados pelo manejo das populações de FMA, ao obterem plantas mais sadias e com maior produção. Por essas razões, pesquisas futuras devem abordar este tópico, visando melhorar o nosso conhecimento sobre a dinâmica populacional dos FMA em sistemas de cultura de milho crioulo que inclusive consigam determinar os genótipos com a melhor resposta micorrízica e que possam ser alternativa sustentável. Esse tipo de ações é de fundamental importância, uma vez que o mercado de sementes está cada vez mais monopolizado e na atualidade é difícil encontrar oferta variada de sementes, por exemplo, de híbridos que não sejam transgênicos.

Por outro lado, experimentos maiores, a longo prazo, são necessários para entender a dinâmica dos microrganismos do solo e as culturas transgênicas uma vez que esta e outras pesquisas já apontaram a existência de efeitos transitórios gerados pelos genótipos transgênicos, mesmo que a explicação para a existência desses efeitos ainda não tem sido revelada.

APÊNDICE A

Tabela S1: Altura, diâmetro e biomassa de cinco genótipos de milho: *um crioulo*, *dois híbridos isolinhas (I)* e *dois transgênicos (T)*, inoculados com *Gigaspora margarita (Gm)*, *Rhizophagus clarus (Rc)*, *ambos os fungos (Gm + Rc)* ou *sem inoculação (NI)*, 30 dias após a emergência das plantas.

	Plantas não inoculadas			Plantas inoculadas com Rc		
	Altura	Diâmetro	Biomassa	Altura	Diâmetro	Biomassa
	(cm)	(mm)	(g)	(cm)	(mm)	(g)
Crioulo	14,6 (1,6)	4,5 (0,3)	0,49 (0,1)	13,9 (0,4)	5,1 (0,6)	0,79 (0,05)
DKB-I	18,6 (0,4)	5,7 (0,3)	0,90 (0,05)	17,5 (0,7)	6,1 (0,1)	0,91 (0,05)
DKB-T	18,3 (1,2)	5,8 (0,3)	0,88 (0,05)	17,4 (0,6)	5,9 (0,1)	0,89 (0,05)
Form.- I	20,5 (0,4)	9,4 (0,1)	2,05 (0,1)	19,3 (0,5)	8,8 (0,1)	1,58 (0,1)
Fórm - T	17,9 (0,8)	9,3 (0,4)	1,98 (0,05)	14,8 (0,5)	7,8 (0,2)	0,98 (0,1)
	Plantas inoculadas com Gm			Plantas inoculadas com Rc + Gm		
	Altura	Diâmetro	Biomassa	Altura	Diâmetro	Biomassa
	(cm)	(mm)	(g)	(cm)	(mm)	(g)
Crioulo	13,1 (0,2)	4,5 (0,05)	0,62 (0,05)	12,9 (2,0)	4,8 (0,1)	0,64 (0,05)
DKB-I	16,6 (1,3)	5,3 (0,4)	0,87 (0,05)	15,9 (0,8)	5,2 (0,2)	0,74 (0,05)
DKB-T	17,3 (1,0)	5,5 (0,4)	0,76 (0,05)	16,2 (0,4)	5,3 (0,2)	0,65 (0,05)
Form.- I	17,5 (0,4)	8,2 (0,3)	1,43 (0,05)	16,8 (1,5)	7,9 (0,7)	1,58 (0,1)
Fórm - T	16,1 (1,2)	8,3 (0,5)	1,59 (0,1)	17,6 (0,6)	8,7 (0,2)	1,47 (0,1)

Fonte: desenvolvido pelo autor

Tabela S2: Altura, diâmetro, biomassa e teor de fósforo em cinco genótipos de milho: *um crioulo*, *dois híbridos isolinhas (I)* e *dois*

transgênicos (T), inoculados com Gigaspora margarita (Gm), Rhizophagus clarus (Rc), ambos os fungos (Gm + Rc) ou sem inoculação (NI), 60 dias após a emergência das plantas.

	Plantas não inoculadas			Plantas inoculadas com Rc		
	Altura (cm)	Diâmetro (mm)	Biomassa (g)	Altura (cm)	Diâmetro (mm)	Biomassa (g)
Crioulo	30,6 (2,2)	9,7 (0,6)	5,54 (0,7)	27,3 (1,5)	10,4 (0,5)	6,07 (0,7)
DKB-I	31,3 (1,0)	9,4 (0,05)	6,21 (0,2)	29,3 (1,3)	10,4 (0,3)	6,97 (0,2)
DKB-T	31,9 (0,7)	9,8 (0,2)	6,16 (0,2)	28,4 (0,6)	9,7 (0,2)	6,51 (0,4)
Form.- I	26,2 (0,8)	13,7 (0,3)	8,13 (0,1)	25,1 (0,7)	13,5 (0,2)	7,29 (0,3)
Fórm - T	23,2 (0,7)	12,1 (0,9)	6,82 (0,2)	22,5 (1,8)	13,4 (0,5)	6,12 (0,4)
	Plantas inoculadas com Gm			Plantas inoculadas com Rc + Gm		
	Altura (cm)	Diâmetro (mm)	Biomassa (g)	Altura (cm)	Diâmetro (mm)	Biomassa (g)
Crioulo	28,8 (3,0)	10,2 (0,6)	4,53 (0,6)	27,2 (1,7)	9,4 (0,2)	4,62 (0,3)
DKB-I	31,3 (1,7)	12,4 (1,6)	5,86 (0,7)	24,7 (1,6)	9,0 (0,8)	5,35 (0,9)
DKB-T	29,0 (2,0)	9,9 (0,3)	5,67 (0,3)	27,7 (0,9)	9,0 (0,6)	5,67 (0,6)
Form.- I	24,4 (0,9)	13,4 (0,5)	7,13 (0,4)	22,6 (0,6)	13,2 (0,3)	6,05 (0,5)
Fórm - T	22,5 (0,9)	13,0 (0,1)	6,11 (0,3)	19,1 (1,6)	12,1 (1,2)	6,27 (0,2)

Fonte: desenvolvido pelo autor

Tabela S3: Altura, diâmetro e biomassa de cinco genótipos de milho: *um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos (T), inoculados com*

Rhizophagus clarus (Rc), ou sem inoculação (NI), 30 dias após a emergência das plantas.

	Plantas não inoculadas			Plantas inoculadas com Rc		
	Altura (cm)	Diâmetro (mm)	Biomassa (g)	Altura (cm)	Diâmetro (mm)	Biomassa (g)
Crioulo	26,8 (0,4)	0,7 (0,01)	3,0 (0,2)	22,1 (0,4)	0,7 (0,04)	2,3 (0,2)
DKB-I	17,8 (0,8)	0,6 (0,04)	1,2 (0,2)	18,2 (0,5)	0,6 (0,02)	1,3 (0,1)
DKB-T	17,6 (0,7)	0,6 (0,02)	1,3 (0,1)	19,2 (0,5)	0,6 (0,02)	1,6 (0,1)
Form.- I	20,8 (0,9)	0,7 (0,06)	2,9 (0,4)	21,2 (0,5)	0,8 (0,03)	2,7 (0,3)
Fórm - T	19,9 (0,2)	0,6 (0,04)	2,9 (0,3)	19,62 (0,2)	0,7 (0,04)	2,3 (0,2)

Fonte: desenvolvido pelo autor

Tabela S4: Altura, diâmetro e biomassa de cinco genótipos de milho: *um crioulo, dois híbridos isolinhas (I) e dois transgênicos (T), inoculados com Rhizophagus clarus (Rc) ou sem inoculação (NI), 60 dias após a emergência das plantas.*

	Plantas não inoculadas			Plantas inoculadas com Rc		
	Altura (cm)	Diâmetro (mm)	Biomassa (g)	Altura (cm)	Diâmetro (mm)	Biomassa (g)
Crioulo	45,9 (0,9)	8,1 (0,3)	10,5 (0,4)	56,9 (1,2)	9,9 (0,1)	13,1 (0,4)
DKB-I	53,3 (2,2)	6,0 (0,4)	12,1 (0,4)	66 (1,3)	6,3 (0,3)	13,1(0,6)
DKB-T	59,4 (1,4)	6,6 (0,3)	12,5 (0,4)	62,3 (1,8)	5,9 (0,3)	12,3 (0,9)
Form.- I	59,8 (1,3)	6,5 (0,5)	12,7 (0,2)	48,9 (1,8)	10,0 (0,2)	12,5 (0,6)
Fórm - T	52,5 (1,6)	10,7 (0,1)	13,8 (0,5)	50,9 (2,4)	9,0 (0,3)	12,7 (0,3)

Fonte: desenvolvido pelo autor

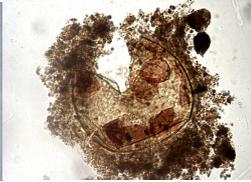
APÊNDICE B

Avaliação da comunidade de FMA associada ao milho crioulo, a cultivar isogênica e o transgênico.

Figura S1: Imágenes em microscopia óptica das 20 de morfoespécies de fungos micorrízicos arbusculares identificadas em amostras de solo rizosférico de três genótipos de milho: transgênico (DKB-T), híbrido convencional isogênico (DKB-I) e um milho crioulo, em experimento a campo.



Rhizopagus clarus



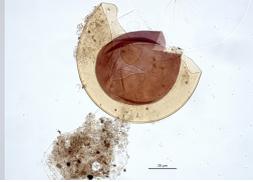
Glomus microaggregatum



Glomus glomerulatum



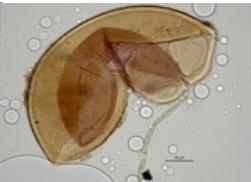
Glomus sp 1



Acaulospora colombiana



Acaulospora morrowiae



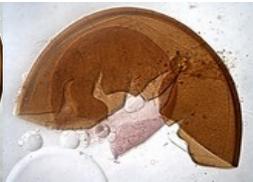
Acaulospora spinosa



Acaulospora scrobiculata



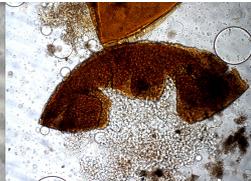
Acaulospora laevis



Acaulospora tuberculata



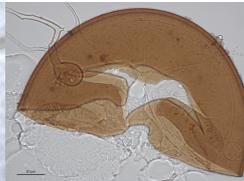
Acaulospora mellea



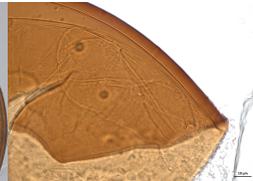
Acaulospora foveata



Acaulospora walkeri



Dentiscutata heterogama



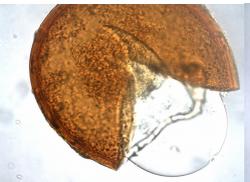
Dentiscutata rubra



Dentiscutata scutata



Gigaspora albida



Gigaspora decipiens



Cetraspora pellucida



Diversispora sp

Figura S2: Imagem dos géis de DGGE obtidos a partir de amostras de solo rizosférico de três genótipos de milho: isolinha (DKB-I), Crioulo e transgênico (DKB-T). Em cada gel podem ser observados os seis blocos experimentais e duas amostras por parcela (plantas amostradas de forma independente). AIE (amostragem feita antes da instalação do experimento), Estágio V3 (estágio vegetativo), B (Blocos, 1 a 6).

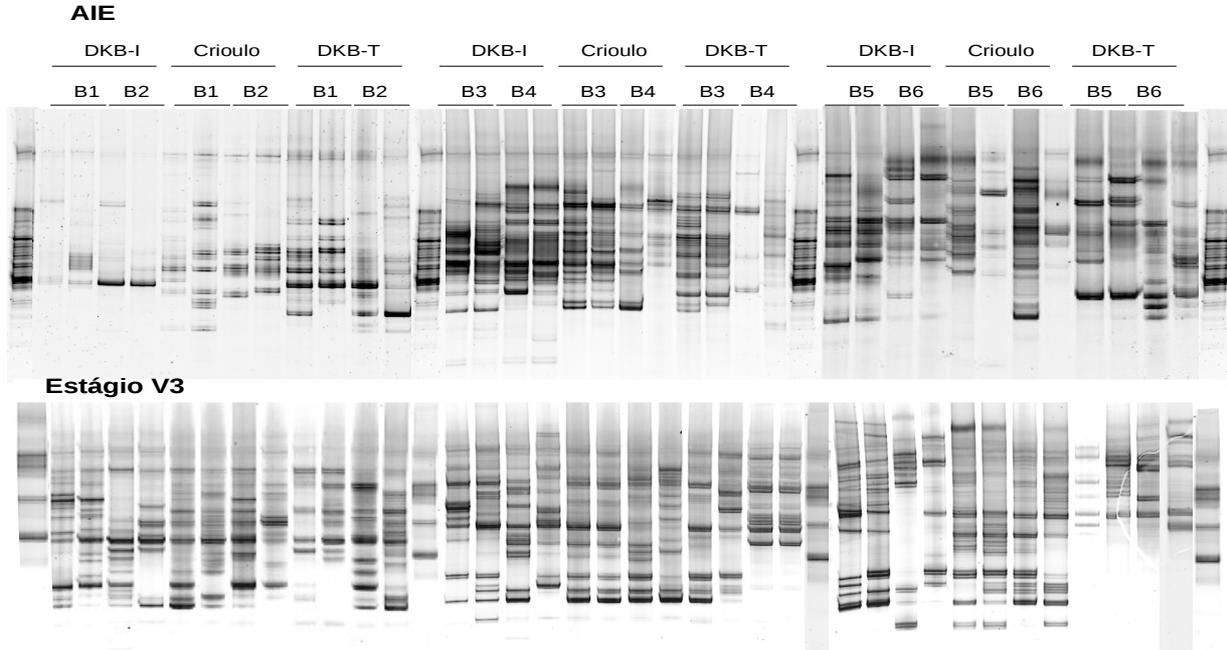
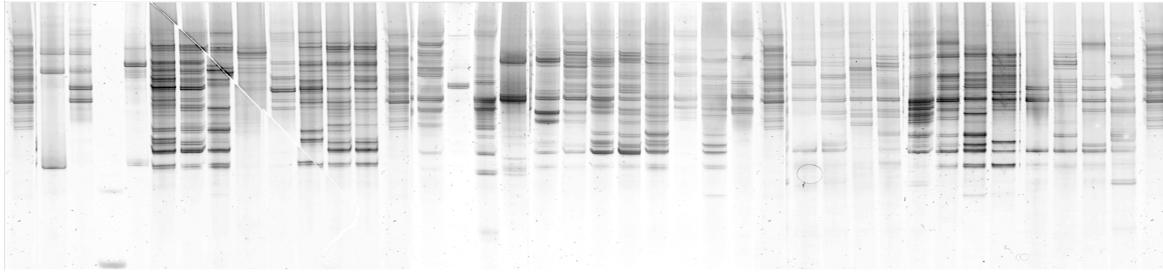


Figura S3: Imagem dos géis de DGGE obtidos a partir de amostras de solo rizosférico de três genótipos de milho: isolinha (DKB-I), Crioulo e transgênico (DKB-T). Em cada gel podem ser observados os seis blocos experimentais e duas amostras por parcela (plantas amostradas de forma independente). R1 (floração), R3 (desenvolvimento dos grãos), B (Blocos, 1 a 6).

Estágio R1

DKB-I		Crioulo		DKB-T		DKB-I		Crioulo		DKB-T		DKB-I		Crioulo		DKB-T	
B1	B2	B1	B2	B1	B2	B3	B4	B3	B4	B3	B4	B5	B6	B5	B6	B5	B6



Estágio R3

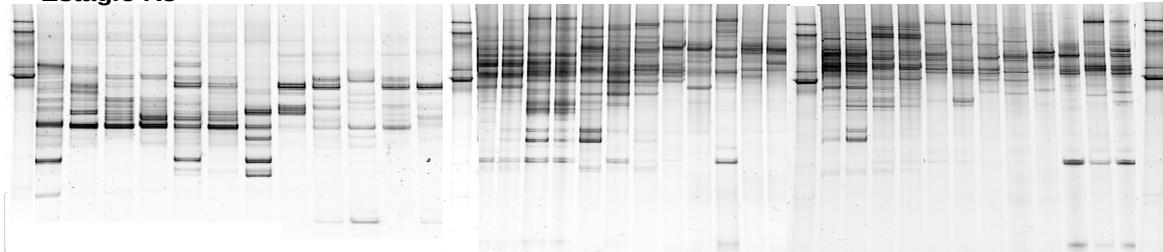


Figura S4. Imagem dos géis de DGGE obtidos a partir de amostras de raiz de três genótipos de milho: isolinha (DKB-I), Crioulo e transgênico (DKB-T). Em cada gel podem ser observados os seis blocos experimentais e duas amostras por parcela (plantas amostradas de forma independente). Estágio V3 (estágio vegetativo), R1 (floração), B (Blocos, 1 a 6).

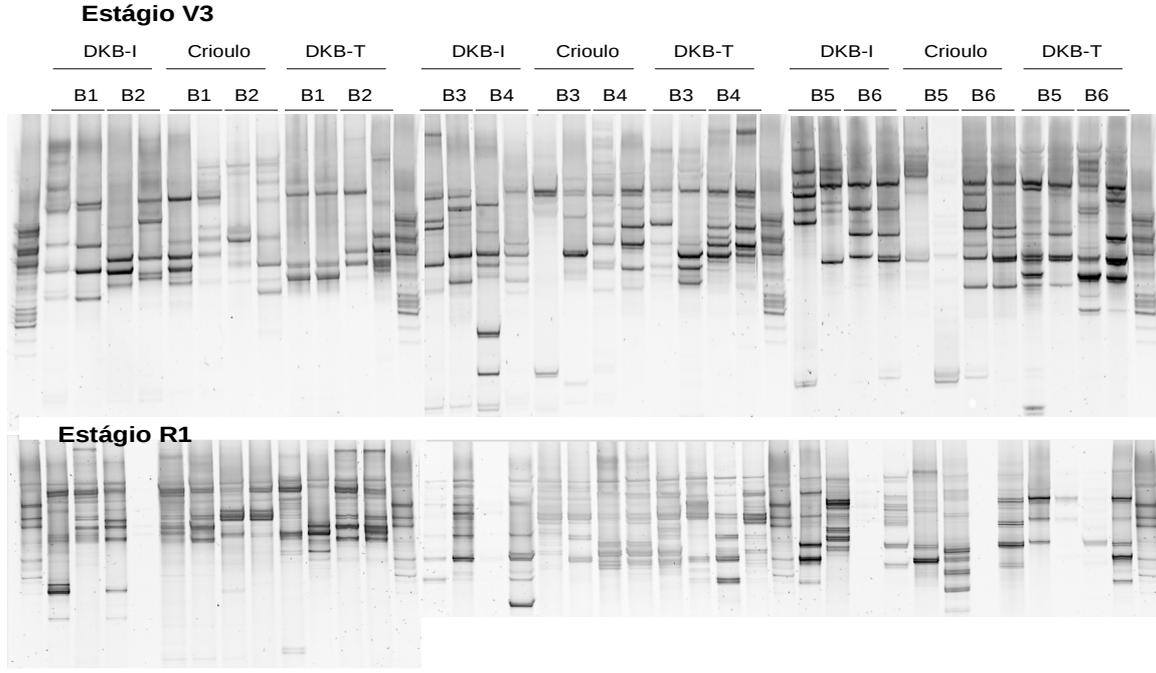


Figura S5: Imagem dos géis de DGGE obtidos a partir de amostras de raiz de três genótipos de milho: isolinha (DKB-I), Crioulo e transgênico (DKB-T). Em cada gel podem ser observados os seis blocos experimentais e duas amostras por parcela (plantas amostradas de forma independente). R3 (desenvolvimento dos grãos), B (Blocos, 1 a 6).

Estágio R3

